

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 980**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.05.2013 PCT/FR2013/051181**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.12.2013 WO13178931**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.05.2013 E 13731837 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018 EP 2856154**

54 Título: **Métodos para descontaminar circuitos de producción de polímeros de glucosa e hidrolizados de polímeros de glucosa**

30 Prioridad:

29.05.2012 FR 1254935

16.07.2012 FR 1256848

18.10.2012 FR 1259923

16.01.2013 FR 1350353

27.03.2013 FR 1352748

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

19.06.2018

73 Titular/es:

ROQUETTE FRÈRES (100.0%)

1 rue de la Haute Loge

62136 Lestrem, FR

72 Inventor/es:

DUVET, SOPHIE;

HACINE-GHERBI, HÉLA;

LANOS, PIERRE;

ALLAIN, FABRICE;

CARPENTIER, MATHIEU y

DENYS, AGNÈS

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 672 980 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).

DESCRIPCION

Métodos para descontaminar circuitos de producción de polímeros de glucosa e hidrolizados de polímeros de glucosa

5 La presente invención se refiere a métodos de descontaminación de los circuitos de producción o de purificación de polímeros de glucosa, más particularmente los destinados a los dominios alimentarios (ingredientes saludables ricos en fibras) y médicos (diálisis peritoneal), o de hidrolizados de polímeros de glucosa, más particularmente los destinados a los dominios médicos (inyectable de glucosa apirógeno).

Antecedentes tecnológicos de la invención

10 La sociedad solicitante eligió desarrollar su invención en un dominio conocido por la peligrosidad de los contaminantes de origen microbiano susceptibles de aparecer en los circuitos de producción de los polímeros de glucosa o en los de producción de sus hidrolizados, contaminantes origen de posibles:

- intoxicaciones alimentarias
- reacciones inflamatorias muy nefastas para la salud humana.

15 En el marco de un enfoque de seguridad alimentaria, como en el de un enfoque de seguridad sanitaria, es importante por lo tanto asegurar la ausencia de contaminantes de origen microbiano, tanto bajo forma de células vivas como de restos celulares, por todos los medios técnicos adecuados, particularmente:

- la definición de circuitos de producción seguros, mediante el establecimiento de dispositivos y técnicas de purificación adaptados.
- la definición de métodos eficaces de identificación y de dosificación de los contaminantes.

20 Por ejemplo, en el caso de la diálisis peritoneal, se deben preparar una cierta cantidad de ingredientes en las condiciones de pureza más estrictas.

La diálisis peritoneal es en efecto un tipo de diálisis que tiene por objetivo eliminar los desechos como la urea, la creatinina, el exceso de potasio o el excedente de agua que los riñones no logran, o ya no más, depurar del plasma sanguíneo. Ese tratamiento médico se indica en caso de insuficiencia renal crónica terminal.

25 Los líquidos dializados utilizados más corrientemente están compuestos por una solución tampón (de lactato de bicarbonato) de pH ácido (5,2 - 5,5) o fisiológico (7,4) a los cuales se les agregan electrolitos (sodio, calcio, magnesio, cloro) y sobre todo un agente osmótico (glucosa o un polímero de glucosa, como la «icodextrina» presente en la solución para diálisis peritoneal ambulatoria EXTRANEAL® comercializada por la sociedad BAXTER).

30 El polímero de glucosa, como la icodextrina mencionada antes, se prefiere a la glucosa como agente osmótico, puesto que en razón de su pequeño tamaño, la glucosa que atraviesa rápidamente el peritoneo conduce a la pérdida de gradiente osmótico en el correr de las 2 a 4 horas de infusión.

En el dominio más particular de la utilización de polímeros de glucosa destinados a la diálisis peritoneal continua y ambulatoria, se puso de manifiesto muy rápidamente que esos hidrolizados de almidón (mezcla de glucosa, oligómeros y polímeros de glucosa) no se pueden utilizar tal cual.

35 La solicitud de patente europea EP 207.676 enseña que es preferible polímeros de glucosa que formen soluciones límpidas e incoloras al 10% en agua, que tengan un peso molecular promedio en peso (Mw) de 5.000 a 100.000 Dalton y un peso molecular promedio en número (Mn) inferior a 8.000 Dalton.

40 Tales polímeros de glucosa comprenden también de manera preferida al menos 80% de polímeros de glucosa cuyo peso molecular está comprendido entre 5.000 y 50.000 Dalton, poco o nada de glucosa o de polímeros de glucosa de grado de polimerización (DP) inferior o igual a 3 (peso molecular 504) y poco o nada de polímeros de glucosa de peso molecular superior a 100.000 (DP próximo a 600).

En otras palabras, los polímeros de glucosa preferidos son polímeros de glucosa de índice de polimolecularidad bajo (valor obtenido calculando la relación Mw/Mn).

45 Los procedimientos propuestos en esta solicitud de patente EP 207.676 para obtener esos polímeros de glucosa de bajo índice de polimolecularidad a partir de hidrolizados de almidón consisten en:

- bien efectuar una precipitación fraccionada de una maltodextrina empleando un solvente miscible con agua,
- bien efectuar una filtración molecular de esta misma maltodextrina a través de diferentes membranas que posean un umbral de corte o de exclusión adecuado.

En ambos casos, esos procedimientos tienden a eliminar a la vez los polímeros de muy alto peso molecular y los monómeros u oligómeros de bajo peso molecular.

Esos procedimientos no dan sin embargo satisfacción ni desde el punto de vista de su empleo ni desde el punto de vista de los rendimientos y la calidad de los productos que permiten obtener.

5 Preocupada por poner a punto un procedimiento de fabricación de un polímero de glucosa completamente soluble en agua y de bajo índice de polimolecularidad preferentemente inferior a 2,5, que tenga preferentemente un Mn inferior a 8.000 Dalton y que posea un Mw comprendido entre 12.000 y 20.000 Dalton, procedimiento que esté desprovisto de los inconvenientes del estado anterior de la técnica, la sociedad solicitante, se ha centrado en resolver este problema en su patente EP 667.356, partiendo de un almidón hidrolizado, en lugar de una maltodextrina.

10 El polímero de glucosa obtenido por fraccionamiento cromatográfico contiene entonces preferentemente menos de 3% de glucosa y de polímeros de glucosa de DP inferior o igual a 3 y menos de 0,5% de polímeros de glucosa de DP superior a 600.

15 Finalmente, es admitido en lo sucesivo por los expertos del dominio de la diálisis peritoneal que esos polímeros de glucosa, utilizados por su poder osmótico, son totalmente satisfactorios.

No obstante, hay que lamentar los riesgos de contaminación microbiana de esas preparaciones destinadas a la diálisis peritoneal.

Se sabe, en efecto, que los circuitos de producción de los polímeros de glucosa pueden ser contaminados por microorganismos, o por sustancias proinflamatorias contenidas en dichos microorganismos.

20 Por ejemplo se describe en la industria del almidón la contaminación de los almidones de maíz o de trigo por microorganismos tipo levaduras, mohos y bacterias, y muy particularmente por bacterias acidotermófilas del tipo *Alicyclobacillus acidocaldarius* (bacterias extremófilas que aparecen en las zonas calientes y ácidas del circuito).

El mayor riesgo para el paciente que recibe esos productos contaminados es entonces la peritonitis.

25 Esos episodios de peritonitis son provocados por infecciones bacterianas intraperitoneales, y el diagnóstico es establecido habitualmente fácilmente por los cultivos positivos del dializado.

La «peritonitis estéril», descrita como peritonitis aséptica, química o con cultivo negativo, es provocada típicamente por un irritante químico o un cuerpo extraño.

30 Desde la introducción de la icodextrina para la preparación de soluciones de diálisis peritoneal, se ha informado de casos aislados de peritonitis aséptica, que pueden estar ligados a causas diversas y fundamentalmente a la inducción por sustancias proinflamatorias potencialmente presentes.

Los episodios inflamatorios asépticos son por lo tanto complicaciones mayores observadas luego de inyecciones de soluciones de diálisis.

35 Si una parte de esos episodios inflamatorios está ligada a un problema de orden químico (inyección accidental de contaminantes químicos o mala dosificación de ciertos compuestos), la mayoría de los casos está asociada directamente a la presencia de contaminantes de origen microbiano presentes en las soluciones que sirven para la preparación de soluciones de diálisis.

Los lipopolisacáridos (LPS) y los peptidoglucanos (PGN) son los principales contaminantes de origen microbiano que presentan un riesgo elevado de desencadenar una inflamación aún cuando estén presentes en el estado de trazas.

40 Por otra parte, es mérito de la sociedad solicitante el haber también tenido en cuenta la presencia de moléculas susceptibles de exacerbar la respuesta inflamatoria inducida por esos contaminantes, como los productos de despolimerización de los PGN, cuya estructura mínima aún bioactiva es el muramil-dipéptido (MDP).

Esos derivados, considerados aisladamente, son poco inflamatorios *in vitro* y dan una respuesta significativa para valores superiores a 1 µg/ml.

45 Además de los productos de despolimerización de los PGN, los péptidos microbianos formilados cuyo prototipo es el f-MLP (tripéptido formil-Met-Leu-Phe), tienen asimismo una actividad sinérgica importante. En el origen, esos péptidos fueron identificados por su actividad quimioatrayente sobre los leucocitos, aunque ellos son incapaces de inducir una respuesta citocínica *per se*.

50 Por lo tanto es importante no pasar por alto esas "moléculas pequeñas", puesto que ellas pueden dar cuenta indirectamente de los episodios inflamatorios asépticos al exacerbar los efectos de las trazas de PGN y/o de LPS.

La farmacopea propone una batería de pruebas para la detección de sustancias pirógenas:

- La prueba de detección de las endotoxinas bacterianas, componentes mayoritarios de las bacterias gramnegativas (prueba LAL),
- La prueba de pirógenos en conejo.

5 Si bien generalmente son confiables, esas dos pruebas presentan sus límites. La prueba de pirógenos en conejo se basa en la detección indirecta de sustancias pirógenas por medición de un aumento de la temperatura del conejo al cual se le ha inyectado el producto que contiene esas sustancias (respuesta febril).

Esa prueba puede dar lugar a falsos negativos, si la sustancia indeseable presenta muy poca actividad biológica o una concentración muy baja para inducir una respuesta pirógena sistémica.

10 Por otra parte, esta sustancia puede poseer una actividad biológica o una concentración suficiente para producir una reacción inflamatoria local.

La prueba LAL sólo detecta las endotoxinas bacterianas (LPS) así como los β glucanos, componentes de las paredes de las floras fúngicas. Las otras impurezas biológicas (ADN, peptidoglucanos...) no son detectadas.

15 Por tanto, la manifestación de las peritonitis asépticas observadas con las soluciones de diálisis peritoneal que contienen icodextrina atestiguan, para ciertos casos, la manera en que ciertas sustancias pueden escapar a las pruebas descritas en la farmacopea y pueden estar en el origen de los efectos clínicos indeseables.

Para remediar esta situación, la sociedad BAXTER había propuesto poner el esfuerzo en la detección de los contaminantes microbianos grampositivos.

20 En particular, en su patente EP 1.720.999 (US2005/191717), la sociedad BAXTER propuso desarrollar un método basado en la detección de los peptidoglucanos, que son los componentes principales de las membranas de las bacterias grampositivas, fundamentalmente en los polímeros de glucosa destinados a la preparación de una solución para diálisis peritoneal. WO2007/076411 describe una prueba de detección de contaminantes pirógenos que se basa en la utilización de monocitos.

25 En otras palabras, para impedir la aparición de esos episodios de peritonitis asépticas, la sociedad BAXTER propuso para la fabricación y el uso de las soluciones de diálisis peritoneal, un protocolo de detección de peptidoglucanos en la solución de diálisis peritoneal.

Por otra parte, si se menciona en esa patente EP 1.720.999 el tratamiento anterior de los polímeros de glucosa, no lo es más que mediante resinas de afinidad susceptibles de atrapar los peptidoglucanos como tales.

30 Por consiguiente no se consideraba modificar el procedimiento de fabricación de los polímeros de glucosa de forma que el producto final estuviera desprovisto de contaminación por bacterias acidotermófilas del tipo *Alicyclobacillus acidocaldarius* o por restos de las membranas de esas bacterias particulares.

35 Por el contrario, en su solicitud de patente internacional WO 2010/125315, la sociedad solicitante proporcionaba, mediante un procedimiento de preparación y purificación seguro, sustancias destinadas a la diálisis peritoneal de mejor calidad, en el caso de los polímeros de glucosa, a fin de asegurar que esas sustancias estuvieran eficazmente desprovistas de sustancias contaminantes.

La sociedad solicitante ha empleado un procedimiento de purificación extraordinario, que combina un cierto número de etapas de tratamiento con carbón activado/negro granular, de filtración (microfiltración y ultrafiltración) y de tratamiento térmico en una disposición propicia para impedir toda contaminación.

40 No obstante, ese procedimiento es perfectible y la sociedad solicitante se ha esforzado en desarrollar métodos de detección y de dosificación más eficaces que los accesibles en el estado de la técnica, a fin de definir mejor las etapas clave del procedimiento a emplear, para garantizar una seguridad óptima de las líneas de producción, fundamentalmente de los polímeros de glucosa.

FR2978774 y WO2012/143647 se centran en la utilización de modelos celulares para medir la presencia de moléculas proinflamatorias en muestras de polímeros de glucosa.

45 De todo lo precedente, permanece una necesidad no satisfecha de proporcionar, mediante un procedimiento de preparación y purificación seguro, sustancias destinadas a las aplicaciones terapéuticas de mejor calidad, en el caso de los polímeros de glucosa y en sus hidrolizados, a fin de asegurar que esas sustancias sean eficazmente desprovistas de contaminantes.

50 La sociedad solicitante ha encontrado por lo tanto que esa necesidad podía ser satisfecha por el empleo de etapas de purificación adaptadas, cuya eficacia puede ser medida mediante métodos de detección y de dosificación de los contaminantes totalmente particulares.

Estos últimos años, se han desarrollado numerosas pruebas que utilizan células primarias para reemplazar los modelos animales en las pruebas de respuesta inflamatoria.

No obstante, esos modelos *in vitro* están sujetos a una importante variabilidad interindividual, que puede ser responsable de los sesgos experimentales.

5 A la inversa, las líneas celulares monocitarias dan respuestas constantes, lo que explica por qué las pruebas actualmente en desarrollo utilizan cada vez más ese tipo de células en cultivo. Sin embargo, esas pruebas presentan el inconveniente de dar una respuesta inflamatoria global a todos los contaminantes presentes mezclados en una solución, y por consiguiente no permiten caracterizar la naturaleza del contaminante.

10 Es asimismo importante destacar que la respuesta inflamatoria exacerbada es visible para las citocinas de la fase aguda de la inflamación, como el TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa), la IL-1 β (interleucina 1 β) y las quimiocinas como CCL5 (quimiocina (motivo C-C) ligando 5)/RANTES (quimiocina de expresión por activación expresada y secretada por los linfocitos T), pero poco o nada para la IL-6 (interleucina 6).

De este modo, los métodos basados en la producción de esta última (US 2009/0239819 y US 2007/0184496) no están adaptados para detectar los contaminantes mezclados en una solución.

15 La Sociedad solicitante ha llegado a las conclusiones siguientes:

(i) es difícil detectar contaminantes bacterianos presentes en estado de trazas en las soluciones biológicas,

(ii) es importante no limitarse a la detección de los PGN y del LPS, en razón de sus efectos sinérgicos,

(iii) es necesario desarrollar nuevos métodos de detección sensibles y reproducibles, y

20 (iv) es ventajoso utilizar métodos de detección, sensibles y reproducibles, capaces de caracterizar la naturaleza de los contaminantes.

Por lo tanto ha sido un mérito de la sociedad solicitante el haber desarrollado métodos sensibles y eficaces de detección de los contaminantes microbianos que tienen una acción proinflamatoria, por debajo del umbral de sensibilidad de los procedimientos utilizados actualmente y/o descritos en la bibliografía, y finalmente de haber identificado la familia, incluso la naturaleza, de las moléculas proinflamatorias presentes bajo forma de trazas en los lotes provenientes de los circuitos de producción.

25

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento que permite probar el efecto de una o más etapas de producción o la eficacia de una o más etapas de purificación sobre la presencia o la naturaleza de las moléculas proinflamatorias en los polímeros de glucosa o sus hidrolizados, que comprende:

30 a) proporcionar polímeros de glucosa o sus hidrolizados;

b) detectar o dosificar las moléculas proinflamatorias en los polímeros de glucosa o sus hidrolizados proporcionados en la etapa a);

c) efectuar la o las etapas de producción o de purificación sobre los polímeros de glucosa o sus hidrolizados proporcionados en la etapa a);

35 d) detectar o dosificar las moléculas proinflamatorias en los polímeros de glucosa o sus hidrolizados obtenidos luego de la etapa c);

e) determinar la eficacia o el impacto de la etapa c) sobre la presencia o la naturaleza de las moléculas proinflamatorias por comparación de las moléculas proinflamatorias de los polímeros de glucosa o sus hidrolizados detectadas o dosificadas en las etapas b) y d), siendo una disminución de la cantidad de moléculas proinflamatorias o de ciertas de esas moléculas, indicativa de la eficacia de la etapa c) para la descontaminación de los polímeros de glucosa o de sus hidrolizados;

40

en el cual la etapa de detección o dosificación de las moléculas proinflamatorias en los polímeros de glucosa o sus hidrolizados comprende una prueba *in vitro* de respuesta inflamatoria empleando una línea celular que expresa el receptor TLR2 (receptor tipo Toll 2)) y un gen reportero cuya transcripción está bajo la dependencia directa de la vía de señalización asociada al receptor TLR2, siendo detectadas o dosificadas las moléculas proinflamatorias por medición de la actividad o de la señal del gen reportero.

45

Asimismo se refiere a un procedimiento optimizado de producción o de purificación de polímeros de glucosa o de sus hidrolizados, que comprende:

a) proporcionar polímeros de glucosa o sus hidrolizados;

b) detectar o dosificar las moléculas proinflamatorias en los polímeros de glucosa o sus hidrolizados proporcionados en la etapa a);

c) seleccionar la o las etapas de producción o de purificación de los polímeros de glucosa o de sus hidrolizados adaptadas a las moléculas proinflamatorias presentes en los polímeros de glucosa o sus hidrolizados;

5 d) efectuar la o las etapas de producción o de purificación seleccionadas sobre los polímeros de glucosa o sus hidrolizados proporcionados en la etapa a); y

e) detectar o dosificar las moléculas proinflamatorias en los polímeros de glucosa o sus hidrolizados obtenidos luego de la etapa d);

10 en el cual la etapa de detección o dosificación de las moléculas proinflamatorias en los polímeros de glucosa o sus hidrolizados comprende una prueba *in vitro* de respuesta inflamatoria empleando una línea celular que expresa el receptor TLR2 (receptor tipo Toll 2) y un gen reportero cuya transcripción está bajo la dependencia directa de la vía de señalización asociada al receptor TLR2, siendo detectadas o dosificadas las moléculas proinflamatorias por medición de la actividad o de la señal del gen reportero.

15 En un primer aspecto, la prueba *in vitro* de respuesta inflamatoria puede comprender poner en contacto los polímeros de glucosa o sus hidrolizados con la línea celular THP-1 diferenciada a macrófagos, sensibilizada con MDP o LPS, siendo detectadas o dosificadas las moléculas proinflamatorias por medición de la cantidad de RANTES o TNF- α producida por la línea celular.

20 En un segundo aspecto, la prueba *in vitro* de respuesta inflamatoria puede comprender poner en contacto polímeros de glucosa o sus hidrolizados con una línea de macrófagos transfectada con un gen reportero cuya transcripción está bajo la dependencia directa de las vías de señalización inflamatorias, siendo detectadas o dosificadas las moléculas proinflamatorias por medición de la actividad o de la señal del gen reportero.

25 En un tercer aspecto, la prueba *in vitro* de respuesta inflamatoria puede comprender poner en contacto polímeros de glucosa o sus hidrolizados con una línea celular que expresa el receptor NOD2 y un gen reportero cuya transcripción está bajo la dependencia directa de las vías de señalización de NOD2, siendo detectadas o dosificadas las moléculas proinflamatorias por medición de la actividad o de la señal del gen reportero.

En un cuarto aspecto, la prueba *in vitro* de respuesta inflamatoria puede comprender poner en contacto polímeros de glucosa o sus hidrolizados con una línea celular que expresa el receptor TLR4 y un gen reportero cuya transcripción está bajo la dependencia directa de las vías de señalización de TLR4, siendo detectadas o dosificadas las moléculas proinflamatorias por medición de la actividad o de la señal del gen reportero.

30 En un quinto aspecto, la prueba *in vitro* de respuesta inflamatoria puede comprender poner en contacto polímeros de glucosa o sus hidrolizados con:

a. la línea celular THP-1 diferenciada a macrófagos, sensibilizada con MDP o LPS, siendo detectadas o dosificadas las moléculas proinflamatorias por medición de la cantidad de RANTES o TNF- α producida por la línea celular; y,

35 b. una línea de macrófagos transfectada con un gen reportero cuya transcripción está bajo la dependencia directa de las vías de señalización inflamatorias, siendo detectadas o dosificadas las moléculas proinflamatorias por medición de la actividad o de la señal del gen reportero; y,

40 c. una línea celular que expresa el receptor TLR2 y un gen reportero cuya transcripción está bajo la dependencia directa de las vías de señalización de TLR2, siendo detectadas o dosificadas las moléculas proinflamatorias por medición de la actividad o de la señal del gen reportero; y,

d. una línea celular que expresa el receptor NOD2 y un gen reportero cuya transcripción está bajo la dependencia directa de las vías de señalización de NOD2, siendo detectadas o dosificadas las moléculas proinflamatorias por medición de la actividad o de la señal del gen reportero; y,

45 e. una línea celular que expresa el receptor TLR4 y un gen reportero cuya transcripción está bajo la dependencia directa de las vías de señalización de TLR4, siendo detectadas o dosificadas las moléculas proinflamatorias por medición de la actividad o de la señal del gen reportero.

En un sexto aspecto, la prueba *in vitro* de respuesta inflamatoria puede comprender además poner en contacto polímeros de glucosa o sus hidrolizados con una línea de control no transfectada por un receptor de la inmunidad.

50 Preferentemente, las moléculas proinflamatorias son moléculas de origen bacteriano, preferentemente elegidas entre los PGN, los LPS, los lipopolipéptidos, los productos de despolimerización de los PGN, fundamentalmente del MDP, los péptidos microbianos formulados como el f-MLP y los β glucanos.

Preferentemente, la o las etapas de producción o de purificación se eligen entre etapas de tratamiento térmico, de acidificación, de pasaje sobre carbón activado, de pasaje sobre resinas de adsorción, de ultrafiltración, de filtración, de hidrólisis química o enzimática.

5 Preferentemente, los polímeros de glucosa se eligen entre la icodextrina y las maltodextrinas, particularmente las maltodextrinas ramificadas o no, y los hidrolizados de los polímeros de glucosa son un producto de la hidrólisis total como el monohidrato de dextrosa.

Preferentemente, las muestras de polímeros de glucosa o de sus hidrolizados son filtradas previamente, particularmente con un umbral de corte de 30 kDa, y el filtrado se pone en contacto con la línea celular utilizada en la prueba.

10 **Descripción detallada de la invención**

La presente descripción se refiere por lo tanto a un procedimiento que permite probar el impacto o el efecto de una o más etapas de producción o la eficacia de una o más etapas de purificación sobre la presencia o la naturaleza de las moléculas proinflamatorias en los polímeros de glucosa o sus hidrolizados, que comprende:

- a) proporcionar polímeros de glucosa o sus hidrolizados;
- 15 b) detectar o dosificar facultativamente las moléculas proinflamatorias en los polímeros de glucosa o sus hidrolizados proporcionados en la etapa a);
- c) efectuar la o las etapas de producción o de purificación sobre los polímeros de glucosa o sus hidrolizados proporcionados en la etapa a);
- 20 d) detectar o dosificar las moléculas proinflamatorias en los polímeros de glucosa o sus hidrolizados obtenidos luego de la etapa c);
- e) determinar la eficacia o el impacto de la etapa c) sobre la presencia o la naturaleza de las moléculas proinflamatorias;

25 en el cual la etapa de detección o dosificación de las moléculas proinflamatorias en los polímeros de glucosa o sus hidrolizados comprende una prueba *in vitro* de respuesta inflamatoria empleando una línea celular, siendo la línea celular o bien un macrófago o una línea celular diferenciada a macrófagos, o bien una célula que exprese uno o varios receptores TLR (receptor tipo Toll) o NOD (proteínas que contienen un dominio de oligomerización de unión a nucleótidos) como TLR2, TLR4 o NOD2 y que permiten detectar las respuestas de o de los receptores, o bien de una combinación de éstas.

30 El método puede comprender, particularmente en el contexto de la etapa e), una comparación de las moléculas proinflamatorias de los polímeros de glucosa o sus hidrolizados detectadas o dosificadas en las etapas b) y d). De este modo, una disminución de la cantidad de moléculas proinflamatorias o de ciertas de esas moléculas, es indicativa de la eficacia de una etapa de producción o de purificación para la descontaminación de los polímeros de glucosa o de sus hidrolizados. La cantidad y la naturaleza de las moléculas proinflamatorias se determinarán por los métodos detallados a continuación.

35 El objetivo de este procedimiento es en particular, poner a punto un procedimiento optimizado de descontaminación de los polímeros de glucosa o de sus hidrolizados, en particular los polímeros de glucosa destinados a la preparación de una solución para diálisis peritoneal, donde ese procedimiento comprende preferentemente una detección o una dosificación de las moléculas proinflamatorias mediante una prueba de respuesta inflamatoria *in vitro*.

40 Especialmente, una vez caracterizado el impacto o la eficacia de las etapas de purificación o producción sobre las moléculas proinflamatorias, en particular siguiendo su presencia o su naturaleza, el experto es capaz de elegir las etapas más convenientes teniendo en cuenta las moléculas proinflamatorias presentes en los polímeros de glucosa o sus hidrolizados. De este modo, el procedimiento optimizado comprende:

- a) proporcionar polímeros de glucosa o sus hidrolizados;
- 45 b) detectar o dosificar las moléculas proinflamatorias en los polímeros de glucosa o sus hidrolizados proporcionados en la etapa a);
- c) seleccionar la o las etapas de producción o de purificación de los polímeros de glucosa o de sus hidrolizados adaptadas a las moléculas proinflamatorias presentes en los polímeros de glucosa o sus hidrolizados;
- 50 d) facultativamente, efectuar la o las etapas de producción o de purificación seleccionadas sobre los polímeros de glucosa o sus hidrolizados proporcionados en la etapa a); y

e) facultativamente, detectar o dosificar las moléculas proinflamatorias en los polímeros de glucosa o sus hidrolizados obtenidos luego de la etapa d);

en el cual la etapa de detección o dosificación de las moléculas proinflamatorias en los polímeros de glucosa o sus hidrolizados comprende una prueba *in vitro* de respuesta inflamatoria empleando una línea celular, siendo la línea celular o bien un macrófago o una línea celular diferenciada a macrófagos, o bien una célula que exprese uno o varios receptores TLR (receptor tipo Toll) o NOD (proteínas que contienen un dominio de oligomerización de unión a nucleótidos) como TLR2, TLR4 o NOD2 y que permiten detectar las respuestas del o de los receptores, o bien de una combinación de éstas.

Los polímeros de glucosa o sus hidrolizados pueden estar destinados a la diálisis peritoneal, la nutrición enteral y parenteral, y la alimentación de recién nacidos.

En un aspecto preferido, los polímeros de glucosa, que se prepararán en el marco de la presente descripción, son la icodextrina o maltodextrinas (ramificadas o no, como se describe más adelante).

Los hidrolizados de los polímeros de glucosa que se tratan en este documento se refieren en particular al producto de la hidrólisis total como el monohidrato de dextrosa apirógeno, comercializado bajo la marca LYCADEX® PF por la sociedad solicitante.

Se pueden descontaminar en una o varias fases de su preparación, y particularmente a nivel de la materia prima, en una etapa cualquiera de su procedimiento de preparación y/o a nivel del producto final del procedimiento.

Así, los polímeros de glucosa o sus hidrolizados proporcionados en los procedimientos según la presente descripción corresponden a la materia prima, al producto a un nivel cualquiera del procedimiento de preparación o al producto final.

Los contaminantes proinflamatorios son sobre todo moléculas de origen bacteriano. Pueden ser en particular PGN, LPS, lipopéptidos, productos de la despolimerización de los PGN, especialmente el MDP, los péptidos microbianos formilados como el f-MLP, β glucanos, etc...

Los métodos de medición de las respuestas inflamatorias *in vitro* que se utilizan en el marco de la presente descripción para seguir la eficacia de las etapas de descontaminación de los procedimientos de preparación de polímeros de glucosa de uso terapéutico humano (por ej. soluciones de diálisis peritoneal) se basan en pruebas celulares («*bioensayos*») que utilizan líneas de tipo monocitos/macrófagos (THP-1 y/o Raw-Blue™) y líneas transfectadas que expresan un receptor específico de la inmunidad natural (HEK-Blue™).

La línea THP-1 (88081201, ECACC) es una línea humana promonocitaria. Para las pruebas de respuesta proinflamatoria, las células se diferencian en monocitos/macrófagos durante 3 días en presencia de éster de forbol (PMA).

Para las pruebas empleadas según la presente descripción, los macrófagos o las células diferenciadas a macrófagos, especialmente las células THP-1 diferenciadas a macrófagos, se sensibilizan en presencia de MDP, en particular el MDP de *S. aureus*. En efecto, el MDP es un inductor inflamatorio pobre, pero es conocido por actuar sinérgicamente con otras moléculas inflamatorias. Esa propiedad se basa en el hecho de que esas moléculas actúan a través de la intermediación de receptores diferentes del receptor del MDP, fundamentalmente los TLR. Por consiguiente, la presencia de MDP va a exacerbar la respuesta inflamatoria inducida por los contaminantes presentes en las soluciones de polímeros de glucosa o de sus hidrolizados, permitiendo así detectar dosis bajas de contaminantes. Preferentemente, el MDP se agrega a una muestra a una concentración de más de 1 $\mu\text{g/mL}$, preferentemente a una concentración comprendida entre 1 y 100 $\mu\text{g/mL}$. En un aspecto muy particularmente preferido, el MDP se agrega a la muestra a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$.

De manera alternativa, los macrófagos o las células diferenciadas a macrófagos, particularmente las células THP-1 diferenciadas a macrófagos, pueden ser sensibilizadas en presencia de otras moléculas distintas del MDP. En efecto, el LPS, en particular un LPS de *E. coli*, también puede ser utilizado. Se puede agregar a la muestra a una concentración de al menos 10 pg/ml, por ejemplo una concentración de 25 pg/mL.

En un aspecto preferido los macrófagos o las células diferenciadas a macrófagos, fundamentalmente las células THP-1 diferenciadas a macrófagos, se emplean a una densidad comprendida entre 0,5 y 1 x 10⁶ células/mL de medio de cultivo, preferentemente comprendida entre 0,7 y 0,8 x 10⁶ células/mL, y de manera aún más preferida de alrededor de 0,75 x 10⁶ células/mL.

La prueba de respuesta inflamatoria *in vitro* se basa en la medición de la producción de RANTES por las células THP-1 sensibilizadas. En efecto, los estudios anteriores han demostrado que la dosificación de esta quimiocina está adaptada para detectar dosis bajas de contaminantes, particularmente las endotoxinas, en las soluciones de polímeros de glucosa. De manera alternativa, la prueba de respuesta inflamatoria *in vitro* puede asimismo basarse en la medición de la producción de TNF- α por las células THP-1 sensibilizadas. Las dosificaciones de las citocinas se pueden llevar a cabo por cualquier medio conocido por los expertos, especialmente por ELISA. En un aspecto

preferido, la prueba comprende la medición de la producción de TNF- α después de 8 h de estimulación. En otro aspecto preferido, la prueba comprende la medición de la producción de RANTES después de 20 h de estimulación, especialmente mediante la dosificación por ELISA.

5 Esa primera prueba permite detectar en particular la contaminación de los polímeros de glucosa o de sus hidrolizados con los PGN y/o los LPS, preferentemente con los PGN de tamaño mediano (particularmente de alrededor de 120 kDa) y/o los LPS, más particularmente aún por los LPS.

10 La línea Raw-Blue™ es una línea de macrófagos de ratón transfectada con un gen reportero que produce una forma secretada de la fosfatasa alcalina (SEAP: *fosfatasa alcalina embrionica secretada*), cuya transcripción está bajo la dependencia directa de las vías de señalización inflamatorias. La ventaja de esta línea es que expresa de manera natural la casi totalidad de los receptores de la inmunidad innata, por lo tanto los receptores TLR2, TLR4 y NOD2. De este modo, esas células responderán a la mayoría de los contaminantes inflamatorios, y la respuesta se seguirá por medición de la actividad enzimática de la SEAP producida. Preferentemente, esta línea se utiliza en la prueba a una densidad celular de alrededor de $0,5 \times 10^6$ células/pocillo. La puesta en contacto de la preparación de polímeros de glucosa o de sus hidrolizados con las células dura alrededor de 16 a 24 h.

15 Las líneas celulares, especialmente HEK-Blue™ (InvivoGen), son líneas modificadas por transfección estable con un vector que codifica un receptor de la inmunidad innata, en particular de los receptores humanos (h). Ellas también son cotransfectadas con el gen reportero, especialmente un gen reportero que produce la SEAP, cuya síntesis está bajo la dependencia directa de la vía de señalización asociada al receptor sobreexpresado. De manera preferida, ese gen reportero codifica una proteína coloreada o fluorescente o una proteína cuya actividad se puede medir con o sin sustrato. La detección de la actividad o de la señal del gen reportero indica que la muestra contiene contaminantes susceptibles de activar un receptor o los receptores de la inmunidad innata y de desencadenar una reacción inflamatoria. La utilización de esas líneas permite orientarse a ciertas familias de moléculas de origen microbiano en función del receptor expresado. Preferentemente, se utilizan las líneas celulares que expresan o bien hTLR2, o bien hTLR4, o bien hNOD2. Además, también se utiliza una línea de control que no expresa ningún receptor de la inmunidad innata. El uso de esta línea de control es útil para verificar que las soluciones de polímeros de glucosa o de sus hidrolizados no inducen la producción del gen reportero por un mecanismo parásito, como un mecanismo de toxicidad.

Para las pruebas según la presente descripción, se utilizan preferentemente cuatro líneas:

- 30 - línea HEK-Blue™ hTLR2: esta línea que expresa el receptor hTLR2 responde específicamente a los agonistas de TLR2 (sobre todo PGN y lipopéptidos). Su utilización permite por lo tanto conocer el nivel de esos contaminantes en el desencadenamiento de las respuestas inflamatorias,
- línea HEK-Blue™ hTLR4: esta línea que expresa el receptor hTLR4 responde específicamente a los LPS. Su utilización permite por lo tanto conocer el nivel de esos contaminantes en el desencadenamiento de las respuestas inflamatorias,
- 35 - línea HEK-Blue™ hNOD2: esta línea que expresa el receptor hNOD2 responde específicamente a los agonistas de NOD2. Su utilización permite por lo tanto conocer el nivel de MDP y moléculas relacionadas en el desencadenamiento de las respuestas inflamatorias,
- línea HEK-Blue™ Null2: se trata de una línea de control, no transfectada por un receptor de la inmunidad. Su uso es necesario para verificar que las soluciones de polímeros de glucosa o de sus hidrolizados no inducen la producción de la SEAP por un mecanismo de toxicidad.

40 Sin embargo, cabe destacar que el experto puede utilizar igualmente otras líneas comerciales (Imgenex) o puede prepararlas.

45 En un aspecto preferido, las líneas celulares se emplean a una densidad comprendida entre $0,5$ a 1×10^6 células/mL del medio de cultivo, y la puesta en contacto de la preparación de polímeros de glucosa o sus hidrolizados con las células dura alrededor de 16 a 24 h.

50 Se puede realizar una cuantificación de los contaminantes con ayuda de una curva dosis-respuesta. Esta curva dosis-respuesta se puede realizar en particular con las mismas células, en las mismas condiciones, con dosis crecientes de contaminantes. Las curvas dosis-respuesta se realizan en particular con estándares de LPS, PGN, lipopéptidos, β -glucanos y MDP. Preferentemente, una curva dosis-respuesta de ese tipo puede ser realizada para las células que expresan TLR4 (por ejemplo, THP-1, HEK-Blue™ hTLR4 y Raw-Blue™) con dosis crecientes de LPS, para las células que expresan TLR2 (por ejemplo, THP-1, HEK-Blue™ hTLR2 y Raw-Blue™) con dosis crecientes de PGN, y para las células reactivas a través de NOD2 (por ejemplo, HEK-Blue™ hNOD2) con dosis crecientes de MDP.

55 En aspectos particulares, las líneas THP-1, Raw-Blue™ y HEK-Blue™ se incuban con concentraciones crecientes de los estándares, y la respuesta celular se mide mediante cuantificación de la producción de RANTES por ELISA

para la línea THP-1 y medición del gen reportero, particularmente de la actividad enzimática de la SEAP, para las líneas Raw-Blue™ y HEK-Blue™.

La prueba según la presente descripción permite identificar el o los contaminantes susceptibles de desencadenar una reacción inflamatoria. De este modo, la línea que expresa NOD2, en particular HEK-Blue™ hNOD2, permite muy particularmente detectar una contaminación con productos de la despolimerización del PGN y el MDP, preferentemente el MDP. La línea que expresa TLR2, en particular HEK-Blue™ hTLR2 y/o Raw-Blue™, permite muy particularmente detectar una contaminación con los PGN. Además, los macrófagos, en particular los macrófagos de THP-1, y la línea que expresa TLR4, en particular HEK-Blue™ hTLR4, permite muy particularmente detectar una contaminación con los LPS.

5 En un aspecto preferido, la prueba *in vitro* de respuesta inflamatoria incluye pruebas con las líneas celulares siguientes:

- los macrófagos, en particular los macrófagos de THP-1, una línea celular que permite detectar la actividad de un receptor TLR2, especialmente la línea HEK-Blue™ hTLR2, una línea celular que permite detectar la actividad de un receptor TLR4, especialmente la línea HEK-Blue™ hTLR4, una línea celular que permite 15 detectar la actividad de un receptor NOD2, especialmente la línea HEK-Blue™ hNOD2, y facultativamente pero de preferencia, una línea de control, especialmente la línea HEK-Blue™ Null2; o
- una línea de macrófagos transfectados con un gen reportero, especialmente la línea Raw-Blue™, una línea celular que permite detectar la actividad de un receptor TLR2, especialmente la línea HEK-Blue™ hTLR2, una línea celular que permite detectar la actividad de un receptor TLR4, especialmente la línea HEK-Blue™ hTLR4, 20 una línea celular que permite en detectar la actividad de un receptor NOD2, especialmente la línea HEK-Blue™ hNOD2, y facultativamente pero de preferencia, una línea de control, especialmente la línea HEK-Blue™ Null2.

En el aspecto preferido, la presencia de contaminantes en las diferentes muestras se analiza empleando los cinco tipos celulares presentes más adelante, de manera de tener un panorama de la respuesta inflamatoria general, así como de las respuestas específicas a ciertos contaminantes:

- 25 - Línea THP-1 sensibilizada con el MDP: todos contaminantes con fuerte reactividad para los LPS,
- Línea Raw-Blue™: todos contaminantes con fuerte reactividad para los PGN,
- Línea HEK-Blue™ hTLR2 PGN y otros ligandos de TLR2 (lipopolipéptidos...),
- Línea HEK-Blue™ hTLR4: LPS,
- Línea HEK-Blue™ hNOD2: MDP y productos de despolimerización de los PGN,
- 30 - Línea HEK-Blue™ Null2: control negativo.

En el procedimiento según la presente descripción, la o las etapas de producción o de purificación se pueden elegir entre etapas de tratamiento térmico, de acidificación, de pasaje sobre carbón activado, de pasaje sobre resinas de adsorción, de ultrafiltración, de filtración, de hidrólisis química o enzimática, o de combinaciones de éstas. Se pueden probar diferentes parámetros para cada etapa, lo que permite seleccionar los más eficaces. Por ejemplo, en 35 el caso de un pasaje sobre carbón activado, se pueden probar diferentes calidades de carbón activado y combinaciones de éstas. En el caso de una ultrafiltración, se podrán probar diferentes umbrales de corte y/o combinarlos. En el caso de un tratamiento térmico, se podrá hacer variar la temperatura y la duración del tratamiento. En el caso de un tratamiento enzimático, se podrá hacer variar la o las enzimas utilizadas, su concentración y las condiciones de tratamiento.

40 En un aspecto muy particular, los tratamientos se realizan sobre muestras preparadas al 32% (peso/volumen) en agua apirógena (*p.p.i.*), y luego las soluciones se filtran con filtro de 0,22 µm. Para las pruebas celulares, las muestras se diluyen al 1/10 en el medio de cultivo de las células (concentración final: 3,2% (p/v)).

Las muestras de polímeros de glucosa o sus hidrolizados se pueden someter además a tratamientos enzimáticos o químicos o etapas de filtración, previamente a la prueba de detección o dosificación de las moléculas proinflamatorias. Facultativamente, se pueden comparar los resultados obtenidos antes y después de esas etapas 45 de tratamiento o de filtración.

De ese modo, una muestra de polímeros de glucosa o de sus hidrolizados puede ser tratada por una mutanolisina previamente a la prueba. Esta enzima, por su actividad de muramidasa, es capaz de despolimerizar los PGN. Por ejemplo, la enzima a una concentración de alrededor de 2500 U/ml se puede poner en presencia de la muestra, eventualmente diluida para tener una concentración en polímero de glucosa de 7,5 a 37,5% (peso/volumen), durante 50 6 a 16 h, preferentemente alrededor de 16 h. A continuación, la muestra así tratada se someterá a la prueba con una o más líneas celulares según la presente descripción.

Alternativamente, la muestra de la preparación de polímeros de glucosa o de sus hidrolizados se puede filtrar previamente a la prueba. El objetivo de esta filtración es fundamentalmente separar las moléculas de alto peso molecular, como los PGN de alto peso molecular, y proceder a la prueba sobre el filtrado para analizar muy particularmente los contaminantes de tamaño pequeño. El umbral de corte para la filtración puede estar comprendido por ejemplo entre 30 kD y 150 kD, preferentemente entre 30 y 100 kD o entre 30 y 50 kD, y particularmente ser de alrededor de 30 kD. En un aspecto preferido, las pruebas celulares se realizan sobre las fracciones obtenidas por ultrafiltración, especialmente con umbrales de corte de 30 y 100 kDa. Preferentemente, la filtración se lleva a cabo por una ultrafiltración. Asimismo se puede realizar por cualquier medio conocido por el experto. De esta manera, la muestra así filtrada, el filtrado, se someterá a las pruebas celulares según la presente descripción. La comparación de los resultados obtenidos sin filtración o antes de ésta, permitirá deducir la contribución inflamatoria específica de las moléculas de tamaño pequeño. Además, eso permite verificar si las etapas de producción o de purificación modifican el tamaño de los contaminantes (hidrólisis *versus* agregación), y/o no eliminan ciertos contaminantes de tamaño definido.

Por otra parte, el tratamiento de las muestras por la lisozima y/o la β -glucanasa permite eliminar al PGN y/o los β -glucanos, y conocer así la importancia de otros agonistas del TLR2 que pueden estar presentes en lotes contaminados (glucolípidos y lipopéptidos).

En un aspecto preferido de los procedimientos según la presente descripción, se realiza una primera serie de pruebas celulares sobre muestras sin filtrar, de manera de medir las respuestas sin tener en cuenta el tamaño de las moléculas y de conservar los posibles efectos sinérgicos entre esas moléculas. Luego en una segunda serie, se realizan las pruebas celulares sobre las fracciones obtenidas por la ultrafiltración (umbral de corte: 30 y 100 kDa), de manera de verificar si los tratamientos modifican el tamaño de los contaminantes (hidrólisis *versus* agregación), y/o no eliminan ciertos contaminantes de tamaño definido.

Para ilustrar el procedimiento de la invención, se realizan diferentes etapas de descontaminación sobre diferentes matrices de polímeros de glucosa distintos y un lote de hidrolizado de polímero de glucosa:

- 25 - polímeros de glucosa, materias primas de la icodextrina (antes del fraccionamiento cromatográfico según la enseñanza de la patente EP 667.356),
- un lote de icodextrina,
- un lote de maltodextrina ramificada, comercializado por la sociedad solicitante con el nombre de marca NUTRIOSE® FB06,
- 30 - un lote de monohidrato de dextrosa preparado para ser acondicionado en solución inyectable comercializado por la sociedad solicitante con el nombre de marca LYCADEX® PF,
- un lote de polímeros solubles de glucosa altamente ramificados preparado según la enseñanza de la solicitud de patente internacional WO 2007/099212 de la cual es titular la sociedad solicitante,
- una maltodextrina comercial.

35 Los tratamientos elegidos son:

- térmico, por ejemplo:
 - o 70 °C y/o
 - o 120 °C,
- acidificación,
- 40 - pasaje sobre carbón activado de diversas calidades, por ejemplo:
 - o SX+ de la sociedad NORIT
 - o SX2 de la sociedad NORIT,
 - o C EXTRA USP de la sociedad NORIT,
 - o A SUPRA EUR de la sociedad NORIT,
 - 45 o ENO-PC de la sociedad CECA,
 - o L4S de la sociedad CECA,
 - o L3S de la sociedad CECA,

- CSA de la sociedad CECA,
- pasaje sobre resina de adsorción,
 - Amberlite XAD-4 de la sociedad Rohm & Haas,
 - Amberlite XAD-761 de la sociedad Rohm & Haas,
 - 5 ○ Amberlite XAD-1600 de la sociedad Rohm & Haas,
 - Amberlite XAD-16 HP (= FPX66) de la sociedad Dow,
 - Dowex SD2 de la sociedad Dow,
 - Macronet MN-100 de la sociedad Purolite,
 - Macronet MN-150 de la sociedad Purolite,
- 10 - ultrafiltración con un umbral de corte diferente, por ejemplo
 - 5 kDa;
 - 30 kDa;
- hidrólisis enzimática empleando enzimas específicas, por ejemplo:
 - β 1-3 glucanasa
 - 15 ○ proteasas,
 - preparaciones enzimáticas con actividad de manasa (por ejemplo la Mannaway®, comercializada por la sociedad NOVOZYMES, utilizado por sus propiedades detergentes y de clarificación).
 - preparaciones enzimáticas con actividad de endo-beta-glucanasa (por ejemplo la SEBflo® TL, producida por la sociedad Specialty Enzymes and Biotechnologies Co. y comercializada por
 - 20 Advances Enzymes Technologies Ltd.)
 - preparaciones enzimáticas con actividad de proteasa ácida (por ejemplo la SEBPrI® FL100, producida por la sociedad Specialty Enzymes and Biotechnologies Co. y comercializada por Advances Enzymes Technologies Ltd.)

La invención se comprenderá mejor con la ayuda de los ejemplos siguientes, los cuales se pretenden ilustrativos.

25 **Breve descripción de las figuras**

- Figura 1: Respuesta de las células Raw-Blue™ a los agonistas estándares.
- Figura 2: Respuestas de las células HEK-Blue™ TLR2 a los agonistas estándares.
- Figura 3: Respuestas de las células HEK-Blue™ TLR4 a los agonistas estándares.
- 30 Figura 4: Respuestas de las células HEK-Blue™ NOD2 a los agonistas estándares.
- Figura 5: Respuestas de las células HEK-Blue™ Null a los agonistas estándares.
- Figura 6: Respuestas de las células Raw-Blue™ inducidas por las matrices sin filtrar y luego del pasaje por filtros con 100 kDa y 30 kDa.
- 35 Figura 7: Respuestas de las células HEK-Blue™ TLR2 inducidas por las matrices sin filtrar y luego del pasaje por filtros con 100 kDa y 30 kDa.
- Figura 8: Respuestas de las células HEK-Blue™ TLR4 inducidas por las matrices sin filtrar y luego del pasaje por filtros con 100 kDa y 30 kDa.
- Figura 9: Respuestas de las células HEK-Blue™ NOD2 inducidas por las matrices sin filtrar y luego del pasaje por filtros con 100 kDa y 30 kDa.
- 40 Figura 10: Respuestas de las células HEK-Blue™ Null inducidas por las matrices.
- Figura 11: Evaluación de las actividades inflamatorias de las diferentes matrices

Figura 12: Respuestas celulares inducidas por las matrices luego del pasaje sobre carbón SX+.

Figura 13: Respuestas celulares inducidas por la matriz E3063 luego del pasaje sobre diferentes carbones.

Figura 14: Respuestas celulares inducidas por la matriz E1565 luego del pasaje sobre diferentes carbones.

Figura 15: Respuestas celulares inducidas por la matriz E1242 luego del pasaje sobre diferentes carbones.

5 Figura 16: Respuestas celulares inducidas por la matriz Lab3943 luego del pasaje sobre diferentes carbones.

Figura 17: Respuestas celulares inducidas por la matriz E1565 luego del tratamiento por ultrafiltración con 5 kDa.

Figura 18: Respuestas celulares inducidas por la matriz Lab3943 luego del tratamiento por ultrafiltración con 5 kDa.

10 Figura 19: Respuestas celulares inducidas por las matrices E3063 y E5250 luego del tratamiento por la Mannaway®.

Figura 20: Respuestas celulares inducidas por la matriz E5250 luego del tratamiento por la SEBflo®TL.

Figura 21: Respuestas celulares inducidas por la matriz E30630 luego del tratamiento por la SEBPro®FL100.

Figura 22: Respuestas celulares inducidas por la matriz E1565 luego del tratamiento por resinas industriales.

15 Ejemplos

Ejemplo 1: Establecimiento de las curvas dosis-respuesta

Las curvas dosis-respuesta se realizan con moléculas agonistas estándares: LPS, PGN, LTA, zymosan y MDP. Las líneas Raw-Blue™ y HEK-Blue™ TLR2, TLR4, NOD2 y Null se incuban con concentraciones crecientes de agonistas, y la respuesta celular se mide por cuantificación de la actividad de la SEAP (Figuras 1-5). El TNF-α se utiliza como control positivo de la activación de las células:

- Línea Raw-Blue™: las células responden a las moléculas inflamatorias principales susceptibles de estar presentes en las matrices y derivadas de polímeros de glucosa (PGN, LPS, zymosan, LTA); tienen especialmente una fuerte reactividad frente a los PGN, pero no responden a sus productos de despolimerización (MDP).
- 25 - Línea HEK-Blue™ hTLR2: fuerte reactividad frente a los PGN; las células responden más débilmente a los otros ligandos de TLR2 (LTA, zymosan) y no muestran ninguna reactividad frente a los LPS y al MDP,
- Línea HEK-Blue™ hTLR4: fuerte reactividad frente a los LPS; las células responden muy débilmente al zymosan y no muestran ninguna reactividad frente a los PGN, LTA y MDP,
- Línea HEK-Blue™ hNOD2: fuerte reactividad frente a MDP,
- 30 - Línea HEK-Blue™ Null2: control de ausencia de toxicidad celular.

Ejemplo 2: Preparación de las diferentes matrices de polímeros de glucosa distintos y de un lote de hidrolizado de polímero de glucosa

Como se indica a continuación, las matrices son las siguientes:

- 35 - 5 polímeros de glucosa, materias primas de la icodextrina (antes del fraccionamiento cromatográfico según la enseñanza de la patente EP 667.356), a los que se hace referencia en este documento como E1565, E3063, E1242, E5248 y E5250.

La preparación de esos cinco polímeros se realiza de conformidad con las enseñanzas de la solicitud de patente WO 2012/059685.

- 40 - un lote de icodextrina contaminado (al que se hace referencia aquí como E209J) y un lote de icodextrina "estándar", es decir control de no contaminación en las pruebas celulares (al que se hace referencia aquí como P11-11). Esos lotes se preparan según la enseñanza de la patente EP 667.356, detallada en el ejemplo 1 de la solicitud de patente WO 2010/125315.
- un lote de maltodextrina ramificada, comercializado por la sociedad solicitante con el nombre de marca NUTRIOSE® FB06.

- un lote de monohidrato de dextrosa preparado para ser acondicionado en solución inyectable comercializado por la sociedad solicitante con el nombre de marca LYCADEX® PF,
- un lote de polímeros solubles de glucosa altamente ramificados destinado a la diálisis peritoneal, al que se hace referencia aquí como LAB3943.

5 Ese lote se prepara por el doble tratamiento enzimático de enzima de ramificación y amiloglucosidasa según el ejemplo 2 de la solicitud de patente WO 2007/099212.

- Una maltodextrina comercial (maltodextrina Cargill, C*Dry MD 01915, lote 02044770), a la que se hace referencia aquí como Cargill.

10 Ejemplo 3: Análisis de las respuestas celulares inducidas por las muestras sin tratar o luego del pasaje por filtro con 100 kDa o 30 kDa

El objetivo de esos ensayos es determinar la reactividad proinflamatoria y la naturaleza de los contaminantes presentes en las matrices de polímero de glucosa y el lote de hidrolizado de polímero de glucosa.

Las muestras según el ejemplo 2 se preparan al 32% (peso/volumen) en agua apirógena (*p.p.i.*).

15 Las dosificaciones de los niveles de LPS y de PGN se realizaron previamente a las pruebas celulares utilizando las dosificaciones SLP-HS y LAL (los datos se presentan a continuación):

		P11-11	E1242	E1565	E3063	E5250	Lab 3943	Ico E209J	Cargill	NUTRIOSE®	LYCADEX®
PGN (ng/g)	SLP-HS	< 3	21	2320	16185	4496	1263	393	2478	315	< 2
LPS (EU/g)	LAL	< 0,3	2,4	38,4	2,4	19,2	153,6	0,6	9,6	> 300	< 0,15
LPS (EU/g)	LAL modificado	< 0,3	1,2	4,8	1,2	< 0,3	153,6	< 0,3	< 0,3	> 300	/

Para las pruebas celulares, las muestras se diluyen al 1/10 en el medio de cultivo de las células (concentración final: 3,2% (p/v)).

20 Los análisis se realizan en:

- Línea Raw-Blue™: todos contaminantes con reactividad elevada para los PGN,
- Línea HEK-Blue™ hTLR2: reactividad elevada para los PGN,
- Línea HEK-Blue™ hTLR4: reactividad elevada para los LPS,
- Línea HEK-Blue™ hNOD2: MDP y productos de despolimerización de los PGN,

25 - Línea HEK-Blue™ Null2: control de ausencia de toxicidad celular.

Los resultados por tipo celular se presentan en las figuras 6 a 10.

Respuestas de las células Raws (Figura 6):

30 A excepción de la matriz Cargill, que da una respuesta equivalente a la observada en presencia del control de no contaminación P11-11, todas las otras muestras desencadenan una respuesta inflamatoria al contacto con la línea de macrófagos. Las matrices más reactivas son E-3063 (saturación de la respuesta de las células), y luego E-1242 y E-1565.

35 Los contaminantes son esencialmente moléculas de alto peso molecular (por ejemplo, PGN, zymosan) o capaces de formar agregados (por ejemplo, LPS, LTA). En efecto, la filtración con 100 kDa reduce fuertemente las respuestas inducidas por las muestras, lo que indica que ese tratamiento las ha eliminado en gran parte. Sólo las matrices E-1242 y E-5250 tienen una actividad significativamente superior a la de P11-11, lo que indica que contienen contaminantes de tamaño < 100 kDa, que provienen probablemente de la degradación de contaminantes más

grandes. La filtración con 30 kDa es todavía más eficaz porque las diferentes muestras pierden la casi totalidad de su actividad proinflamatoria luego del tratamiento.

Respuestas de las células HEK-TLR2 (Figura 7):

Los resultados obtenidos con las células HEK-TLR2 confirman los resultados precedentes.

- 5 La matriz E-3063 induce una respuesta saturada, lo que indica un índice de contaminación muy elevado en inductores de TLR2. Las matrices E-1242, E-1565, Lab3943 e Ico-E209J también dan respuestas elevadas, más importantes que las observadas en las células Raws. Esta diferencia se explica por el hecho de que están cargadas de inductores fuertes de TLR2 (PGN o lipopéptidos).

- 10 Las filtraciones con 100 kDa y con 30 kDa neutralizan las respuestas inflamatorias inducidas por esas muestras, lo que indica que los contaminantes son mayoritariamente PGN de alto peso molecular. Por otra parte, las matrices E-3063 y E-1565 presentan todavía una actividad significativa luego de la filtración. Esos datos muestran que esos compuestos contienen productos de degradación de los PGN y/o de los lipopéptidos. En efecto, contrariamente a los PGN, los otros inductores fuertes de TLR2 tienen una masa < 30 kDa y darán todavía por lo tanto una respuesta celular luego de la filtración.

- 15 Las matrices E-5250, E-5248 y la NUTRIOSE® dan respuestas débiles, de intensidad equivalente a la observada con las células Raws, lo que sugiere que esas tres muestras contienen inductores débiles de TLR2 (por ejemplo, zymosan, β-glucanos o LTA).

Como precedentemente, la matriz Cargill y el LYCADEX® no desencadenan respuestas, lo que indica la ausencia de contaminantes inductores de TLR2.

20 Respuestas de las células HEK-TLR4 (Figura 8):

Las matrices E1565, E3063, Lab3943, Cargill y NUTRIOSE® desencadenan una respuesta de intensidad media en las células HEK-TLR4, lo que confirma la presencia de LPS. Las filtraciones reducen en parte las respuestas de las células, lo que se explica por el hecho de que el LPS puede formar agregados, y que sólo las moléculas no agregadas han sido eliminadas.

- 25 Las matrices E1242, IcoE209J, E5248, E5250 y el LYCADEX® no desencadenan una respuesta significativa, lo que indica que los niveles de LPS están por debajo de los umbrales susceptibles de desencadenar una respuesta inflamatoria. Las dos primeras matrices dan una respuesta inflamatoria en las células Raws, lo que se correlaciona con una fuerte reactividad en las células HEK-TLR2. Esos datos indican que esas dos matrices están esencialmente contaminadas por PGN. Las matrices E5248, E5250 y el LYCADEX® desencadenan asimismo una respuesta inflamatoria en las células Raws. No obstante, sólo son poco activas o no son activas frente a TLR2, lo que muestra la presencia de contaminantes diferentes de los PGN y los LPS en esas tres muestras.

30 Respuestas de las células HEK-NOD2 (Figura 9):

Las células HEK-NOD2 responden a todas las muestras, pero sólo las matrices E-1565, Lab3943 y Cargill están fuertemente cargadas de inductores de NOD2. Ese receptor reacciona al producto final de la despolimerización de los PGN (MDP), pero también a sus productos de degradación de poca masa molecular. Por consiguiente, la intensidad de las respuestas observadas indica que las muestras están y/o estuvieron contaminadas por PGN que sufrieron un proceso de degradación más o menos avanzado. Como cabe esperar, las filtraciones con 100 y 30 kDa no tienen efectos significativos sobre la respuesta de las células, puesto que los compuestos incriminados (MDP y PGN degradados) son de tamaño pequeño.

40 Respuestas de las células HEK-Null (Figura 10):

Finalmente, las células HEK-Null no dan respuestas significativas en presencia de las diferentes muestras, prueba de que las actividades observadas en las otras líneas celulares no están ligadas a un efecto tóxico, sino más bien a una respuesta de tipo inflamatorio.

Evaluación por muestra (Figura 11):

- 45
- E1242: actividad inflamatoria de intensidad media, ligada a una fuerte contaminación con PGN poco degradados.
 - E1565: actividad inflamatoria de intensidad media, ligada a una fuerte contaminación con PGN parcialmente degradados y a la presencia de LPS.
- 50
- E3063: actividad inflamatoria de intensidad elevada, ligada a una fuerte contaminación con PGN poco degradados y a trazas de LPS.

- E5248: actividad inflamatoria de poca intensidad, ligada a una escasa contaminación con PGN y a la presencia de moléculas inflamatorias distintas de PGN y LPS.
- E5250: actividad inflamatoria de poca intensidad, ligada a una escasa contaminación con PGN y a la presencia de moléculas inflamatorias distintas de PGN y LPS.
- 5 - Lab3943: actividad inflamatoria de intensidad media, ligada a contaminaciones medias con PGN parcialmente degradados y con LPS.
- IcoE209J: actividad inflamatoria de intensidad media, ligada a una fuerte contaminación con PGN poco degradado.
- Cargill: ausencia de actividad inflamatoria detectable, pero presencia de productos de degradación de los PGN.
- 10 - NUTRIOSE®: actividad inflamatoria de intensidad media, ligada a trazas de PGN parcialmente degradados y a una contaminación media con LPS.
- LYCADEX®: actividad inflamatoria de poca intensidad, ligada a una escasa contaminación con productos de degradación de los PGN y a la presencia de moléculas inflamatorias distintas de PGN y LPS.

Ejemplo 4: Efecto de los tratamientos por pasajes sobre carbones activados.

- 15 En una primera serie de experiencias, todas las muestras se sometieron a dos tratamientos sucesivos con el mismo carbón (1% de carbón NORIT SX+, a 80 °C durante 1 h).

La figura 12 presenta los resultados obtenidos por línea celular.

- 20 El primer tratamiento con carbón disminuye de manera drástica la capacidad de las muestras E1242, E-565, E3063 e IcoE209J para desencadenar una respuesta inflamatoria en las células Raws y HEK-TLR2. En todos los casos, el segundo tratamiento mejora aún más la eliminación de las moléculas responsables de la respuesta inflamatoria. El efecto del tratamiento es mucho menos marcado para las muestras E5248, E5250, Lab3943 y el NUTRIOSE®. Esos datos indican que el tratamiento con carbón SX+ sería eficaz para eliminar los PGN poco degradados, reduciendo así la actividad inflamatoria de las matrices para las cuales esos contaminantes son mayoritarios.

- 25 Para las células HEK-TLR4, la respuesta es bien disminuida por las matrices E1565, Lab3943 y NUTRIOSE®, que son las más contaminadas con LPS. No obstante, el efecto no es tan marcado como para las respuestas atribuidas a los PGN, lo que muestra una cinética específica para el LPS.

Los tratamientos con carbón SX+ tienen poco efecto sobre la respuesta de las células HEK-NOD2, lo que indica que los productos de degradación del PGN no son eliminados correctamente. Finalmente, las células HEK-Null no son reactivas a las muestras tratadas, lo que excluye todo efecto tóxico ligado al carbón.

- 30 Las diferencias observadas después del tratamiento por pasajes sobre carbón activado eran esperables, puesto que las pruebas precedentes muestran que las muestras contienen contaminantes de naturaleza molecular diferente. Una información importante aportada por esta experiencia es la evidencia de una diferente eficacia en función del tamaño de los contaminantes. Así, el tratamiento con el carbón SX+ tendría un efecto más marcado sobre la eliminación de una cierta categoría de contaminantes, particularmente los PGN de alto peso molecular.

- 35 Para confirmar esta hipótesis, se probaron varios carbones de porosidad diferente con respecto a su eficacia para descontaminar las matrices E3063, E1565, E1242 y Lab3943.

Contrariamente a las matrices E3063 y E1242 que están contaminadas mayoritariamente con PGN de gran tamaño (respuesta fuerte TLR2), las matrices E1565 y Lab3943 contienen PGN parcialmente degradados (respuestas TLR2 y NOD2) y LPS (respuesta TLR4).

- 40 Las condiciones de tratamiento optimizadas son las siguientes: carbón al 0,5%, pH ajustado a 4,5, incubación durante 1 h a 80 °C. Luego del tratamiento las muestras se filtran por un filtro de 0,22 µm y después se utilizan en las pruebas celulares.

Los resultados para la matriz E3063 se presentan en la figura 13.

La ausencia de respuesta en las células HEK-Null confirma que ninguno de los carbones presenta toxicidad celular.

- 45 Todos los carbones probados son eficaces para reducir drásticamente las respuestas de las células Raws y HEK-TLR2, lo que testimonia su eficacia para eliminar los PGN grandes, principales contaminantes de esta matriz.

Se observa que los nuevos carbones son equivalentes o más eficaces que el SX+.

De este modo, las muestras tratadas por L4S, L3S, ENO-PC, C-extra USP y SX2 inducen respuestas celulares próximas al ruido de fondo en las células HEK-TLR2, lo que sugiere que esos carbones son más eficaces para eliminar los PGN.

5 Con respecto a los carbones menos eficaces, la filtración con 30 kDa y 100 kDa reduce las respuestas residuales luego del tratamiento, prueba de que se debían fundamentalmente a trazas de PGN no eliminadas.

Los mismos resultados se observan en las células Raws, a excepción de L4S, que parece menos eficaz, y de A-Supra-Eur, que al contrario se muestra más eficaz que en las células HEK-TLR2. Este último carbón podría por lo tanto tener un espectro de acción más amplio y eliminar las otras moléculas, como los LPS.

10 Incluso si los carbones disminuyen de manera significativa la reactividad de las células HEK-NOD2 y HEK-TLR4 frente a la matriz E3063, es difícil distinguir diferencias de eficacia entre los tratamientos, en razón de la escasa amplitud de las respuestas inducidas por esta matriz en los dos tipos celulares.

Los resultados para la matriz E1565 se presentan en la figura 14.

15 Como para la matriz E3063, los mismos carbones son eficaces para reducir las respuestas de las células HEK-TLR2 y Raws inducidas por E1565. no obstante, se pueden observar algunas diferencias menores, probablemente debidas a diferencias de tamaño y por lo tanto de propiedades de los PGN.

20 La casi totalidad de la respuesta de las células HEK-NOD2 se debe a la presencia de los productos de degradación de los PGN, dado que la filtración con 30 kDa no retiene o retiene muy poco los contaminantes. Por el contrario, los carbones son poco eficaces para reducir la respuesta de esas células. En efecto, la disminución de la respuesta provocada por la reducción de la carga de contaminantes del tipo MDP no sobrepasa el 50% de la respuesta máxima de las células.

25 Finalmente, los carbones tienen un efecto medio sobre la respuesta TLR4. A excepción del SX+ que es muy eficaz para eliminar todas las formas de LPS, la reducción provocada por el tratamiento con los otros carbones no excede el 50% de la respuesta inducida por la misma muestra sin tratar. Se puede observar, no obstante, que los carbones L4S, A-supra Eur, y en menor medida, C-extra USP et ENO-PC, son más eficaces para reducir las respuestas inducidas por las moléculas de tamaño < 100 kDa, lo que sugiere que esos carbones actúan preferentemente sobre los LPS no agregados.

Los resultados para la matriz E1242 se presentan en la figura 15.

30 Todos los carbones probados son eficaces para reducir las respuestas inducidas por la matriz E1242 en las células Raws y HEK-TLR2. Las respuestas obtenidas, que son próximas o iguales al ruido de fondo, son idénticas antes y después de la filtración con 30 kDa y 100 kDa, prueba de que las moléculas grandes correspondientes al PGN han sido eliminadas.

35 La matriz E1242 está muy poco contaminada con el LPS. Sin embargo, se puede observar que ENO-PC y A-Supra-Eur son más eficaces que los otros carbones para disminuir la respuesta de las células HEK-TLR4 a nivel del ruido de fondo. Esta observación confirma que esos dos carbones tienen un espectro de acción amplio y son eficaces para eliminar otras moléculas distintas de los PGN, como los LPS.

Finalmente, los carbones no son eficaces para eliminar los productos de degradación de los PGN, a excepción de ENO-PC y SX2, que reducen aproximadamente 50% la respuesta de las células HEK-NOD2.

Los resultados para la matriz Lab3943 se presentan en la figura 16.

40 Esta matriz está contaminada por un amplio espectro de moléculas diferentes. Como se esperaba, todos los carbones reducen las respuestas inducidas en las células Raws, pero con distinta eficacia. Se puede observar que SX+, CSA, L4S y, en menor medida, A-Supra-Eur, son los más eficaces, lo que confirma que estos carbones tienen un espectro de acción amplio. Para las células HEK-TLR2, todos los carbones se revelan eficaces para eliminar los PGN, pero las respuestas residuales permanecen idénticas antes y después de la filtración, lo que indica que los productos de degradación de los PGN son eliminados con mayor dificultad.

45 El comportamiento de los carbones en la eliminación de los LPS también es variable. Así, los carbones SX+, ENO-PC, L4S y A-Supra-Eur son todavía los más eficaces para reducir la respuesta de las células HEK-TLR4. Finalmente, sólo los carbones ENO-PC, C-Extra-USP y SX2 se revelan relativamente activos para reducir fuertemente la respuesta de las células HEK-NOD2, prueba de que son eficaces para eliminar los productos de degradación de los PGN presentes en esta matriz.

- 50
- C-extra-USP y SX2: eficaces para eliminar los PGN y sus productos de degradación.
 - A-Supra-Eur: amplio espectro con mayor eficacia para moléculas de peso molecular elevado (ej.: LPS agregados y PGN).

- ENO-PC: amplio espectro con mayor eficacia para moléculas de peso molecular < 100 kDa (ej.: LPS y productos de degradación de los PGN).
- otros carbones: espectros de acción y eficacia al menos equivalentes a los del carbón SX+.

Ejemplo 5: Efecto de un tratamiento por ultrafiltración con 5 kDa.

- 5 El tratamiento por ultrafiltración tiene por objetivo reducir, incluso eliminar, la contaminación con las moléculas de tamaño pequeño, de manera de contrarrestar su participación en el desencadenamiento de una respuesta inflamatoria, ya sea por un efecto directo o por un fenómeno de sinergia con otras moléculas contaminantes.

Las experiencias se realizaron sobre las matrices E1565 y Lab3943, que están ambas contaminadas con PGN parcialmente degradados (respuestas TLR2 et NOD2) y LPS (respuesta TLR4).

- 10 La filtración con 5 kDa se realizó a un flujo medio de 25 mL/min. Los flujos de los filtrados son respectivamente de 55 mL/h para E1565 y 65 ml/h para Lab3943.

Para verificar la eficacia de la ultrafiltración, las respuestas celulares se midieron primero a partir de muestras provenientes de las fracciones Retenido y Filtrado recuperadas luego del pasaje de la solución de partida (100 mL).

- 15 La ultrafiltración se realizó a continuación en circuito cerrado con inyección continua del retenido en la muestra de partida. Para compensar la pérdida de líquido debida a la eliminación del filtrado, el volumen de la muestra se ajustó continuamente al volumen de partida por adición de agua PPI. En ese caso, las pruebas celulares se realizaron a partir de extracciones de la muestra efectuadas luego de 1 h, 2 h y 3 h de ultrafiltración.

Los resultados para la matriz E1565 se presentan en la figura 17.

- 20 Las respuestas inducidas por las fracciones Retenido permanecen similares a las observadas para las muestras sin filtrar en las cuatro pruebas celulares. No obstante, se observa una respuesta inflamatoria significativa en respuesta a las fracciones Filtrado en las células Raws y HEK-NOD2. Esos datos son compatibles con el umbral de corte del filtro (5 kDa), que deja pasar los productos de despolimerización de los PGN pero no los PGN y el LPS, sobre todo si estos últimos están bajo forma de agregados. Por el contrario, la ausencia de disminución en la respuesta inflamatoria en los Retenidos indica que un solo pasaje por el filtro es ineficaz para reducir la reactividad inflamatoria de la matriz. En efecto, la partición entre las fracciones Retenido/Filtrado es de 25 a 1, lo que es insuficiente para eliminar las moléculas inflamatorias pequeñas.

- 25 La ultrafiltración en continuo es eficaz para disminuir la respuesta inducida en las células HEK-NOD2, lo que era previsible, pero también en las células Raws y HEK-TLR2. Dada la contaminación de E1565 con los PGN y el LPS, la disminución de la respuesta en los dos últimos tipos celulares está ciertamente ligada a una reducción de la actividad sinérgica de las moléculas inflamatorias pequeñas.

- 30 Los resultados para la matriz Lab3943 se presentan en la figura 18.

- 35 Como se esperaba, se encuentra una actividad inflamatoria asociada al MDP en el Filtrado (HEK-NOD2). También se observa una respuesta significativa en las células HEK-TLR4. Ese resultado muestra que el LPS tiene una configuración estructural menos agregada que el presente en la matriz E1565, lo que ha permitido su pasaje a través del filtro.

Como para E1565, la filtración en continuo es eficaz para disminuir la carga de productos de despolimerización de los PGN, lo que es visible por una reducción neta de la respuesta de las células HEK-NOD2 (efecto directo) y por una disminución menor pero significativa de la reactividad de las células Raws y HEK-TLR2 (acción sinérgica).

Ejemplo 6: Efecto de los tratamientos enzimáticos.

- 40 El objetivo de esos ensayos es probar la capacidad de enzimas industriales para disminuir la reactividad proinflamatoria de los contaminantes presentes en las matrices de polímero de glucosa.

Las muestras se preparan al 32% (peso/volumen) y se tratan en presencia de las enzimas según las condiciones descritas más adelante. Después del tratamiento, las enzimas se desactivan por calentamiento, las soluciones se filtran a través de filtro estéril de 0,22 µm, y luego se utilizan en las pruebas celulares.

- 45 Se probaron tres preparaciones enzimáticas industriales respecto a su capacidad para reducir la carga de contaminantes:

- Mannaway®: incubación a 0,4% (vol/vol), pH 10, 50 °C, durante 4 h y 24 h.
- SEBflo® TL: incubación a 0,35 mg/g de matriz, 50 °C, pH 5, de 30 min a 24 h.
- SEBPro®FL100: incubación a 4 % (vol/vol), pH 3, 55 °C, de 1 h a 24 h.

Las dos matrices elegidas para las pruebas son: E3063 (fuerte contaminación con PGN poco degradados y trazas de LPS) y E5250 (poca contaminación con PGN y presencia de moléculas inflamatorias distintas de PGN y LPS).

Los efectos de los tratamientos de las dos matrices por la Mannaway® se presentan en la figura 19.

5 La adición de la solución enzimática a la matriz P-11.11 (control de no contaminación) no induce ninguna respuesta inflamatoria en las células Raws, HEK-TLR2 o HEK-TLR4. Se observa un débil aumento de las células HEK-NOD2, lo que sugiere la presencia de productos de degradación de los PGN en estado de trazas. No obstante, esos resultados muestran que la enzima utilizada en las condiciones de la experiencia no aporta contaminantes proinflamatorios mayores.

10 Los ensayos realizados sobre la matriz E3063 muestran que la enzima tiene probablemente una acción lítica débil sobre los PGN, puesto que se observa una disminución de las respuestas en las células Raws y HEK-TLR2. El tratamiento provoca un aumento de la respuesta de las células HEK-NOD2, lo que es compatible con una degradación parcial de los PGN. Por el contrario, también se observa un aumento de la respuesta de las células HEK-TLR4. Dado que la preparación enzimática no aporta contaminación, la aparición de LPS se debe probablemente a una liberación de ese contaminante desde la propia matriz.

15 El tratamiento enzimático de la matriz E5250 induce un aumento de la respuesta inflamatoria en los cuatro tipos celulares. En el origen, esta matriz desencadenaba respuestas inflamatorias débiles. Por consiguiente, el aumento de las respuestas TLR2 y TLR4 sugiere que la enzima liberó contaminantes del tipo PGN y LPS desde la matriz.

20 La Mannaway® se utiliza corrientemente como agente de clarificación de los productos agroalimentarios. Los resultados obtenidos sugieren que la enzima ha probablemente disociado macrocomplejos (restos bacterianos) que normalmente eran eliminados por la etapa de filtración en filtro de 0,22 µm. Al solubilizar esas moléculas inflamatorias, la enzima las volvió accesibles para inducir respuestas en las pruebas celulares.

Los efectos de los tratamientos de la matriz E5250 por la SEBflo®TL se presentan en la figura 20.

La adición de la solución enzimática a la matriz P-11.11 no induce ninguna respuesta inflamatoria en los cuatro tipos celulares, prueba de que la enzima utilizada en las condiciones de la experiencia no aporta contaminantes.

25 El tratamiento de la matriz E5250 induce una escasa disminución de las respuestas inflamatorias en las células Raws y HEK-TLR2. La enzima se describe fundamentalmente por sus propiedades de beta-glucanasa. No obstante, la disminución de las respuestas celulares observadas está acompañada de un aumento de la respuesta de las células HEK-NOD2. Esos datos indican que la preparación enzimática también contiene una actividad capaz de degradar los PGN.

30 Paralelamente a la aparición de los productos de degradación de los PGN, se observa un débil aumento de la respuesta TLR4 en presencia de la enzima, aunque esta última no está contaminada. Como precedentemente, la enzima ha liberado probablemente contaminantes inflamatorios, pero en menor grado que el que se observa con la Mannaway®.

Los efectos de los tratamientos de la matriz E3063 por la SEBPro® FL100 se presentan en la figura 21.

35 La adición de la preparación enzimática a la matriz P-11.11 induce una fuerte respuesta inflamatoria en las células HEK-TLR4, así como respuestas débiles pero significativas en las células Raws y HEK-TLR2. Esos datos indican que la enzima está contaminada con LPS y trazas de PGN.

40 La adición de la enzima a la matriz E3063 induce una escasa disminución de la respuesta TLR2, que está acompañada de un aumento de la respuesta de las células HEK-NOD2. Esos datos indican que la SEBPro®FL100 tiene una débil acción lítica sobre los PGN. No obstante, su uso necesitaría obligatoriamente una etapa previa de descontaminación para eliminar el LPS.

Ejemplo 7: Efecto de los tratamientos por pasajes sobre resinas.

El objetivo de esos ensayos es probar la capacidad de resinas industriales para retener los contaminantes presentes en las matrices de polímero de glucosa y por consiguiente de reducir la reactividad proinflamatoria de esas matrices.

45 Los ensayos se realizaron con la matriz E1565 (solubilizada al 32% peso/volumen en agua estéril), porque ella está contaminada con los diferentes tipos de moléculas proinflamatorias susceptibles de ser encontradas en los circuitos de producción (respuestas TLR2, TLR4 y NOD2).

50 Para las experiencias, la solución a descontaminar se eluyó de manera continua en una columna que contenía 20 mL de cada resina (*volumen del lecho*). Las pruebas celulares de reactividad inflamatoria se realizaron a partir de la solución antes del pasaje por la columna (control de contaminación), después sobre las muestras recuperadas luego del pasaje de 4 volúmenes (pasaje 5) y de 10 volúmenes (pasaje 11) de solución. Este procedimiento permitió verificar si la presencia del polímero de glucosa no provocaba un fenómeno de saturación de las resinas.

Los resultados se presentan en la figura 22.

El pasaje de la solución sobre las diferentes resinas provoca una disminución de la reactividad inflamatoria de la matriz E1565 al contacto con las células Raws. A excepción de FPX66, la disminución de la respuesta alcanza al menos 50% para las otras resinas. La reducción alcanza incluso 70% luego del pasaje sobre la resina SD2, lo que indica que esta resina es la más eficaz para eliminar las moléculas contaminantes con actividad proinflamatoria contenidas en la matriz E1565. En todos los casos, no se observa ninguna diferencia significativa entre los pasajes 5 y 11, lo que excluye cualquier fenómeno de saturación del soporte.

La reactividad de las células HEK-TLR2 frente a la matriz E5250 no se modifica significativamente luego del pasaje sobre las diferentes resinas, lo que indica que esos tratamientos son ineficaces para reducir la carga de PGN contaminante.

Las resinas MN-100 y XAD-1600 muestran ser muy eficaces para reducir las respuestas de las HEK-TLR4 frente a la matriz E1565. Esos datos indican que esas dos resinas poseen una capacidad elevada de retención de las moléculas de tipo LPS. A la inversa, las otras resinas son poco eficaces, incluso totalmente ineficaces, para retener ese contaminante.

Finalmente, las diferentes resinas reducen moderadamente las respuestas de las células HEK-NOD2 frente a la matriz, a excepción de FPX66 que es totalmente ineficaz. El efecto observado permanece no obstante débil, lo que demuestra que las resinas tienen poca capacidad de retención de los productos de degradación de los PGN.

Aparte de la presencia de trazas de LPS, la matriz E1565 está fuertemente contaminada con el PGN y sus productos de degradación. Estos últimos tienen poca reactividad inflamatoria *per se*, por el contrario, son capaces de actuar en sinergia con las otras moléculas inflamatorias que interactúan con los TLR, como los PGN y los LPS, y de exacerbar la respuesta inflamatoria global.

Las pruebas realizadas en este ejemplo muestran una disminución significativa de la reactividad de las células Raws luego del pasaje sobre las diferentes resinas. Esta disminución de respuesta inflamatoria global no es consecutiva a una retención de los PGN, puesto que el pasaje sobre las resinas no modifica las respuestas TLR2.

Sólo dos resinas (MN-100, XAD-1600) de siete son netamente eficaces para reducir la respuesta TLR4. Se puede por lo tanto deducir que la disminución de respuesta inflamatoria observada en las células Raws es consecutiva, al menos en parte, a la retención del LPS luego del pasaje de la matriz sobre esas dos resinas.

A excepción de FPX66, toda las resinas retienen moderadamente los productos de degradación de los PGN. Dado el impacto de esas moléculas pequeñas sobre la exacerbación de las respuestas inflamatorias, esos resultados indican que el efecto principal de las resinas es eliminar los efectos sinérgicos asociados a esas moléculas pequeñas.

En cuanto a la matriz FPX66, su efecto está ligado probablemente a la eliminación de moléculas inflamatorias distintas de los LPS, los PGN y sus productos de degradación. Esta hipótesis es compatible con el hecho de que esta resina es la menos eficaz para reducir la respuesta inflamatoria global.

En su conjunto, esos datos indican que un tratamiento de las matrices con ciertas resinas industriales juiciosamente elegidas puede revelar ser eficaz para eliminar los contaminantes inflamatorios distintos de los PGN, pero también para reducir los efectos de sinergia observados entre esas moléculas. El ejemplo 4 del presente estudio ha demostrado que ciertos carbones industriales son particularmente eficaces para eliminar los PGN. Por consiguiente, un procedimiento que asocie los dos tipos de tratamientos debería permitir orientarse a las diferentes familias de contaminantes y proponer matrices exentas de reactividad inflamatoria.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento que permite probar el efecto de una o más etapas de producción o la eficacia de una o más etapas de purificación sobre la presencia o la naturaleza de las moléculas proinflamatorias en los polímeros de glucosa o sus hidrolizados, que comprende:

- 5 a) proporcionar polímeros de glucosa o sus hidrolizados;
- b) detectar o dosificar las moléculas proinflamatorias en los polímeros de glucosa o sus hidrolizados proporcionados en la etapa a);
- c) efectuar la o las etapas de producción o de purificación sobre los polímeros de glucosa o sus hidrolizados proporcionados en la etapa a);
- 10 d) detectar o dosificar las moléculas proinflamatorias en los polímeros de glucosa o sus hidrolizados obtenidos luego de la etapa c);
- e) determinar la eficacia o el impacto de la etapa c) sobre la presencia o la naturaleza de las moléculas proinflamatorias por comparación de las moléculas proinflamatorias en los polímeros de glucosa o sus hidrolizados detectadas o dosificadas en las etapas b) y d), siendo una disminución de la cantidad de moléculas proinflamatorias o de ciertas de esas moléculas, indicativa de la eficacia de la etapa c) para la descontaminación de los polímeros de glucosa o de sus hidrolizados;

en el cual la etapa de detección o dosificación de las moléculas proinflamatorias en los polímeros de glucosa o sus hidrolizados comprende una prueba *in vitro* de respuesta inflamatoria empleando una línea celular que expresa el receptor TLR2 (receptor tipo Toll 2) y un gen reportero cuya transcripción está bajo la dependencia directa de la vía de señalización asociada al receptor TLR2, siendo detectadas o dosificadas las moléculas proinflamatorias por medición de la actividad o de la señal del gen reportero.

2. Un procedimiento optimizado de producción o de purificación de polímeros de glucosa o de sus hidrolizados, que comprende:

- a) proporcionar polímeros de glucosa o sus hidrolizados;
- 25 b) detectar o dosificar las moléculas proinflamatorias en los polímeros de glucosa o sus hidrolizados proporcionados en la etapa a);
- c) seleccionar la o las etapas de producción o de purificación de los polímeros de glucosa o de sus hidrolizados adaptadas a las moléculas proinflamatorias presentes en los polímeros de glucosa o sus hidrolizados;
- 30 d) efectuar la o las etapas de producción o de purificación seleccionadas sobre los polímeros de glucosa o sus hidrolizados proporcionados en la etapa a); y
- e) detectar o dosificar las moléculas proinflamatorias en los polímeros de glucosa o sus hidrolizados obtenidos luego de la etapa d);

en el cual la etapa de detección o dosificación de las moléculas proinflamatorias en los polímeros de glucosa o sus hidrolizados comprende una prueba *in vitro* de respuesta inflamatoria empleando una línea celular que expresa el receptor TLR2 (receptor tipo Toll 2) y un gen reportero cuya transcripción está bajo la dependencia directa de la vía de señalización asociada al receptor TLR2, siendo detectadas o dosificadas las moléculas proinflamatorias por medición de la actividad o de la señal del gen reportero.

3. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual la prueba *in vitro* de respuesta inflamatoria comprende además poner en contacto polímeros de glucosa o sus hidrolizados con la línea celular THP-1 diferenciada a macrófagos, sensibilizada con MDP o LPS, siendo detectadas o dosificadas las moléculas proinflamatorias por medición de la cantidad de RANTES o TNF- α producida por la línea celular.

4. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual la prueba *in vitro* de respuesta inflamatoria comprende además poner en contacto polímeros de glucosa o sus hidrolizados con una línea de macrófagos transfectada con un gen reportero cuya transcripción está bajo la dependencia directa de las vías de señalización inflamatorias, siendo detectadas o dosificadas las moléculas proinflamatorias por medición de la actividad o de la señal del gen reportero.

5. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual la prueba *in vitro* de respuesta inflamatoria comprende además poner en contacto polímeros de glucosa o sus hidrolizados con una línea celular que expresa el receptor TLR4 y un gen reportero cuya transcripción está bajo la dependencia directa de las vías de señalización de TLR4, siendo detectadas o dosificadas las moléculas proinflamatorias por medición de la actividad o de la señal del gen reportero.

- 5 **6.** Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual la prueba *in vitro* de respuesta inflamatoria comprende además poner en contacto polímeros de glucosa o sus hidrolizados con una línea celular que expresa el receptor NOD2 y un gen reportero cuya transcripción está bajo la dependencia directa de las vías de señalización de NOD2, siendo detectadas o dosificadas las moléculas proinflamatorias por medición de la actividad o de la señal del gen reportero.
- 7.** Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual la prueba *in vitro* de respuesta inflamatoria comprende poner en contacto polímeros de glucosa o sus hidrolizados con:
- 10 a. la línea celular THP-1 diferenciada a macrófagos, sensibilizada con MDP o LPS, siendo detectadas o dosificadas las moléculas proinflamatorias por medición de la cantidad de RANTES o TNF- α producida por la línea celular; y,
- b. una línea de macrófagos transfectada con un gen reportero cuya transcripción está bajo la dependencia directa de las vías de señalización inflamatorias, siendo detectadas o dosificadas las moléculas proinflamatorias por medición de la actividad o de la señal del gen reportero; y,
- 15 c. una línea celular que expresa el receptor TLR2 y un gen reportero cuya transcripción está bajo la dependencia directa de las vías de señalización de TLR2, siendo detectadas o dosificadas las moléculas proinflamatorias por medición de la actividad o de la señal del gen reportero; y,
- d. una línea celular que expresa el receptor NOD2 y un gen reportero cuya transcripción está bajo la dependencia directa de las vías de señalización de NOD2, siendo detectadas o dosificadas las moléculas proinflamatorias por medición de la actividad o de la señal del gen reportero; y,
- 20 e. una línea celular que expresa el receptor TLR4 y un gen reportero cuya transcripción está bajo la dependencia directa de las vías de señalización de TLR4, siendo detectadas o dosificadas las moléculas proinflamatorias por medición de la actividad o de la señal del gen reportero.
- 8.** Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual la prueba *in vitro* de respuesta inflamatoria comprende además poner en contacto polímeros de glucosa o sus hidrolizados con una línea de control no transfectada con un receptor de la inmunidad.
- 9.** Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual las moléculas proinflamatorias son moléculas de origen bacteriano, elegidas preferentemente entre PGN, LPS, lipopolipéptidos, productos de despolimerización de los PGN, en particular el MDP, los péptidos microbianos formilados como el f-MLP y β glucanos.
- 30 **10.** Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual la o las etapas de producción o de purificación se eligen entre etapas de tratamiento térmico, de acidificación, de pasaje sobre carbón activado, de pasaje sobre resinas de adsorción, de ultrafiltración, de filtración, de hidrólisis química o enzimática, o sus combinaciones.
- 35 **11.** Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual los polímeros de glucosa se eligen entre la icodextrina y las maltodextrinas, particularmente las maltodextrinas ramificadas o no, y los hidrolizados de los polímeros de glucosa son un producto de la hidrólisis total como el monohidrato de dextrosa.
- 12.** Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual las muestras de polímeros de glucosa o de sus hidrolizados son filtradas previamente, particularmente con un umbral de corte de 30 kDa, y el filtrado se pone en contacto con la línea celular utilizada en la prueba.
- 40

Figura 1

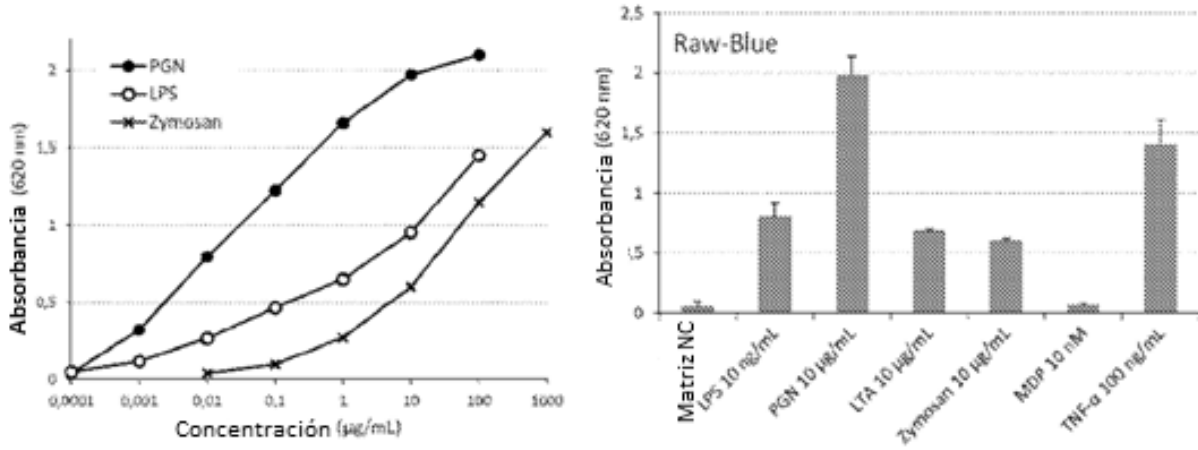


Figura 2

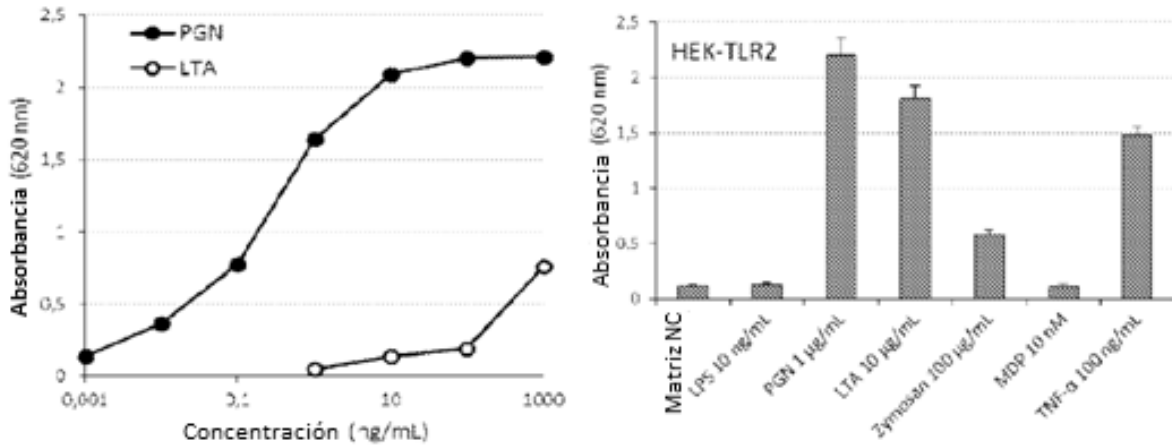


Figura 3

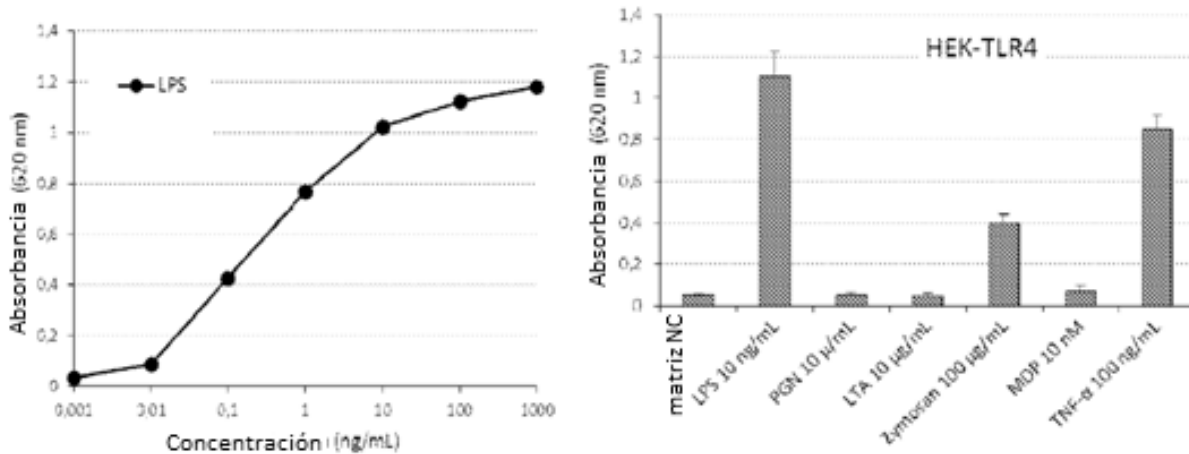


Figura 4

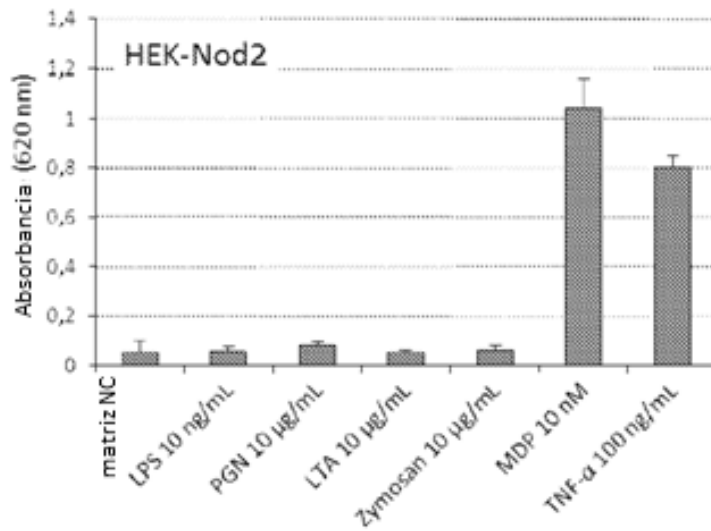
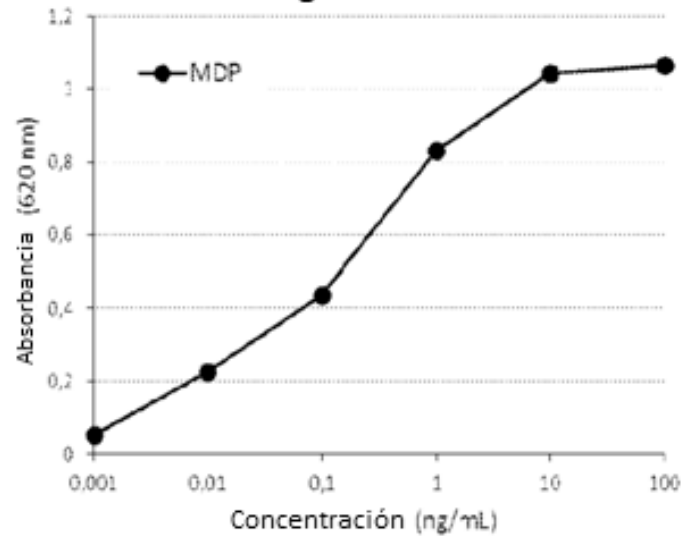


Figura 5

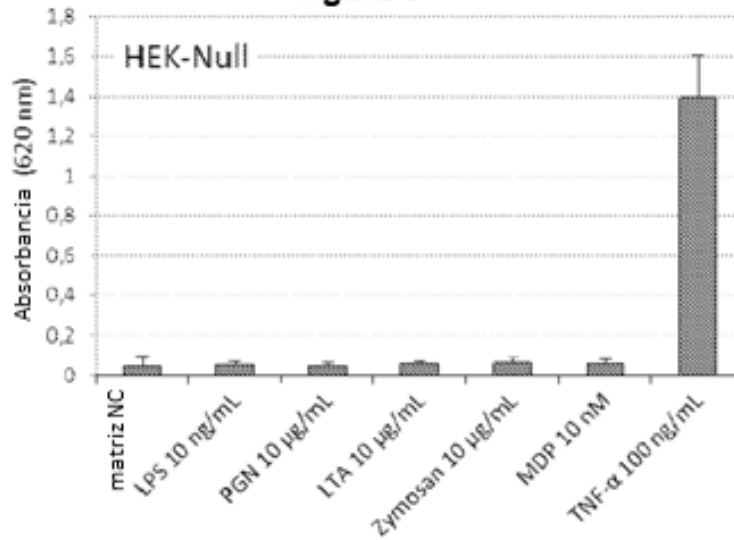


Figura 6

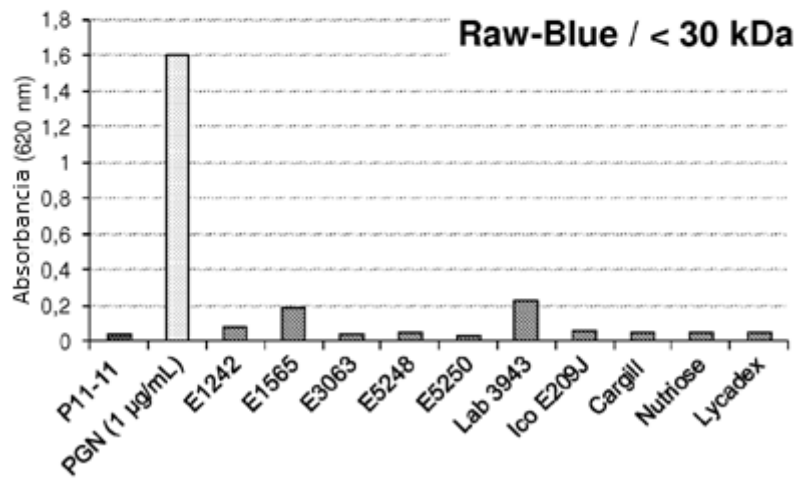
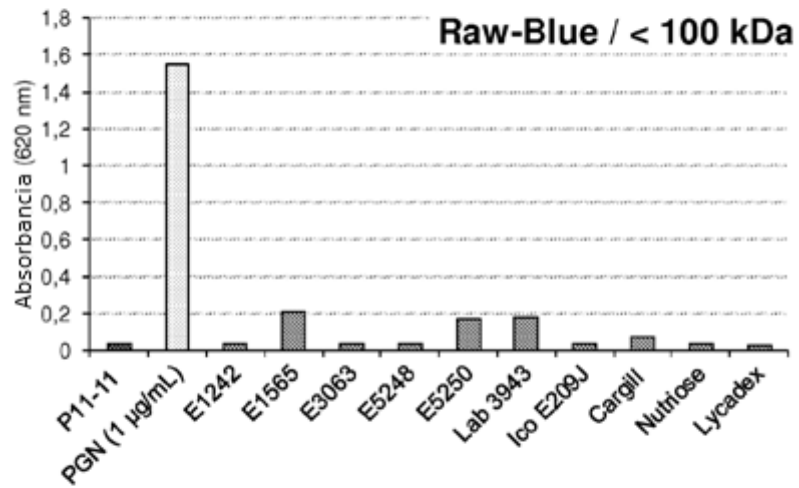
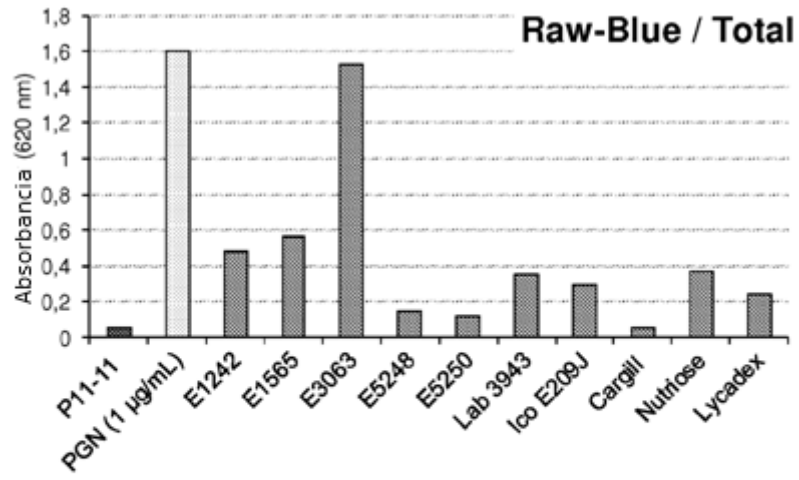


Figura 7

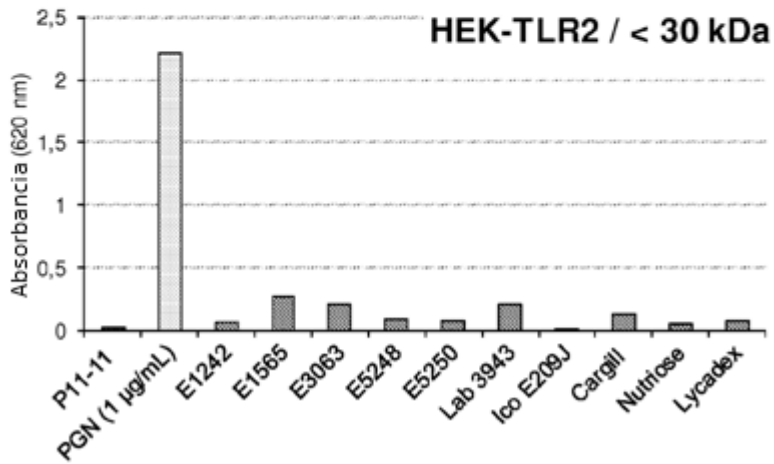
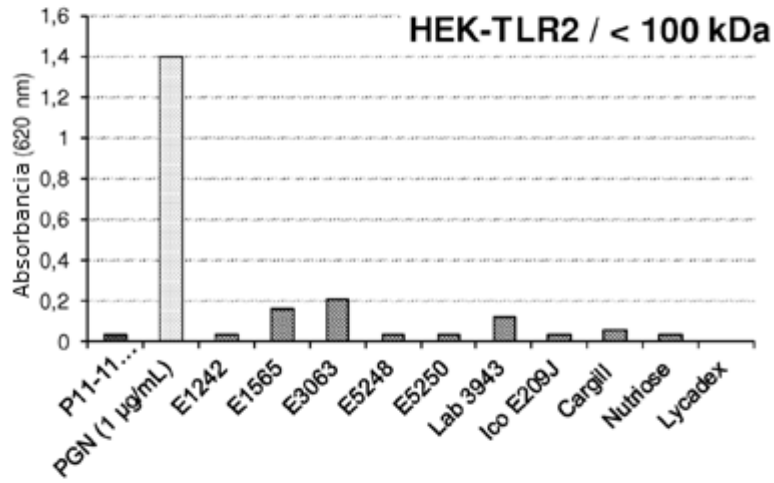
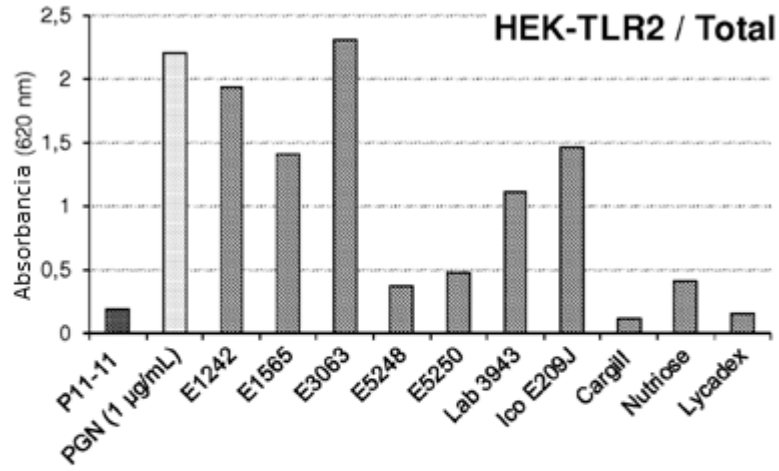


Figura 8

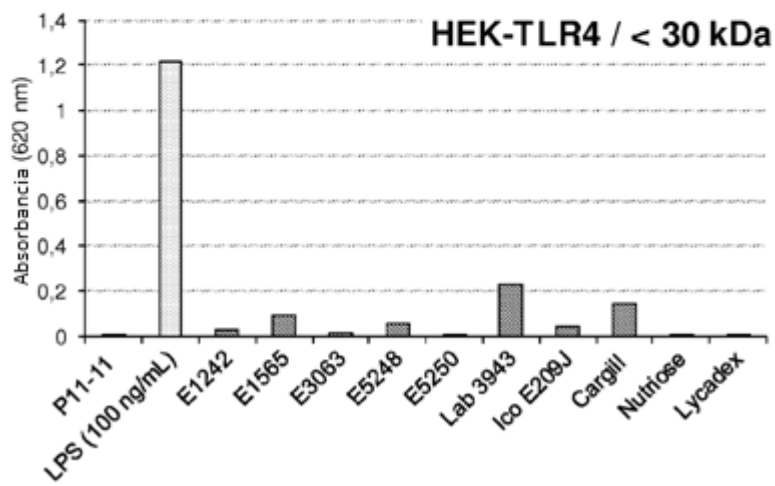
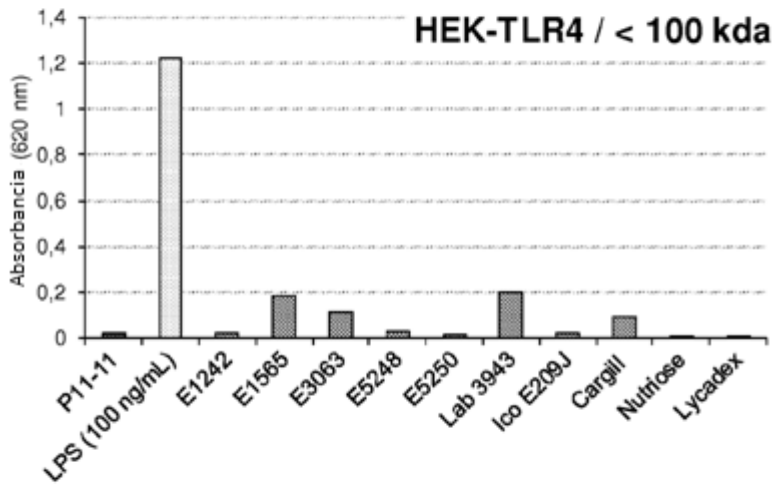
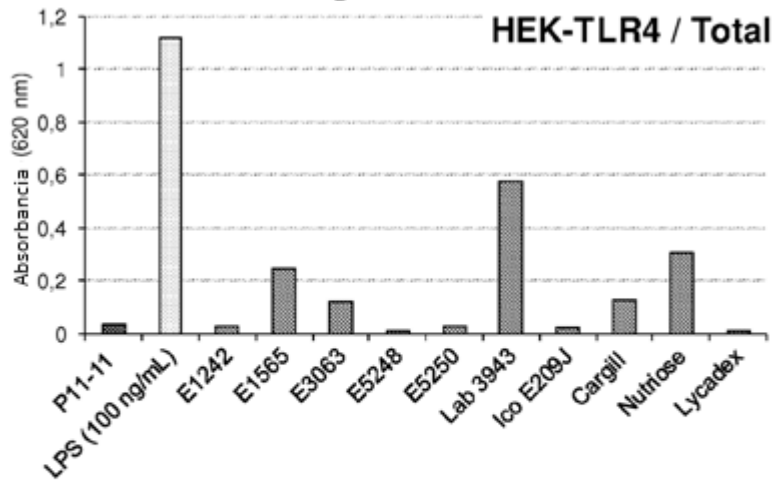
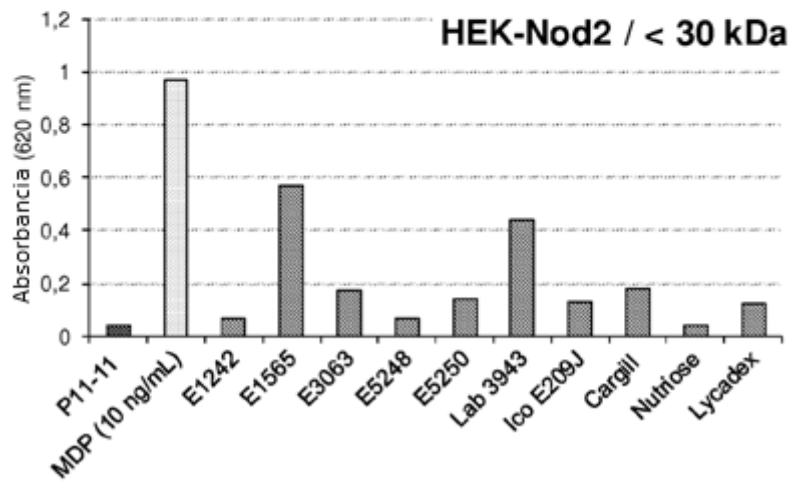
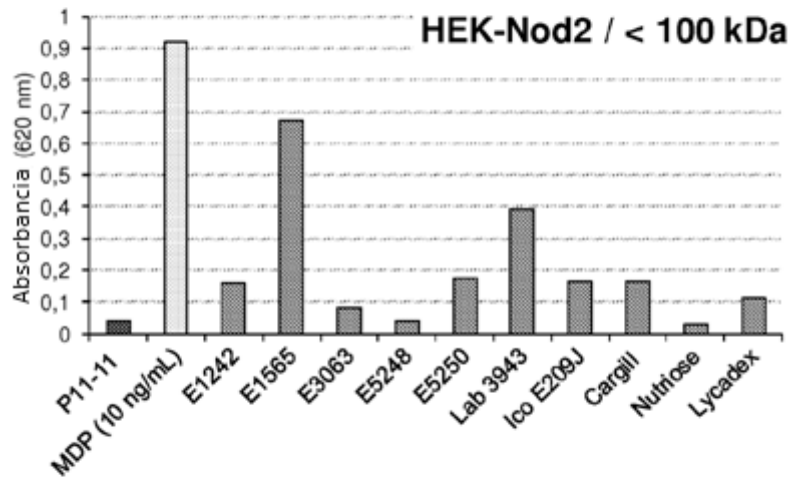
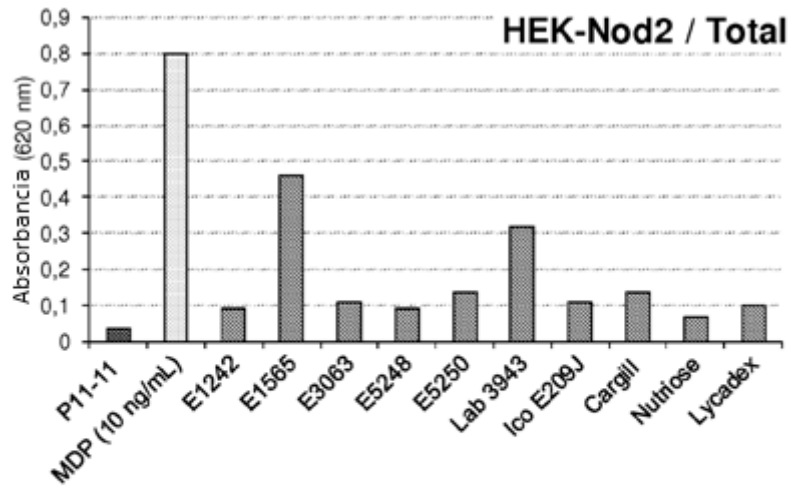


Figura 9



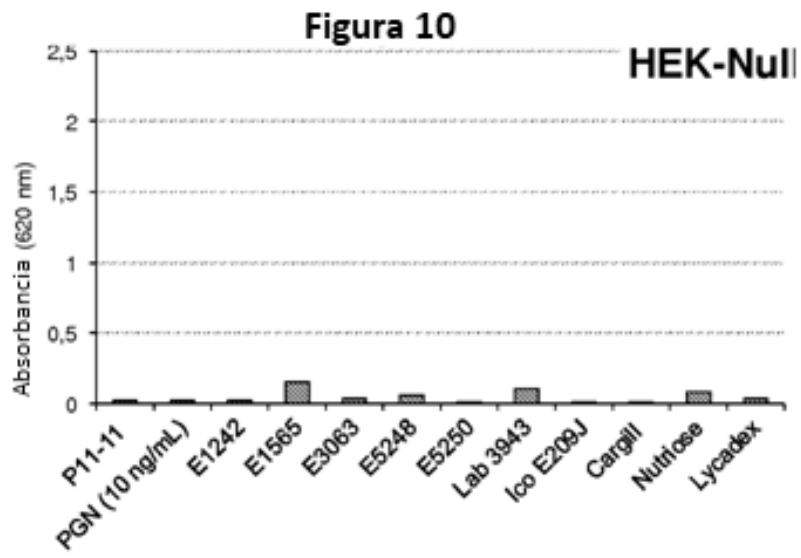


Figura 11

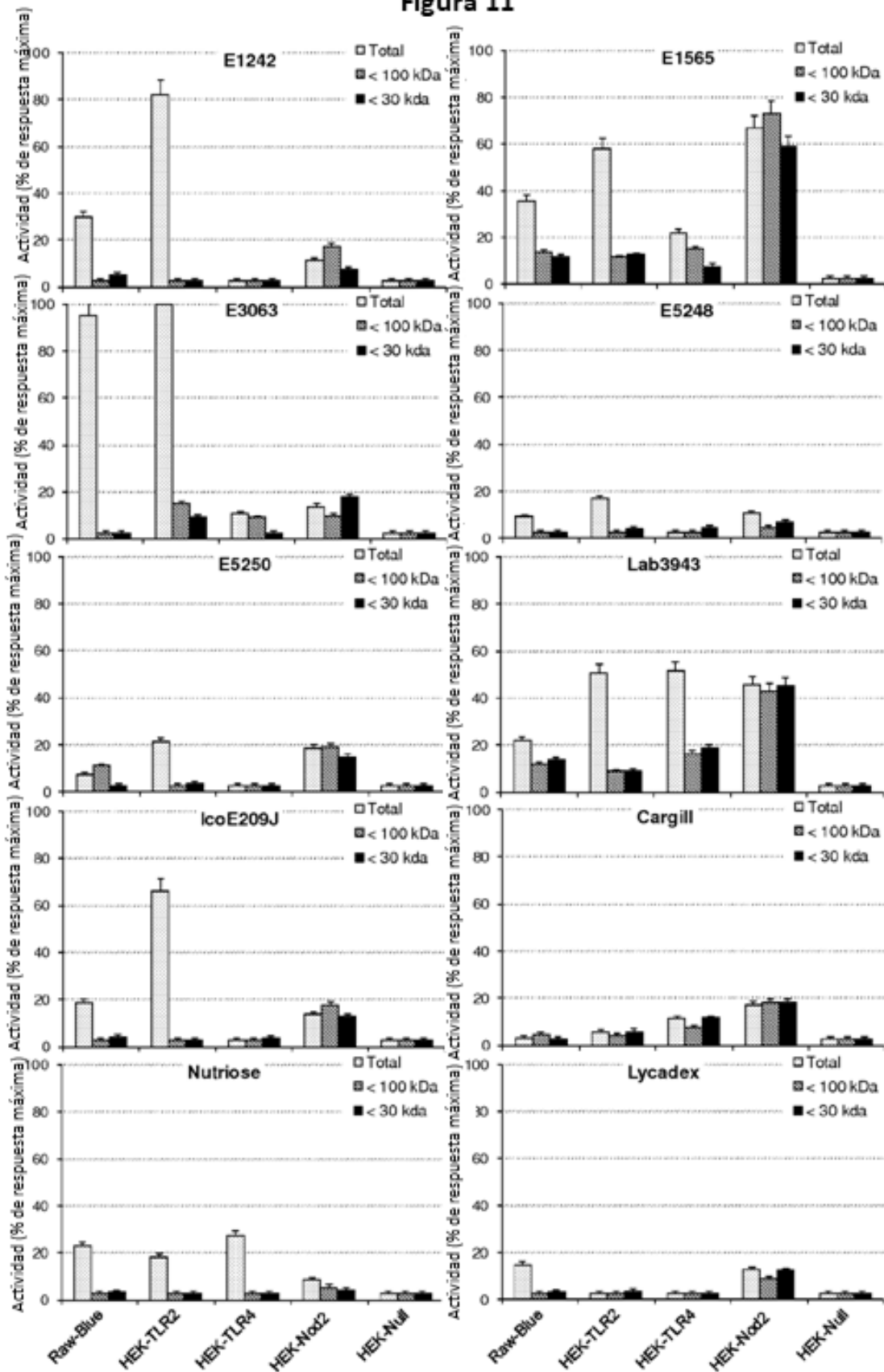


Figura 12

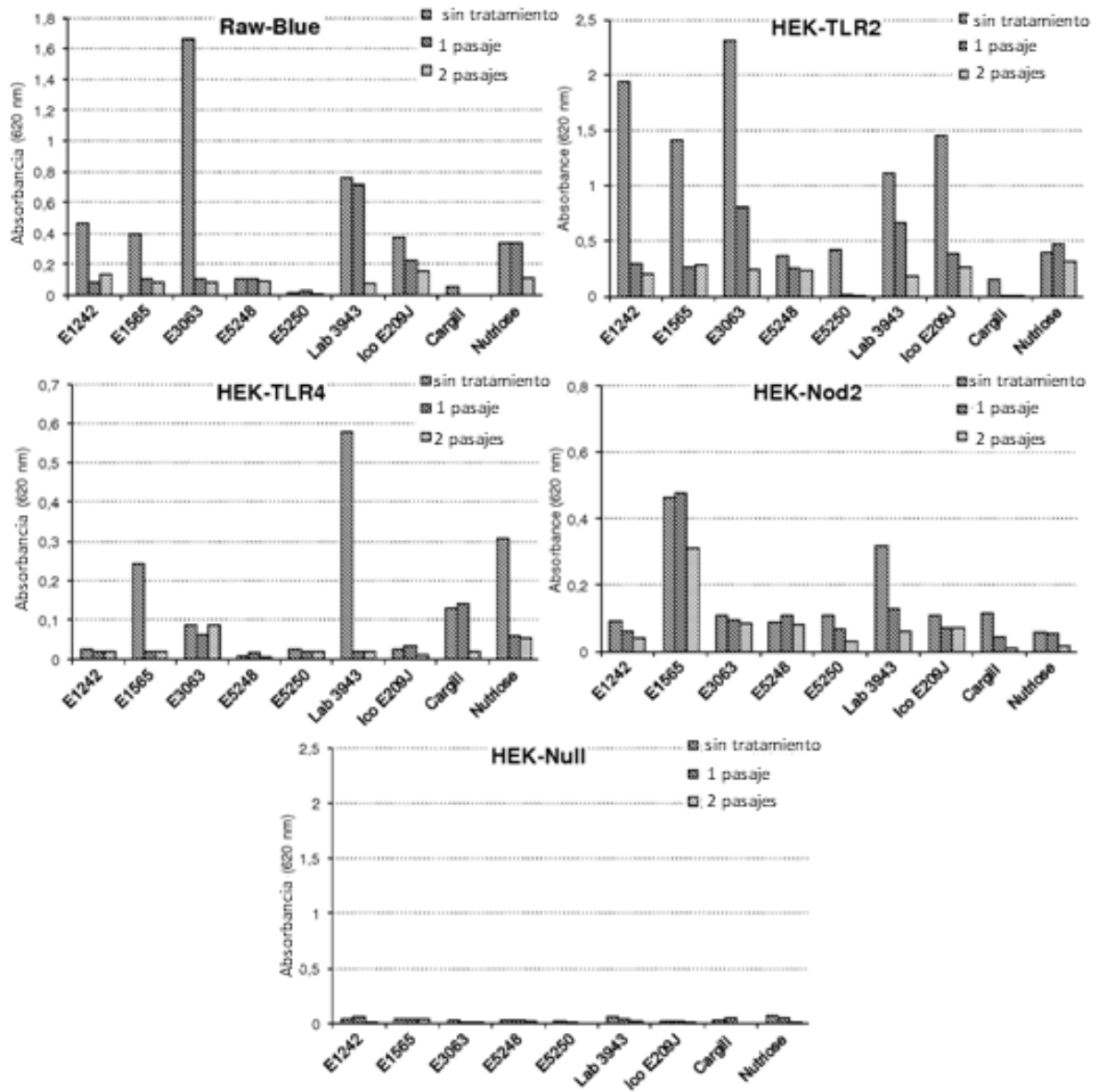
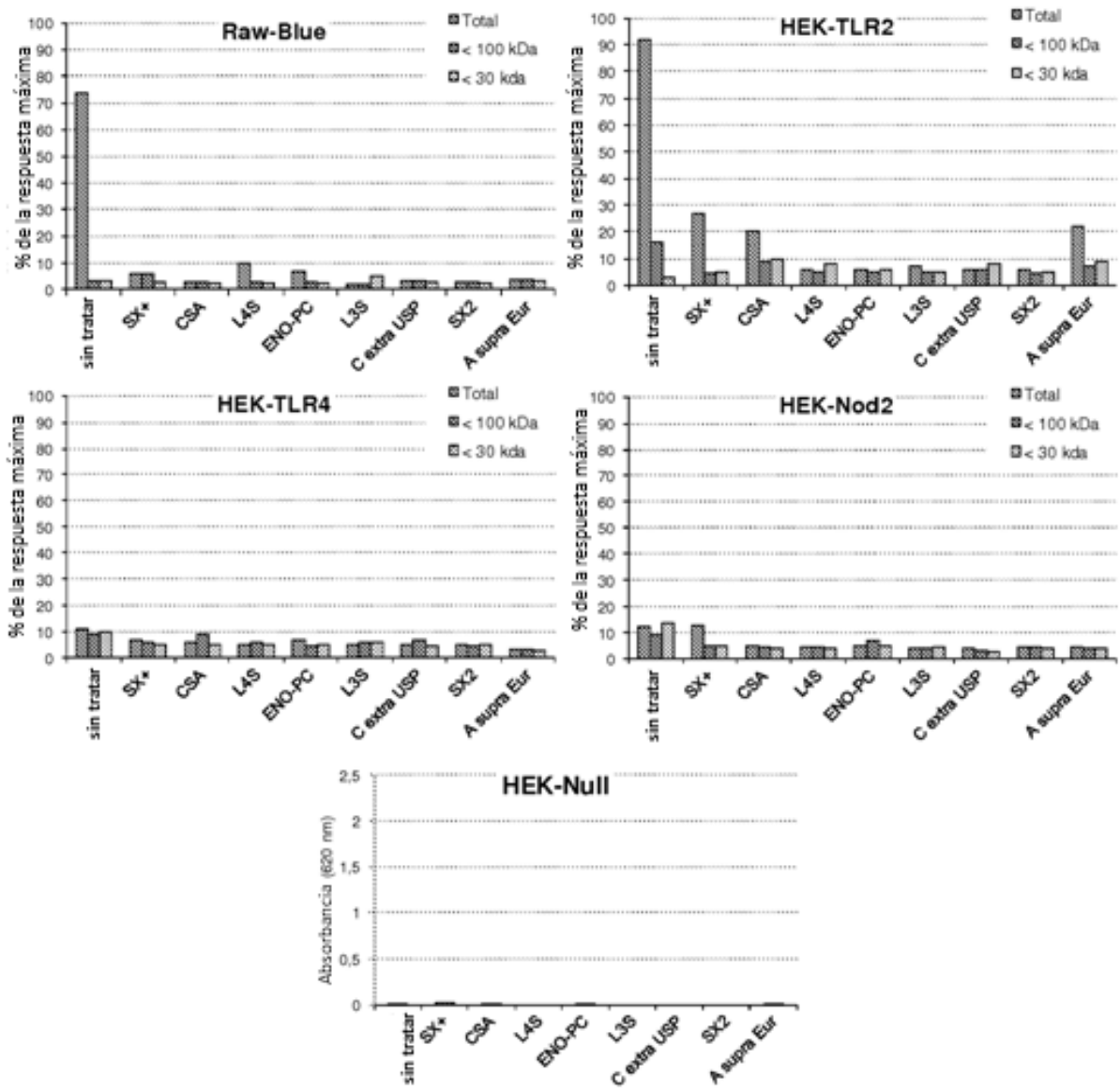


Figura 13



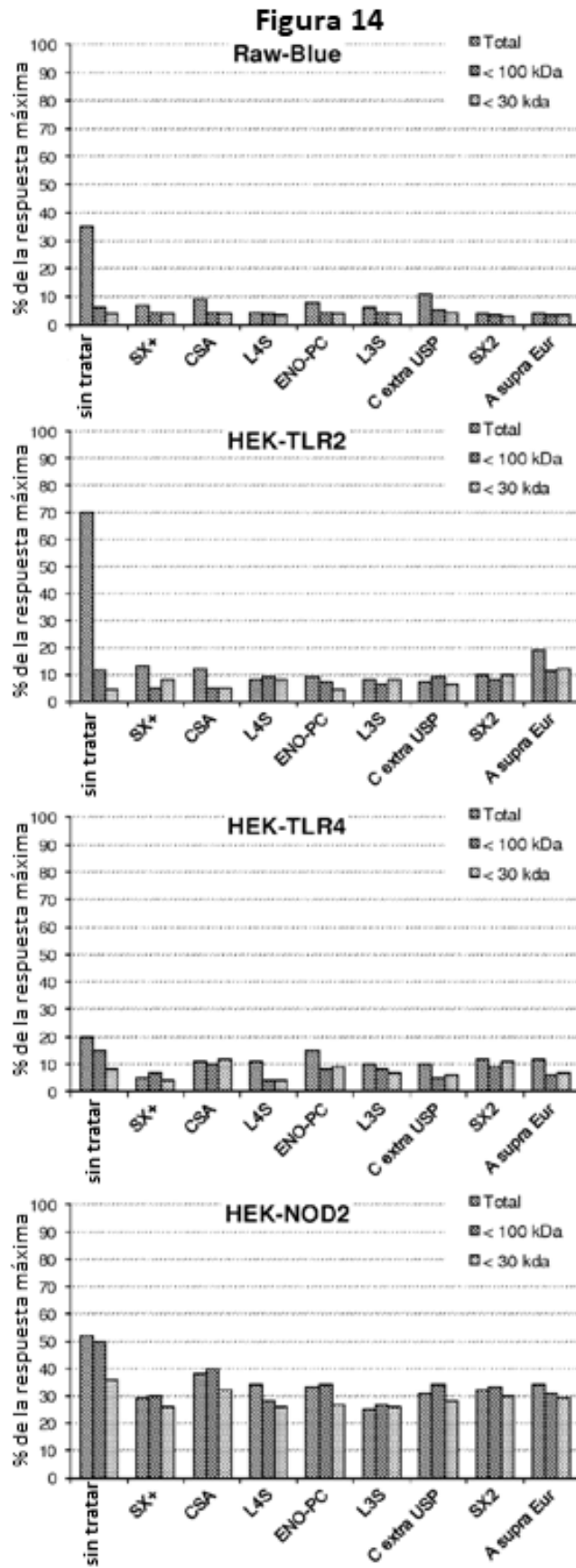


Figura 15

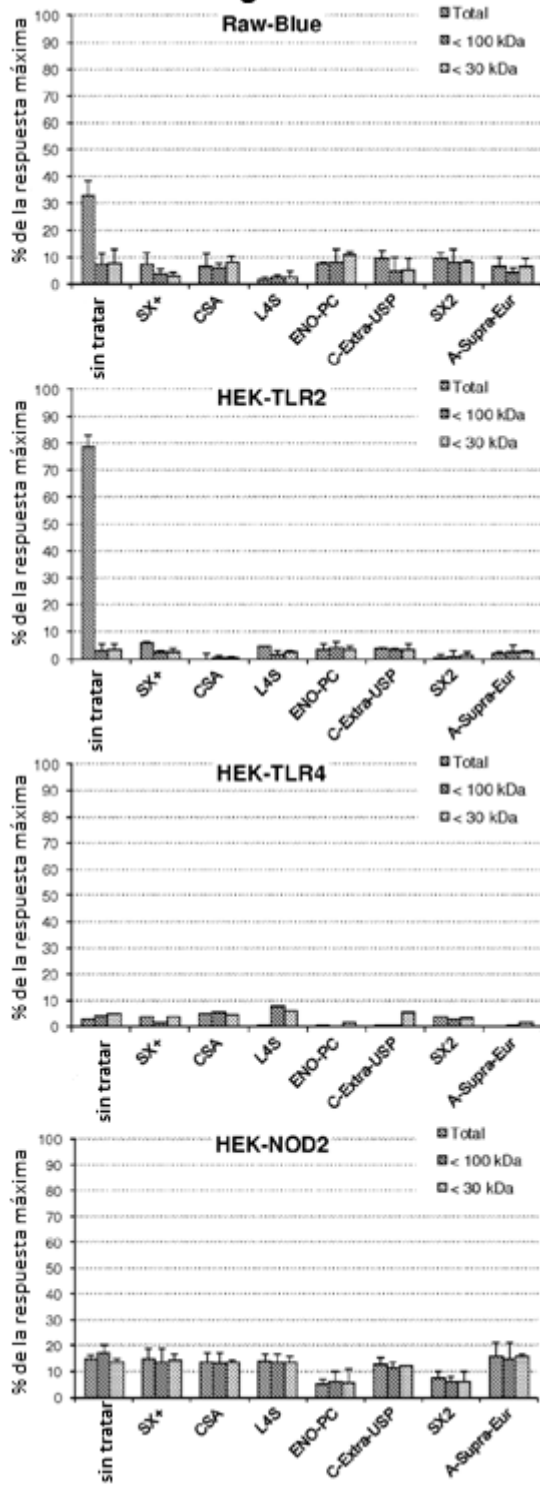


Figura 16

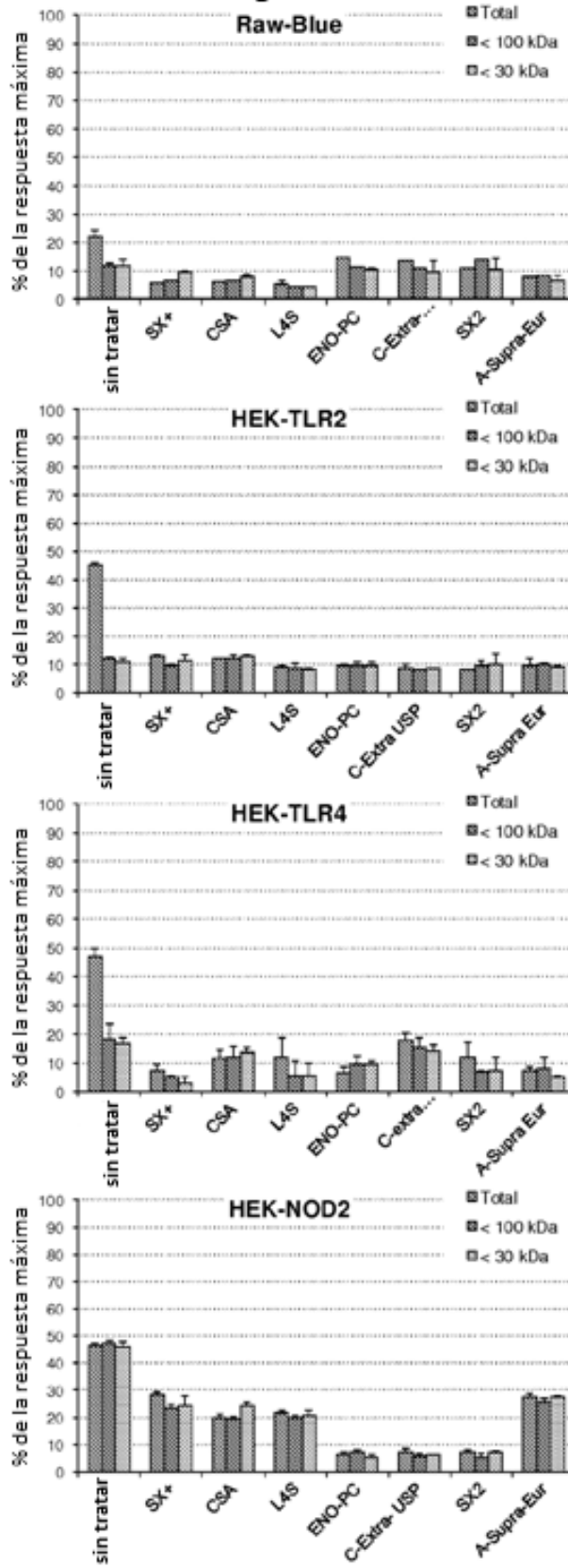


Figura 17

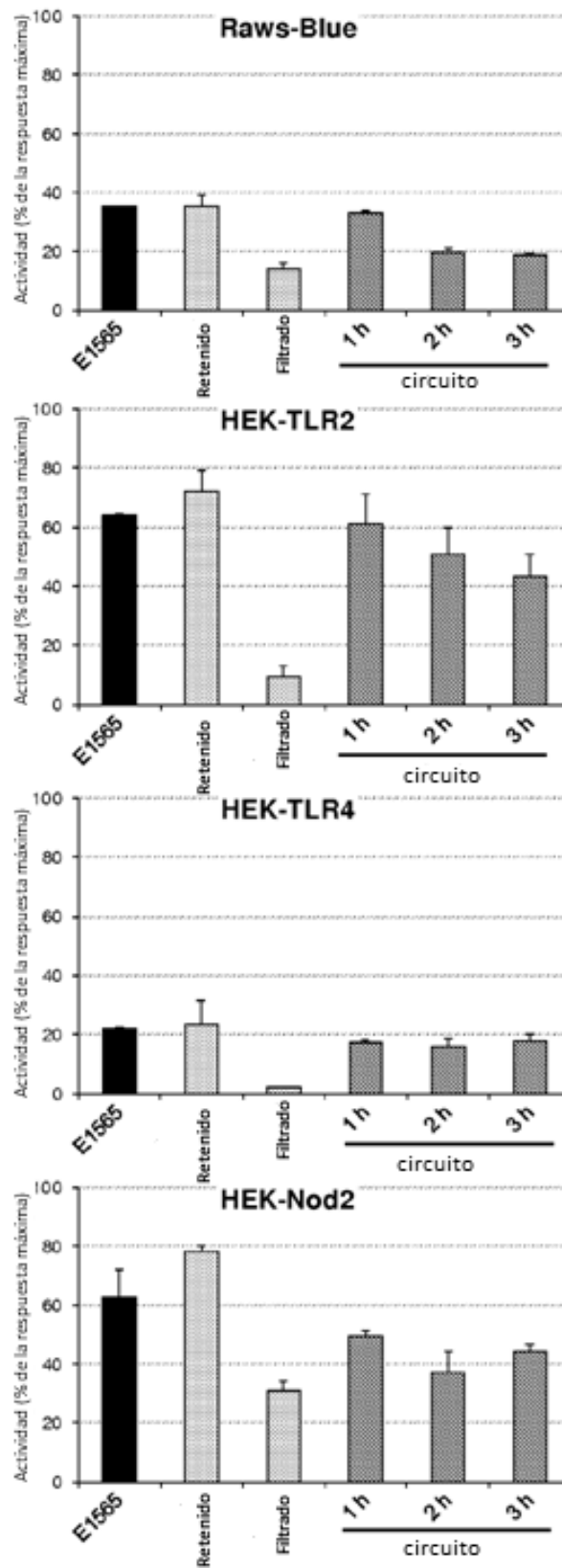
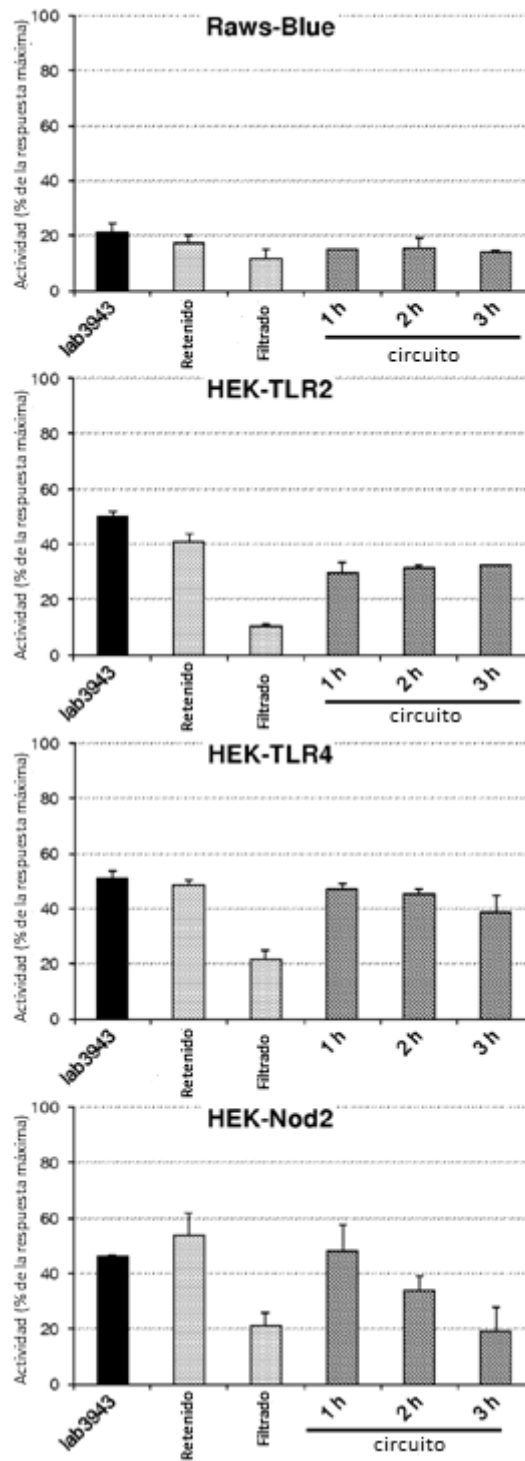
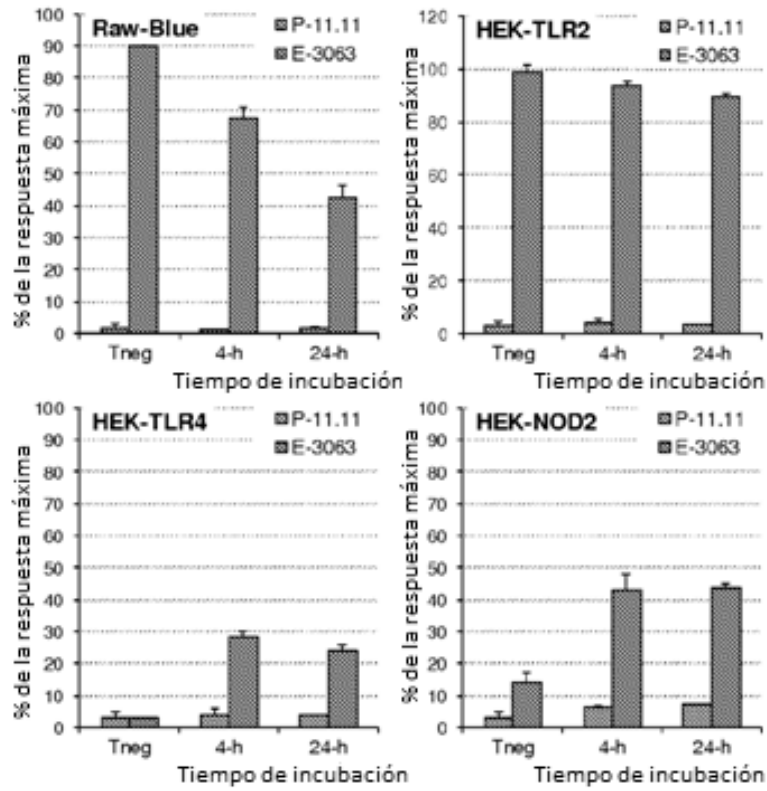


Figura 18



E-3063

Figura 19



E-5250

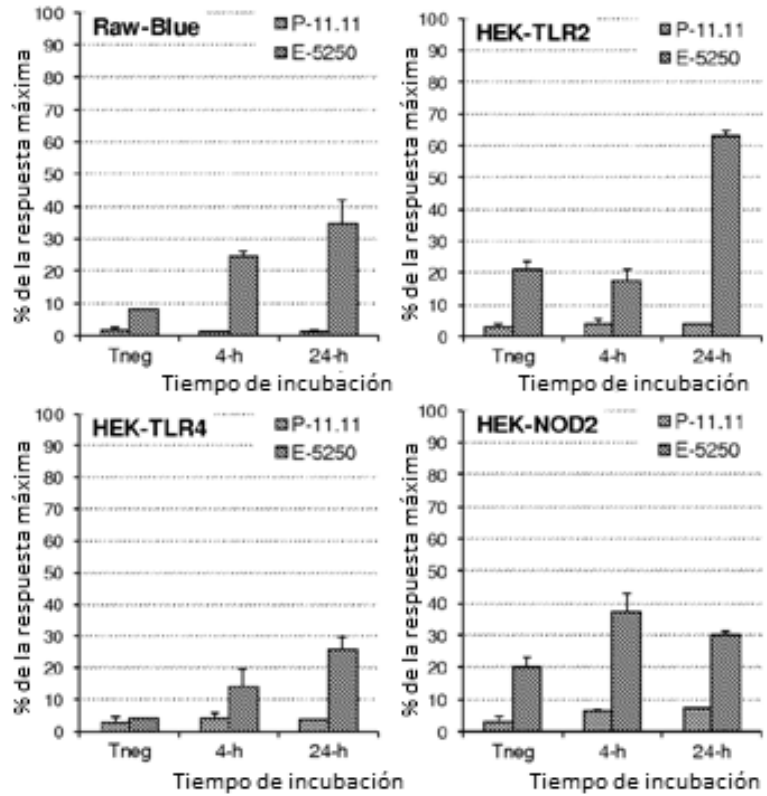


Figura 20

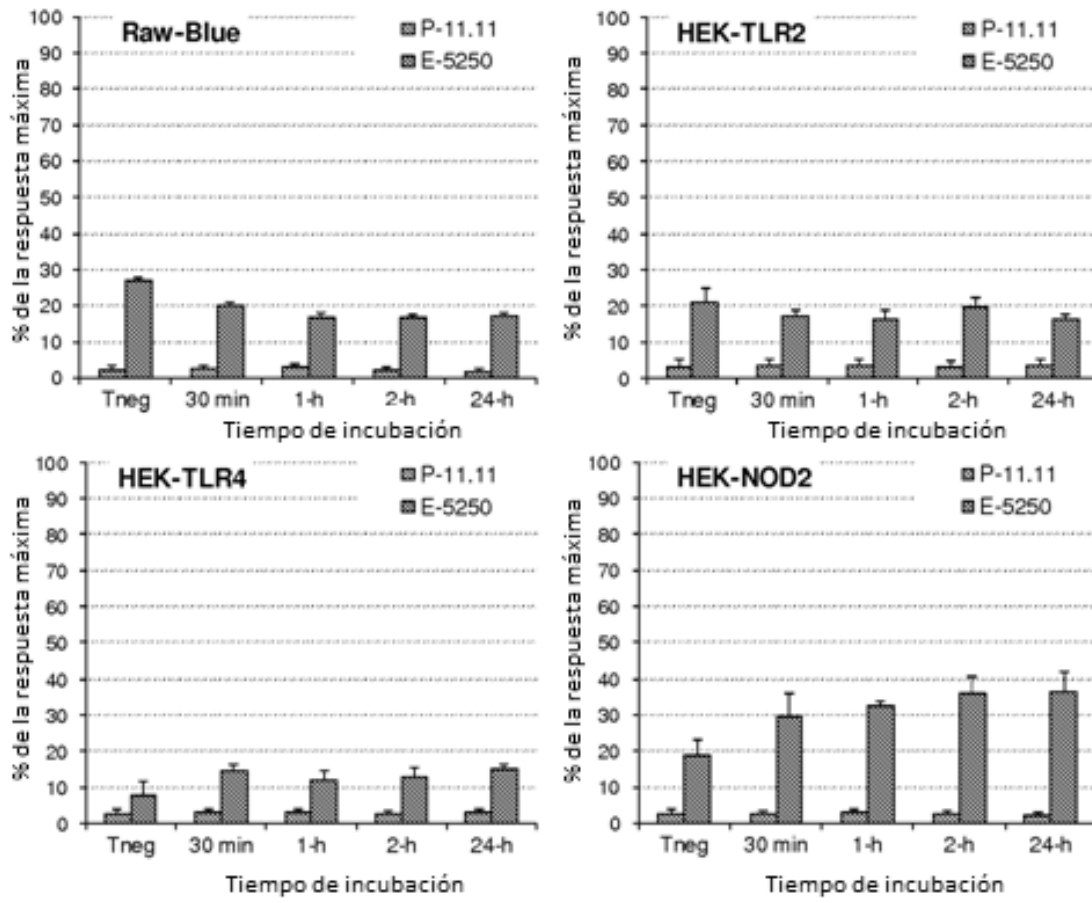


Figura 21

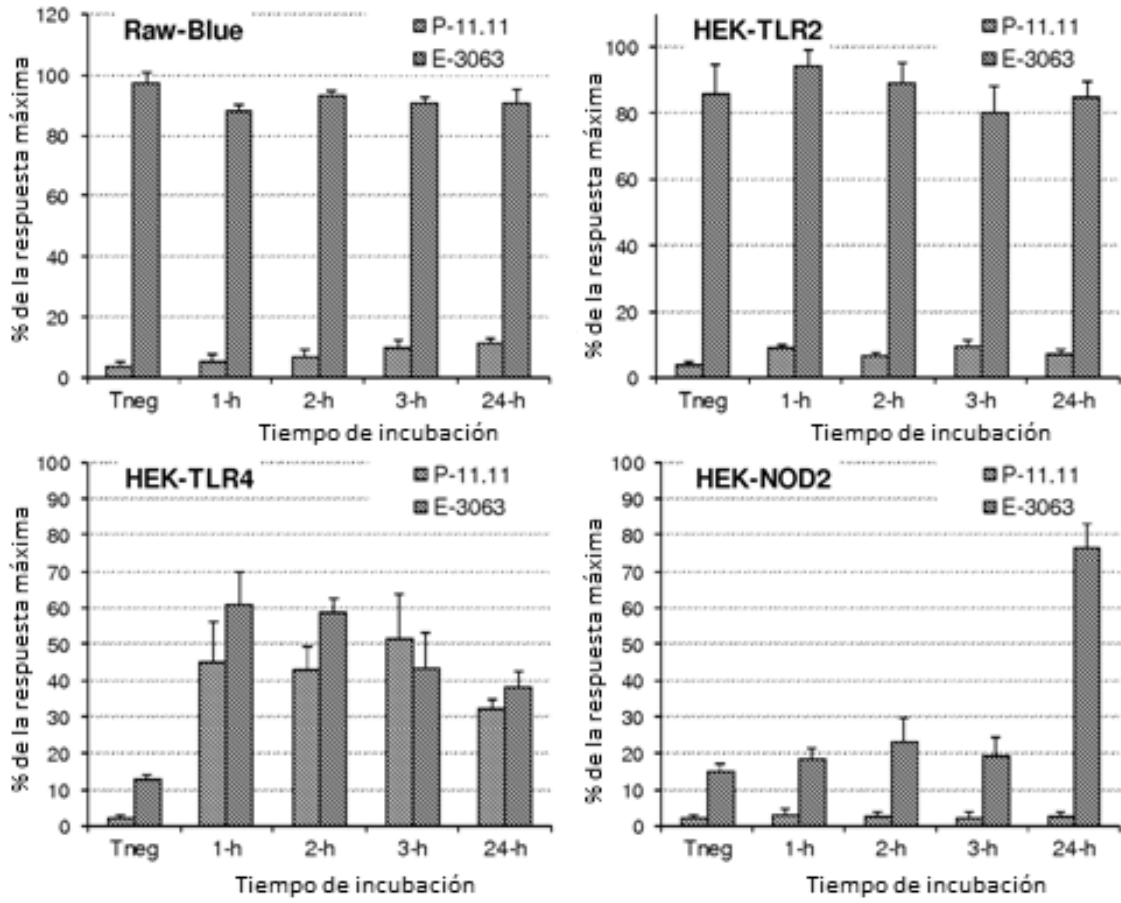


Figura 22

