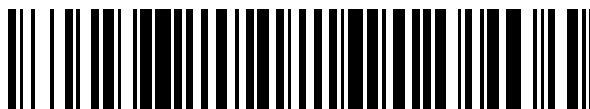


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 021**

51 Int. Cl.:

A61L 26/00 (2006.01)

C12P 19/04 (2006.01)

A61K 31/716 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)

C08L 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.06.2007** **PCT/US2007/014055**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.12.2007** **WO07146416**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2007** **E 07796157 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017** **EP 2032180**

54 Título: **Preparaciones de glucano**

30 Prioridad:

15.06.2006 US 813971 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.08.2017

73 Titular/es:

BIOTHERA, INC. (100.0%)
3388 Mike Collins Drive
Eagan, MN 55121, US

72 Inventor/es:

MAGEE, ANDREW;
ROLKE, JAMES y
YANG, REN-DER

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 628 021 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

Preparaciones de glucano

Antecedentes de la invención

5 La presente invención se refiere a composiciones que incluyen β -glucano. Más particularmente, la presente invención se refiere a composiciones solubles de β -glucano y su uso en la movilización de células madre.

10 Los glucanos se describen generalmente como polímeros de glucosa y se derivan de levaduras, bacterias, hongos y plantas tales como avena y cebada. Se sabe que los glucanos que contienen una columna vertebral de glucopiranososa β (1-3), son conocidos por tener actividad biológica, específicamente se ha demostrado que modulan el sistema inmune y más recientemente por inducir la movilización de células madre hematopoyéticas y progenitoras (HSPC).

15 El tratamiento de diversos cánceres implica cada vez más terapia citorreductora, que incluye quimioterapia de dosificación alta o radiación. Estas terapias disminuyen los recuentos de glóbulos blancos del paciente, suprimen la actividad hematopoyética de la médula ósea y aumentan su riesgo de infección y/o hemorragia. Como un resultado, los pacientes que se someten a terapia citorreductora también deben recibir terapia para reconstituir la función de la médula ósea (hematopoyesis).

A pesar de los avances en la movilización de células madre y técnicas, hasta el 20-25 % de los pacientes exhiben una movilización deficiente y no son capaces de proceder con auto-trasplante. PGG β -glucano es un polisacárido soluble derivado de levadura y se ha demostrado previamente para inducir la movilización de células madre hematopoyéticas y progenitoras (HSPC).

20 Hunter y col., "Preparation of microparticulate β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae* for use in immune potentiation", Letters in Applied Microbiol, vol. 35, 2002, páginas 267-271, describe la preparación de β -glucano usando una combinación de aplicación de ultrasonido y secado por atomización que conduce a micropartículas de 1-2 micrómetros de diámetro.

25 El documento WO 94/04163 describe la preparación de β -glucano soluble en agua, neutro, usando ácido y tratamiento térmico.

El documento WO2004/014320 describe el uso de β -glucano en forma de partículas de glucano entero, partículas de β -glucano en forma de micropartículas o una combinación de las mismas en el tratamiento y prevención de lesiones relacionadas con la radiación y/o quimioterapia y/o aflicciones.

30 Ninguno de los documentos anteriores describe las ventajas y beneficios asociados de la preparación y uso de la presente invención.

Sumario de la invención

35 La presente invención se refiere a un procedimiento para producir β -glucano soluble que tiene propiedades inmunoestimulantes, el procedimiento que comprende la aplicación aproximadamente 241.316,50 pascal (35 PSI) de presión a una suspensión de β -glucano en forma de partículas y ácido; y calentar la suspensión a aproximadamente 135°C durante 4,5 a 5,5 horas para formar β -glucano soluble y una composición que comprende β -glucano soluble no transformado en derivado que tiene propiedades inmunoestimulantes, obtenible mediante dicho procedimiento seguido de purificación y caracterizado por un peso molecular medio entre 120.000 Da y 205.000 Da, una distribución de peso molecular de no más de 2,5, determinada por HR-GPC con dispersión de luz de ángulo múltiple, (HR-GPC/MALLS) y detección diferencial de índice de refracción, la composición capaz de ser administrada en 40 dosificaciones únicas hasta 6 mg/kg.

En la presente invención, la levadura se cultiva, se recoge y se purifica para producir β -glucano en forma de partículas esencialmente libres de compuestos orgánicos volátiles contaminantes (VOC). Como agente farmacéutico, el β -glucano soluble puede administrarse en dosificaciones más altas sin aumentar, o de hecho disminuir, los efectos secundarios observados o los acontecimientos adversos.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es una representación esquemática de un procedimiento para producir β -glucano en forma de partículas.

La FIG. 2 es una representación esquemática de un procedimiento para producir β -glucano soluble.

Descripción detalla de la invención

β -glucano en forma de partículas

La Fig. 1 es una visión general del procedimiento 10, que incluye las 12 - 22, para producir β -glucano insoluble, o en forma de partículas, a partir de levadura. En el paso 12, se cultiva un cultivo de levadura, típicamente, en un matraz de agitación o fermentador. La cepa de levadura que podría usarse puede ser cualquier cepa, que incluye ejemplos de *Saccharomyces* (S.) *cerevisiae*, *S. delbrueckii*, *S. rosei*, *S. microellipsodes*, *S. carlsbergensis*, *S. bisporus*, *S. fermentati*, *S. rouxii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces* (K.) *lactis*, *K. fragilis*, *K. podysporus*, *Candida* (C.) *albicans*, *C. cloacae*, *C. tropicalis*, *C. utilis*, *Hansenula* (H.) *wingei*, *H. arni*, *H. (H.)*, *H. capsulata*, *H. podymorpha*, *Pichia* (P.) *kluyveri*, *P. pastoris*, *P. podymorpha*, *P. rhodanesis*, *P. ohmeri*, *Torulopsis* (T.) *bovina* y *T. glabrata*

En una realización de producción a granel, se inicia un cultivo de levadura y se expande gradualmente a través de un cultivo de matraz de agitación en un fermentador de producción de escala de 250 L. Las levaduras se cultivan en un medio de sulfato de glucosa-amonio enriquecido con vitaminas, tales como ácido fólico, inositol, ácido nicotínico, ácido pantoténico (sal de calcio y sodio), piridoxina HCl y timina HCl y trazas de metales a partir de compuestos tales como cloruro férrico, hexahidrato; cloruro de zinc; cloruro de calcio, dihidrato; ácido molibídico; sulfato cúprico, pentahidrato y ácido bórico. También se puede añadir un agente antiespumante, tal como Antiespumante 204, a una concentración de aproximadamente 0,02 %.

El cultivo de producción se mantiene bajo limitación de la glucosa en un modo de lote alimentado. Durante la fermentación de semillas, se toman muestras periódicamente para medir la densidad óptica del cultivo antes de inocular el fermentador de producción. Durante la fermentación de la producción, también se toman muestras periódicamente para medir la densidad óptica del cultivo. Al final de la fermentación, se toman muestras para medir la densidad óptica, el peso en seco y la pureza microbiana.

Si se desea, la fermentación puede terminarse elevando el pH del cultivo a al menos 11,5 o centrifugando el cultivo para separar las células del medio de crecimiento. Además, dependiendo del tamaño y forma de β -glucano purificado que se desee, pueden llevarse a cabo pasos para romper o fragmentar las células de levadura. Se pueden usar cualquier procedimiento químico, enzimático o mecánico conocido, o cualquier combinación de los mismos para llevar a cabo la interrupción o fragmentación de las células de levadura.

En el paso 14, se recogen las células de levadura que contienen el β -glucano. Cuando se produce el β -glucano a granel, las células de levadura se cosechan típicamente usando centrifugación de flujo continuo.

El paso 16 representa la extracción inicial de las células de levadura que usan una o más de una solución alcalina, un tensioactivo, o una combinación de los mismos. Una solución alcalina adecuada es, por ejemplo, 0,1 M-5 M NaOH. Tensioactivos adecuados incluyen, por ejemplo, octiltioglucoído, Lubrol PX, Triton X-100, laurilsulfato de sodio (SDS), Nonidet P-40, Tween 20 y similares. Tensioactivos iónicos (aniónicos, catiónicos, anfotéricos) (por ejemplo, alquil sulfonatos, cloruros de benzalconio y similares) y tensioactivos no iónicos (por ejemplo, aceites de ricino hidrogenados polioxietilénicos, ésteres de ácidos grasos de polioxietilen sorbitol, ésteres de ácidos grasos de polioxietilen sorbitano, ésteres de ácidos grasos de polioxietilen glicerol, ésteres de ácidos grasos de polietilenglicol, éteres de polioxietileno-alkilfenilo, y similares). La concentración de tensioactivo variará y dependerá, en parte, del agente tensioactivo. El material de células de levadura puede extraerse una o más veces.

Las extracciones se llevan a cabo usualmente a temperaturas entre aproximadamente 70 °C y aproximadamente 90 °C. Dependiendo de la temperatura, de los reactivos usados y de sus concentraciones, la duración de cada extracción se sitúa entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 3 horas.

Después de cada extracción, la fase sólida que contiene el β -glucano se recoge usando centrifugación o centrifugación en flujo continuo y se vuelve a suspender para el siguiente paso. Los contaminantes solubilizados se eliminan en la fase líquida durante las centrifugaciones, mientras que el β -glucano permanece en el material de la pared celular insoluble.

En una realización, se llevan a cabo cuatro extracciones. En la primera extracción, las células de levadura recogidas se mezclan con NaOH de 1,0 M y se calientan a 90°C durante aproximadamente 60 minutos. La segunda extracción es una extracción alcalina/tensioactiva mediante la cual el material insoluble se vuelve a suspender en NaOH de 0,1 M y aproximadamente 0,5 % a 0,6 % de Triton X-100 y se calienta a 90 °C durante aproximadamente 120 minutos. La tercera extracción es similar a la segunda extracción excepto que la concentración de Triton X-100 es aproximadamente 0,05 %, y la duración se acorta a aproximadamente 60 minutos. En la cuarta extracción, el material insoluble se vuelve a suspender en aproximadamente 0,5 % de Triton-X 100 y se calienta a 75 °C durante aproximadamente 60 minutos.

Las extracciones alcalinas y/o tensioactivas solubilizan y eliminan algunos de los materiales celulares de levadura extraños. La solución alcalina hidroliza proteínas, ácidos nucleicos, mananos y lípidos. El tensioactivo mejora la eliminación de lípidos y otras impurezas hidrófobas, lo que proporciona una ventaja adicional produciendo un producto de β -glucano mejorado.

- 5 Los procedimientos de purificación anteriores resultaron en que el β -glucano contenía cantidades diminutas de compuestos orgánicos volátiles (VOC). Estudios anteriores han demostrado que los VOC son producidos por la liberación de grasa como ácido graso libre, que se descompone rápidamente en varios VOC. En la mayoría de los casos, las cantidades detectadas no son suficientes para causar daño, sin embargo, es un beneficio obvio tener un producto que se administra a los seres humanos u otros animales que están esencialmente libres de cualquier VOC.
- 10 El contenido de grasa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* producido por el crecimiento aeróbico y anaeróbico varía entre aproximadamente 3 % y aproximadamente 8 %. El contenido de grasa varía dependiendo de las condiciones de crecimiento de la levadura. La Tabla 1 proporciona una descripción general de la composición de grasa típica de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Los datos provienen de las siguientes referencias:

- 15 • Blagovic, B., J. Rpcuc, M. Meraric, K. Georgia y V. Maric. 2001. Lipid composition of brewer's yeast. Food Technol. Biotechnol. 39:175-181.
- Shulze. 1995. Anaerobic physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. Ph.D. Thesis, Technical University of Denmark.
- Van Der Rest, M. E., A. H. Kamming, A. Nakano, Y. Anrak, B. Poolman y W. N. Koning. 1995. The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function and biogenesis. Microbiol. Rev. 59:304-322.

TABLA 1

Ácido graso	Shulze (1995)	Blagovic et al (2001) (crecimiento anaeróbico)	Van Der Rest et al (1995)
Ácido cáprico 10:0	1,1 %		
Ácido láurico 12:0 y 12:1	4,8 %	7,3 %	
Ácido mistérico 14:0 y 14:1	8,8 %	5,1 %	7,0* %
Ácido palmítico 16:0	26,8 %	44,2 %	12,8 %
Ácido palmitoleico 16:1	16,6 %	16,9 %	32,3 %
Ácido esteárico 18:0	6,1 %	13,9 %	8,0 %
Ácido oleico 18.1	25,7 %	7,3 %	28,0 %
18:2 y mayor ácido linoleico, ácido araquidónico y otros	10,1 %	5,3 %	9,4 %
Incluye lípidos de 10: 0 a 14: 1 1			

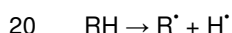
- 20 El material de la pared celular de levadura contiene típicamente 10-25 % de grasa dependiendo del tipo de levadura y las condiciones de crecimiento. En la actualidad, durante el procesamiento de material de pared celular de levadura en β -glucano, se elimina parte, pero no toda la grasa, por pasos de centrifugación y lavado. De Este modo, una preparación típica podría producir un contenido de grasa de 3-7 %.

- 25 El procedimiento de fabricación implica típicamente etapas para eliminar manoproteínas, lípidos y otros componentes indeseables de la pared celular de levadura. Algunos pasos claves comunes para este procesamiento son diversos pasos de lavado que emplean ácido y álcali en pasos de lavado separados para liberar ciertos componentes de la pared celular. Varios de los pasos usan un procedimiento de lavado alcalino donde se añade un álcali, usualmente hidróxido de sodio, a la suspensión líquida de la pared celular. Uno de los propósitos del álcali es eliminar los lípidos mediante la formación de ácidos grasos libres del lípido. El resultado es una reducción en el
- 30 contenido de grasa del β -glucano.

Los pasos de lavado alcalino comúnmente usados en la producción de β -glucano de levadura, dejan atrás ácidos grasos residuales y triglicéridos grasos parcialmente degradados que tienen mayor reactividad. El resultado directo del procedimiento de lavado alcalino es la liberación de ácidos grasos libres reactivos que se descomponen rápidamente para diversos productos oxidativos de la descomposición de la grasa.

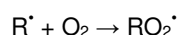
- 5 Numerosos investigadores han detallado el hecho de que las grasas poli-insaturadas se descomponen durante el almacenamiento. Aunque un triglicérido puede autooxidizarse en presencia de oxígeno, es más común que los ácidos grasos libres experimenten descomposición oxidativa. El paso normal en la descomposición de un lípido, también conocido como un triglicérido, es la liberación del ácido graso libre a partir del triglicérido. Los ácidos grasos libres son virtualmente inexistentes en los tejidos de los organismos vivos, pero la descomposición es común cuando el organismo muere o se cosecha para su posterior procesamiento, como ocurre con las semillas oleaginosas y en la producción de grasa animal. (Nawar, WW Capítulo 4. Lipids. In: Food Chemistry. © 1985. Editor: Owen R. Fennema, Marcel Dekker, Inc., DeMan, JM Capítulo 2. Lipids In: Principles of Food Chemistry © 1985. AVI Publishing Co., Inc.) En muchos triglicéridos, la posición 2 de la molécula de glicérido está ocupada por una grasa insaturada. En el caso del tratamiento con álcali de β -glucano es el procedimiento bien conocido de saponificación que libera ácidos grasos insaturados que se descomponen como se describe a continuación.

El procedimiento de oxidación de la grasa tiene varios mecanismos. El mecanismo más común es la autooxidación. El procedimiento se inicia con la eliminación de hidrógeno de un compuesto olefénico para crear un radical libre. La eliminación de hidrógeno toma lugar en el átomo de carbono junto al enlace doble en la grasa. La reacción se inicia por diversos factores generadores de radicales libres tales como luz UV, metales, oxígeno individual, etc.

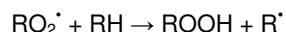


(creación del electrón del radical libre)

El segundo paso es la adición de oxígeno para causar la formación de un radical libre peroxi, que propaga la reacción en cadena mediante la extracción de hidrógeno de otro ácido graso insaturado.

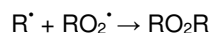
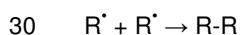


- 25 (formación de radical libre oxigenado reactivo)

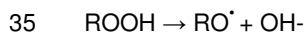


(ROOH es el hidroperóxido reactivo que se descompone en productos de reacción secundarios tales como los VOC)

La reacción en cadena continúa hasta que es terminada por radicales libres que se combinan con ellos mismos para producir productos no reactivos.



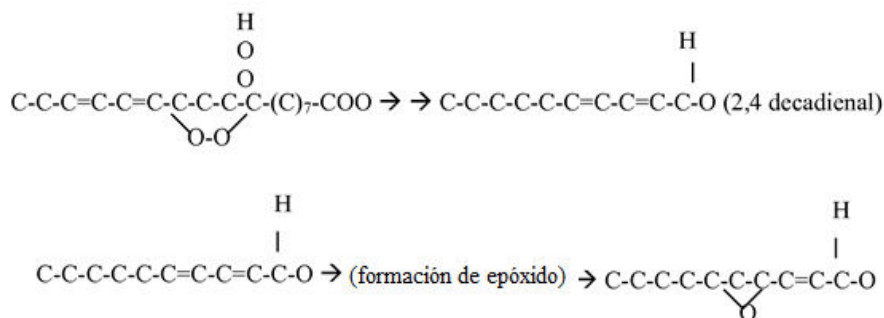
Las siguientes son las reacciones químicas que se producen para formar los VOC. El ácido linoleico se usa como modelo para la química, pero hay otros ácidos grasos insaturados presentes en la pared celular de levadura y en preparaciones de β -glucano de levadura que producen los mismos productos finales.



$RO^{\bullet} \rightarrow$ las reacciones de escisión forman aldehídos, radicales alquilo

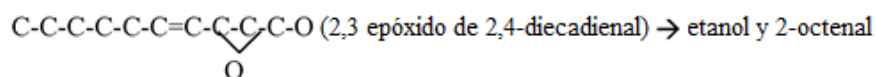
(que forman hidrocarburos y alcoholes), ésteres, alcoholes e hidrocarburos.

Ejemplo:



La descomposición del epóxido produce varios productos incluyendo $\rightarrow$ C-C-C-C-C (hexano) + O=C-C=CC=O (2-buten-1,4 dial)

De manera similar, si el epóxido se forma entre los enlaces 2 y 3 de carbono, la química conduce a:



De forma similar, la formación de cualquier VOC identificado en las preparaciones de β -glucano puede explicarse por las reacciones de autooxidación que se producen con la descomposición de las especies reactivas de peróxidos formados durante la oxidación de ácidos grasos. Por lo tanto, la eliminación de tanta grasa de las preparaciones de β -glucano como sea posible crea un producto que es más puro no sólo en términos de grasa, sino también en términos de contaminación con VOC.

Haciendo referencia de nuevo a la Fig. 1, el siguiente paso en el procedimiento de purificación es una extracción ácida mostrada en el paso 18, que elimina el glucógeno. Se realizan una o más extracciones ácidas ajustando el pH del material extraído alcalino/tensioactivo entre aproximadamente 5 y 9 y mezclando el material en aproximadamente 0,05 M a aproximadamente 1,0 M de ácido acético a una temperatura entre aproximadamente 70°C y 100°C por aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 12 horas.

En una realización, el material insoluble que queda después de la centrifugación de la extracción alcalina tensioactiva se vuelve a suspender en agua, y el pH de la solución se ajusta a aproximadamente 7 con HCl concentrado. El material se mezcla con suficiente ácido acético glacial para hacer una solución de ácido acético de 0.1 M, que se calienta a 90 °C durante aproximadamente 5 horas.

En el paso 20, se lava el material insoluble. En un paso de lavado típico, el material se mezcla en agua purificada a aproximadamente la temperatura ambiente durante un mínimo de aproximadamente 20 minutos. El lavado con agua se lleva a cabo dos veces. El producto de β -glucano purificado se recolecta entonces, como se muestra en el paso 22. Nuevamente, la recolección se lleva a cabo típicamente por centrifugación o centrifugación en flujo continuo.

En este punto, se forma un producto de β -glucano en forma de partículas, purificado. El producto puede estar en la forma de partículas de glucano entero o cualquier porción del mismo, dependiendo del material de partida. Además, las partículas de tamaño más grande pueden romperse en partículas más pequeñas. La gama de productos incluye partículas de β -glucano que tienen sustancialmente retenida morfología in vivo (partículas de glucano entero) hasta partículas de tamaño submicrónico.

Como es bien conocido en la técnica, el β -glucano en forma de partículas es útil en muchas aplicaciones de alimentos, suplementos y farmacéuticos. Alternativamente, el β -glucano en forma de partículas puede procesarse adicionalmente para formar β -glucano soluble, acuoso.

β -glucano soluble

La Fig. 2 es una vista completa del procedimiento 24, que incluye los pasos 26-32, para producir β -glucano soluble, acuoso. El material de partida usado en el procedimiento 24 es β -glucano en forma de partículas, que puede producirse mediante el procedimiento 10 o producido por cualquiera de una serie de procedimientos usados anteriormente. El material de partida de β -glucano puede variar en tamaño desde partículas de glucano entero hasta partículas de tamaño submicrónico.

En el paso 26, el β -glucano en forma de partículas experimenta un tratamiento ácido bajo presión y temperatura elevada para producir β -glucano soluble. En forma de pellas, se suspende de nuevo β -glucano en forma de partículas y se mezcla en un recipiente de reacción sellable en una solución de amortiguador y se lleva a pH 3,6. Se añaden reactivos de amortiguador de manera que cada litro, volumen total, de la mezcla de suspensión final contiene aproximadamente 0,61 g de acetato de sodio, 5,24 ml de ácido acético glacial y 430 g de β -glucano en forma de partículas, en forma de pellas. El recipiente se purga con nitrógeno para eliminar el oxígeno y aumentar la presión dentro del recipiente de reacción.

En una realización particular, la presión dentro del recipiente se lleva a 241.316,50 pascal y la suspensión se calienta a aproximadamente 135 °C durante entre aproximadamente 4,5 y 5,5 horas. Se encontró que bajo estas condiciones el β -glucano se solubilizaría. A medida que la temperatura disminuye desde 135 °C, la cantidad de solubilización también disminuye.

Debe hacerse notar que esta temperatura y presión son requeridas en la realización que se acaba de describir. Puede ser necesaria la optimización de las temperaturas y presiones si se altera alguna de las condiciones de reacción y/o reactivos.

El aumento de presión y temperatura imparte ventajas sobre los procedimientos de la técnica anterior para solubilizar el β -glucano eliminando virtualmente el uso de productos químicos peligrosos del procedimiento. Los productos químicos peligrosos que se han usado previamente incluyen, por ejemplo, los VOC inflamables tales como éter y etanol, ácidos muy fuertes tales como ácido fórmico y ácido sulfúrico y soluciones cáusticas de pH muy alto. El presente procedimiento no sólo es más seguro, sino que, al reducir el número de diferentes productos químicos usados y el número de pasos implicados, es más económico.

La duración exacta del tratamiento térmico se determina típicamente de manera experimental mediante muestreo del contenido del reactor y realizando análisis de cromatografía de permeación en gel (GPC). El objetivo es maximizar el rendimiento de material soluble que cumple con las especificaciones de perfil de alta resolución-GPC (HR-GPC) y los niveles de impurezas, que se discuten a continuación. Una vez que el β -glucano se solubiliza, la mezcla se enfría para detener la reacción.

El β -glucano crudo, solubilizado puede lavarse y usarse en algunas aplicaciones en este punto, sin embargo, para aplicaciones farmacéuticas se lleva a cabo una purificación adicional. Puede usarse cualquier combinación de uno o más de los siguientes pasos para purificar el β -glucano soluble. También se pueden usar otros medios conocidos en la técnica si se desea. En el paso 28, se clarifica el β -glucano soluble. Los medios de clarificación adecuados incluyen, por ejemplo, centrifugación o centrifugación en flujo continuo.

A continuación, el β -glucano soluble puede filtrarse como se muestra en el paso 30. En una realización, el material se filtra, por ejemplo, a través de un filtro de profundidad seguido de un filtro de 0,2 μ m.

El paso 32 usa cromatografía para purificación adicional. El β -glucano soluble puede acondicionarse en algún momento durante el paso 28 o el paso 30 en preparación para la cromatografía. Por ejemplo, si un paso cromatográfico incluye cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), el β -glucano soluble puede acondicionarse a la conductividad y pH apropiados con una solución de sulfato de amonio y acetato de sodio. Una solución adecuada es sulfato de amonio de 3,0 M, acetato de sodio de 0,1 M, que se usa para ajustar el pH a 5,5.

En un ejemplo de HIC, se empaqueta una columna con resina Tosah Toyopearl Butyl 650M (o equivalente). La columna está embalada y calificada de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Antes de la carga, se muestrea el flujo de equilibrio de columna para el pH, la conductividad y los análisis de endotoxinas. El β -glucano soluble, acondicionado en la solución de sulfato de amonio de mayor concentración, se carga y después se lava. La naturaleza del β -glucano soluble es tal que la mayoría del producto se unirá a la columna HIC. Los productos de bajo peso molecular así como algunos productos de alto peso molecular se lavan a través. El β -glucano soluble restante en la columna se eluye con un amortiguador tal como sulfato de amonio 0,2 M, acetato de sodio 0,1 M, pH 5,5. Pueden ser necesarios ciclos múltiples para asegurar que la carga de hexosa no exceda la capacidad de la resina. Las fracciones se recolectan y se analizan para el producto de β -glucano soluble.

Otro paso de cromatografía que se puede usar es la cromatografía de permeación de gel (GPC). En un ejemplo de GPC, se usa una resina Tosah Toyopearl HW55F, o equivalente, y se empaqueta y califica según las recomendaciones del fabricante. La columna se equilibra y se eluye usando solución salina amortiguada con citrato (cloruro de sodio de 0,14 M, citrato de sodio de 0,011 M, pH 6,3). Antes de cargar, se toman muestras de lavado de columna para análisis de pH, conductividad y endotoxinas. Nuevamente, pueden ser necesarios ciclos de cromatografía múltiples para asegurar que la carga no exceda la capacidad de la columna.

El eluato se recolecta en fracciones y se analizan diversas combinaciones de muestras de las fracciones para determinar la combinación con el perfil óptimo. Por ejemplo, las combinaciones de muestras pueden analizarse por HR-GPC para producir la combinación que tiene un perfil HR-GPC optimizado. En un perfil optimizado, la cantidad de impureza de alto peso molecular (HMW), que es β -glucanos solubles sobre 380.000 Da, es menor o igual al 10 %.

5

La cantidad de impureza de bajo peso molecular (LMW), inferior a 25.000 Da, es menor o igual al 17 %. La combinación seleccionada de fracciones se agrupa posteriormente.

En este punto, el β -glucano soluble se purifica y está listo para su uso. Se puede realizar una filtración adicional con el fin de esterilizar el producto. Si se desea, la concentración de hexosa del producto puede ajustarse a aproximadamente $1,0 \pm 0,15$ mg/ml con solución salina amortiguada con citrato estéril.

10

Las técnicas de purificación descritas anteriormente dan como resultado un β -glucano soluble mejorado que proporciona ventajas específicas como un agente farmacéutico, las cuales se discuten a continuación. El β -glucano soluble tiene un peso molecular promedio entre aproximadamente 120.000 Da y aproximadamente 205.000 Da y una distribución de peso molecular (polidispersidad) de no más de 2,5 como se determinó por HR-GPC con dispersión de luz de ángulo múltiple (HR-GPC/MALS) y detección diferencial del índice de refracción. La difracción de rayos X en polvo y la RMN de hilado de ángulo mágico determinaron que el producto consiste en cadenas poliméricas asociadas a hélices triples.

15

El β -glucano soluble típicamente no está cargado y por lo tanto no tiene pK_a . Es soluble en agua independiente del pH, y la viscosidad aumenta a medida que aumenta la concentración.

La Tabla 2 resume los niveles típicos de impurezas en un producto de β -glucano soluble que usa partículas de glucano entero producidas por el procedimiento 10.

20

TABLA 2

Impureza	Especificación	Rango de niveles observados en 3 lotes
HMW (>380 kD)	$\leq 10 \%$	4-8 %
LMW (<25 kD)	$\leq 17 \%$	8-13 %
Reduciendo azúcar	0,7-1,6 % de la hexosa total *	1,0-1,1 % de la hexosa total *
Glucógeno	$\leq 10 \%$ de la hexosa total *	<5 % de la hexosa total *
Manano (como manosa)	$\leq 1 \%$ de la hexosa recuperada	<0,6 a $\leq 0,8 \%$ de la hexosa recuperada
Chitina (como glucosamina)	$\leq 2 \%$ de la hexosa total	0,2-0,5 % de la hexosa total
Proteína	$\leq 0,2 \%$ de la hexosa total	<0,2 % de la hexosa total
Proteína de levadura	Caracterización**	<2 ng/mg hexosa
ADN	Caracterización	<6,5 a <50 pg/mg hexosa
Ergosterol	Caracterización	<10 a <25 μ g/mg hexosa

Impureza	Especificación	Rango de niveles observados en 3 lotes
Triton X-100	Caracterización	<1 a <5 µg/mg hexosa
Antiespumante 204	Caracterización	< 10 µg/mg hexosa
* La hexosa total se determina mediante un ensayo colorimétrico. Los polímeros de azúcar se hidrolizan en ácido sulfúrico y antrona para formar furfurales. Los furfurales se conjugan con la antrona para producir un cromóforo, que se mide espectrofotométricamente. ** No se especificaron los límites.		

Las impurezas relacionadas con el producto incluyen material con pesos moleculares mayores que 380.000 daltons o menos de 25.000 daltons, porque se ha encontrado que el β -glucano soluble mejorado cae entre esos rangos de pesos moleculares.

- 5 Una medida adicional de impurezas relacionadas con el producto es la reducción del azúcar. Cada cadena de polisacárido de glucano termina en la forma de aldehído (azúcar reductor) del azúcar. Por lo tanto, la cantidad de azúcar reductor sirve como una indicación del número de cadenas en la preparación. Debido a que se genera un nuevo extremo reductor con cada escisión de la cadena, el azúcar reductor es un monitor de la estabilidad de la cadena. Los azúcares reductores se pueden medir mediante el ensayo de ácido bicinonínico (BCA), que es bien conocido en la técnica.

10 Las posibles impurezas del procedimiento incluyen otros constituyentes de células de levadura tales como ADN, proteínas de células de levadura, lípidos y otros polisacáridos tales como glicógeno, manano y quitina. Los niveles de ADN se pueden analizar utilizando el ensayo de hibridación de ranuras (MDS PanLabs, Seattle, WA). La proteína residual puede determinarse mediante un ensayo colorimétrico para la proteína o mediante un ensayo

15 inmunoabsorbente de unión enzimática comercial más sensible (ELISA) que mide las proteínas de células de *S. cerevisiae* (Cygnus Technology, Southport, Carolina del Norte). Los lípidos residuales pueden ser monitoreados mediante la evaluación de los niveles de ergosterol usando cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC) con detección a 280 nm.

20 El glucógeno es un polisacárido compuesto principalmente de α -1,4-glucosa unida y su presencia puede determinarse mediante un ensayo enzimático. El producto se añade a una reacción enzimática que contiene amiloglucosidasa, que libera glucosa del glucógeno, que genera azúcares reductores. Los azúcares reductores se miden mediante el ensayo BCA.

25 El manano es un polímero ramificado de α -1,6-manosa unida con ramas α -1,2 y α -1,3 que se controla, como manosa, por su composición de monosacárido. El producto se añade a una reacción, y la manosa se hidroliza con ácido trifluoroacético y se analiza por HPLC.

La quitina es un polímero de β -1,4-N-acetil glucosamina, que se monitorea mediante un ensayo colorimétrico. El β -glucano soluble se hidroliza con ácido sulfúrico y la glucosamina resultante forma un complejo con el reactivo de Ehrlich que se mide colorimétricamente. Estos y otros ensayos adecuados son conocidos por los expertos en la técnica.

30 Las impurezas potenciales de no levadura procedentes de los componentes añadidos durante el procedimiento de fabricación incluyen Triton X-100 (tensoactivo) y Antiespumante 204 (agente antiespumante). Se puede usar HPLC de fase inversa (RP-HPLC) con detección a 280 nm para discernir cualquier Triton X-100 residual. El Antiespumante 204 se evalúa mediante un procedimiento de RP-HPLC usando monitorización selectiva de iones con un detector de espectroscopia de masas de electroatomización en modo positivo.

35 Se proponen ciertas especificaciones del producto para usar el β -glucano soluble como agente farmacéutico. Estas especificaciones se enumeran en la Tabla 3.

TABLA 3

Categoría	Atributo	Procedimiento	Límites propuestos
General	Apariencia	Visual	Solución transparente, incolora
	pH	medidor de pH	5,0-7,5
	Osmolaridad	osmómetro	260-312 mOsm
Identidad	Perfil HR-GPC	GPC-MALS	Se conforma al estándar; proporción entre los volúmenes máximos de retención: 0,8-1,2
Fuerza	Concentración (hexosa total)	Ensayo colorimétrico de hexosa	0,85-1,15 mg/ml
Impurezas	Material HMW	GPC-MALS	≤ 10 %
Impurezas	Material LMW	GPC-MALS	≤ 17 %
	Reduciendo azúcar	Ensayo BCA	0,7-1,6 % de hexosa total
	Proteína residual	Ensayo de proteínas colorimétricas	≤ 0,2 % de hexosa total
	Chitina (glucosamina)	Ensayo colorimétrico	≤ 2 % de hexosa total
	Manano (como manosa)	Composición de los monosacáridos	≤ 1 % de la hexosa recuperada
	Glucógeno	Enzimático	≤10 % de hexosa total
Seguridad	Endotoxina	Ensayo de Factor C recombinante de PyroGene	≤ 0,25 EU*/ml
	Bioburden	Filtración de membrana	≤ 5 CFU**/10 ml
*unidad de formación de colonia			
** unidad de endotoxina			

Como se ha indicado anteriormente, el β-glucano soluble producido por los procedimientos 10 y 24 es un producto mejorado sobre los materiales solubles de β-glucano. Se observa mejoría en los resultados de ensayos clínicos en los que el β-glucano soluble administrado a una dosis máxima mucho más alta mostró el mismo o menos efectos adversos (EA) como dosis máximas inferiores de β-glucano soluble en la técnica anterior. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

TABLA 4

EA relacionados (que ocurren en ≥ 5 % del total de participantes)	Bf1¹	Solución β-Glucano mejorada²
Cuerpo como un conjunto		
Dolor de espalda	7 %	--
Fiebre	16 %	--
Cabeza	30 %	8 %
Dolor	7 %	--
Cardiovascular		
Vasodilatación/Enrojecimiento	--	6 %
Digestivo		
Náuseas	7 %	6 %
Hémico/ linfático		
Equimosis	--	--
Leucocitosis	--	--
Respiratorio		
Disnea	--	1 %
Musculoesquelético		
Artralgias	11 %	--
Piel/apéndices		
Urticaria	7 %	--
Erupción	--	--
Sentidos especiales		
Conjuntivitis	9 %	--

² Dosis única máxima 6,0 mg / kg; ¹ Dosis única máxima 2,25 mg / kg

Bf1 es conocido por el nombre comercial Betafectin™, un producto soluble de b-glucano desarrollado por Alpha-Beta Technology, Inc.

El proceso para producir Betafectin™ utilizó ácido fórmico para solubilizar el material particulado de b-glucano. Además, Bf1 no se sometió a ninguna cromatografía en su proceso de purificación.

Los estudios se realizaron con una población voluntaria de sujetos sanos. Cuando se comparó con Bf1, los participantes del estudio que tomaron el β -glucano soluble mejorado reportaron menos eventos adversos, aunque la dosificación máxima fue más de 2,5 veces la de Bf1. Por lo tanto, se puede administrar una dosificación mucho más alta del β -glucano soluble mejorado sin aumentar, pero probablemente incluso disminuir, los efectos secundarios.

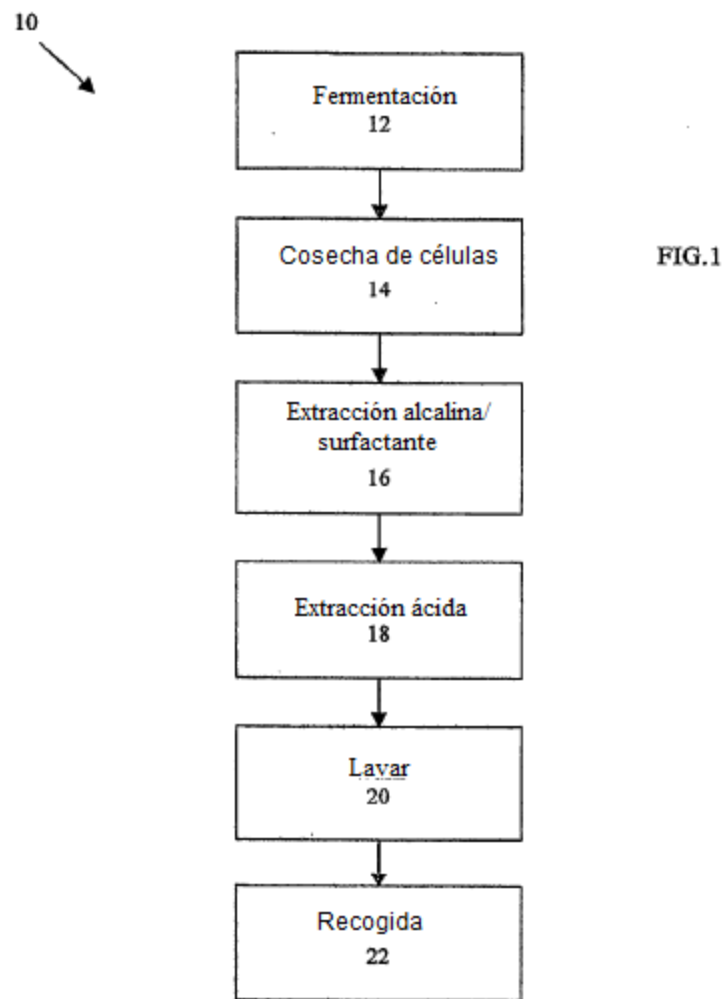
5 Además, el β -glucano soluble mejorado no induce mediadores bioquímicos, tales como la interleuquina-1 β y el factor de necrosis tumoral- α , que producen efectos secundarios inflamatorios.

Los procedimientos aquí descritos proporcionan varias ventajas sobre los procedimientos de la técnica anterior y resultan en productos de β -glucano mejorados. El β -glucano en forma de partículas está esencialmente libre de VOC dañinos. La solubilización del β -glucano es más segura y más económica. Además, la solubilización del β -glucano en forma de partículas producido por el presente procedimiento resulta en β -glucano soluble con cualidades farmacéuticas mejoradas.

10

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir β -glucano soluble que tiene propiedades inmunoestimulantes, donde el procedimiento comprende:
5 aplicar aproximadamente 241.316,50 pascal) de presión a una suspensión de β -glucano en forma de partículas y ácido; y
 calentar la suspensión a aproximadamente 135 °C durante 4,5 a 5,5 horas para formar β -glucano soluble.
2. El procedimiento de la reivindicación 1 y que comprende además:
clarificar el β -glucano soluble.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el β -glucano soluble se clarifica por centrifugación, filtración o
10 una combinación de los mismos.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la suspensión está en un recipiente en el que se elimina sustancialmente todo el oxígeno.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el oxígeno se elimina purgando el recipiente con nitrógeno.
6. El procedimiento de la reivindicación 1 y que comprende adicionalmente:
15 separar el β -glucano soluble en fracciones en base al peso molecular.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el β -glucano soluble se separa por cromatografía.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el ácido es ácido acético.
9. Composición que comprende β -glucano soluble no transformado en derivado que tiene propiedades inmunoestimuladoras, obtenible por el procedimiento de la reivindicación 1 seguido por purificación, y **caracterizado**
20 **por:**
 un peso molecular promedio entre 120.000 Da y 205.000 Da,
 una distribución del peso molecular de no más de 2,5,
 determinada por HR-GPC con dispersión de luz de ángulo múltiple, (HR-GPC/MALLS) y detección diferencial del índice de refracción, pudiendo administrarse la composición en dosificaciones únicas hasta 6 mg/kg.
- 25 10. La composición de la reivindicación 9, en la que el β -glucano soluble, no transformado en derivado induce menos mediadores bioquímicos, que causan efectos secundarios inflamatorios, que un producto de β -glucano soluble obtenido mediante el uso de ácido fórmico para solubilizar el material de β -glucano en forma de partículas.
11. La composición de la reivindicación 9, en la que el β -glucano soluble no transformado en derivado se deriva de *Saccharomyces cerevisiae*.
- 30 12. La composición de la reivindicación 11, en la que β -glucanos solubles encima de 380.000 Da es menor o igual que 10 %.
13. La composición de la reivindicación 11 o 12, en la que β -glucanos solubles debajo de 25.000 Da es menor o igual a 17 %.



24
↓

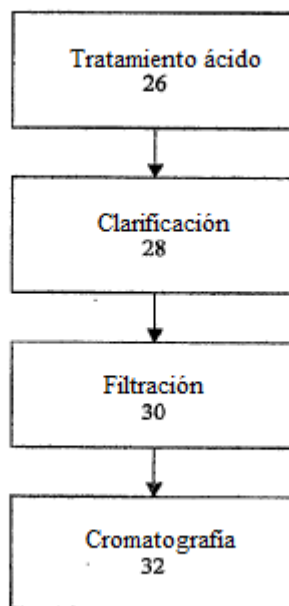


FIG. 2