

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 738 699**

51 Int. Cl.:

C08B 30/04 (2006.01)

A61K 31/718 (2006.01)

C08B 30/18 (2006.01)

C12P 19/04 (2006.01)

C12P 19/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.06.2016 PCT/FR2016/051325**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2016 WO16193634**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.06.2016 E 16741056 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 3303409**

54 Título: **Procedimiento optimizado de descontaminación del almidón utilizado como materia prima para la obtención de polímeros de glucosa destinados a la diálisis peritoneal**

30 Prioridad:

04.06.2015 FR 1555077

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

24.01.2020

73 Titular/es:

**ROQUETTE FRÈRES (100.0%)
1 rue de la Haute Loge
62136 Lestrem, FR**

72 Inventor/es:

**LANOS, PIERRE;
DUPONT, THIERRY;
ALLAIN, FABRICE;
CARPENTIER, MATHIEU;
HACINE-GHERBI, HÉLA y
DENYS, AGNÈS**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 738 699 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento optimizado de descontaminación del almidón utilizado como materia prima para la obtención de polímeros de glucosa destinados a la diálisis peritoneal

5 La presente invención se refiere a la elaboración de un procedimiento optimizado de descontaminación de los almidones utilizados en los circuitos de producción de polímeros de glucosa, más particularmente los destinados a los ámbitos médicos, más particularmente aún al de la diálisis peritoneal.

Técnica anterior de la invención

10 La compañía solicitante ha elegido desarrollar su invención en un campo conocido por la peligrosidad de los contaminantes de origen microbiano susceptibles de desarrollarse en los circuitos de producción de los polímeros de glucosa origen de posibles reacciones inflamatorias muy nefastas para la salud humana.

En el ámbito de un enfoque de seguridad sanitaria, es importante asegurarse de la ausencia de contaminantes de origen microbiano, tanto en forma de células vivas como de restos celulares, por todos los medios técnicos adecuados, especialmente:

- la definición de métodos de identificación y de evaluación eficaces de los contaminantes,
- 15 - la definición de circuitos de producción seguros, mediante la elaboración de dispositivos y de técnicas de purificación adaptados.

En el caso de la diálisis peritoneal, un cierto número de ingredientes deben prepararse en las condiciones de pureza más estrictas.

20 La diálisis peritoneal es, en efecto, un tipo de diálisis que tiene como objetivo eliminar los desechos tales como la urea, la creatinina, el exceso de potasio o el excedente de agua que los riñones no logran, o que ya no consiguen, depurar del plasma sanguíneo. Este tratamiento médico está indicado en caso de insuficiencia renal crónica terminal.

Los dializados más habitualmente utilizados son compuestos de una solución tampón (lactato o bicarbonato) a pH ácido (5,2 – 5,5) o fisiológico (7,4) a la cual se añaden:

- unos electrolitos (sodio, calcio, magnesio, cloro) y sobretodo
- 25 - un agente osmótico, principalmente un polímero de glucosa, tal como por ejemplo la "icodextrina" presenta en la solución para diálisis peritoneal ambulatoria EXTRANEAL® comercializada por la compañía BAXTER.

En este campo más particular de la utilización de los polímeros de glucosa destinados a la diálisis peritoneal continua y ambulatoria, se puso de manifiesto muy rápidamente que estos hidrolizados de almidón (mezcla de glucosa, de oligómeros y de polímeros de glucosa) no podían utilizarse tal cual.

30 La solicitud de patente europea EP 207.676 enseña que se prefieren unos polímeros de glucosa que forman unas soluciones límpidas e incoloras con un 10% en agua, que tiene un peso molecular medio en peso (Mw) de 5.000 a 100.000 Daltons y un peso molecular medio en número (Mn) inferior a 8000 Daltons.

35 Tales polímeros de glucosa comprenden también de manera preferida al menos un 80% de polímeros de glucosa cuyo peso molecular está comprendido entre 5.000 y 50.000 Daltons, poco o nada de glucosa o de polímeros de glucosa de 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 de 600).

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

40 Los procedimientos propuestos en la solicitud de patente EP 207.676 para obtener estos polímeros de glucosa de bajo índice de polimolecularidad a partir de hidrolizados de almidón consisten:

- o bien en efectuar una precipitación de una maltodextrina con la ayuda de un disolvente miscible al agua,
- o bien en efectuar una filtración molecular de esta misma maltodextrina a través de diferentes membranas que poseen un umbral de corte o de exclusión adecuado.

45 En los dos casos, estos procedimientos tienen como objetivo eliminar al mismo tiempo los polímeros de muy alto peso molecular y los monómeros u oligómeros de bajo peso molecular.

Sin embargo, estos procedimientos no dan satisfacción tanto desde el punto de vista de su realización como desde el punto de vista de los rendimientos y de la calidad de los productos que permiten obtener.

- Interesada por desarrollar un procedimiento de fabricación de un polímero de glucosa completamente soluble en el agua y de bajo índice de polimolecularidad, preferiblemente inferior a 2,5, que tenga preferentemente un Mn inferior a 8.000 Daltons y que posea un Mw comprendido entre 12.000 y 20.000 Daltons, procedimiento que esté desprovisto de los inconvenientes de la técnica anterior, la compañía solicitante se centró en resolver este problema en su patente EP 667.356 partiendo de un almidón en lugar de una maltodextrina
- 5 El polímero de glucosa obtenido por fraccionamiento cromatográfico contiene entonces preferentemente menos del 3% de glucosa y de polímeros de glucosa de DP inferior o igual a 3 y menos del 0,5% de polímeros de glucosa de DP superior a 600.
- Riesgos de contaminación
- 10 Sin embargo, hay que lamentar los riesgos de contaminación microbiana de las preparaciones destinadas a la diálisis peritoneal.
- En efecto, es conocido que los circuitos de producción de los polímeros de glucosa pueden contaminarse por microorganismos, o por unas sustancias pro-inflamatorias contenidas en dichos microorganismos.
- 15 En el caso en el que el procedimiento de fabricación de los polímeros de glucosa parte del almidón, se describe clásicamente en la industria del almidón la contaminación de los almidones de maíz (o de trigo) debida a microorganismos de tipo levaduras, mohos y bacterias, y más particularmente por bacterias acidotermófilas, de tipo *Alicyclobacillus acidocaldarius* (bacterias extremófilas que se desarrollan en las zonas calientes y ácidas del circuito).
- El riesgo principal para el paciente que recibe estos polímeros de glucosa contaminados es entonces la peritonitis.
- 20 Estos episodios de peritonitis son provocados por unas infecciones bacterianas intraperitoneales, y el diagnóstico es de manera habitual fácilmente establecido por los cultivos positivos de dializado.
- La "peritonitis estéril" descrita como peritonitis aséptica, química, o de cultivo-negativo, es típicamente provocada por un irritante químico o un cuerpo extraño.
- 25 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 relacionados con causas diversas y especialmente la inducción por sustancias pro-inflamatorias potencialmente presentes.
- Los episodios inflamatorios asépticos son por lo tanto unas complicaciones principales observadas de la inyección de soluciones de diálisis.
- 30 Si una parte de estos episodios inflamatorios está relacionada con un problema de orden químico (inyección accidental de contaminantes químicos o malas dosificaciones de algunos compuestos), la mayoría de los casos se asocia directamente a la presencia de contaminantes de origen microbiano presentes en las soluciones que sirven para la preparación de las 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 incluso cuando están presentes en estado de trazas.
- 35 Por otro lado, es mérito de la compañía solicitante haber tenido en cuenta también la presencia de moléculas susceptibles de exacerbar la respuesta inflamatoria inducida por estos contaminantes, tales como los productos de despolimerización de los PGN, cuya estructura mínima aún bioactiva es el muramil-dipéptido (MDP).
- 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 también una actividad sinérgica importante. En el origen, estos péptidos fueron identificados por su actividad quimio-atrayente sobre los leucocitos, aunque son incapaces de inducir una respuesta citoquímica de por sí.
- 40 Por lo tanto, es importante no despreciar estas "pequeñas moléculas" ya que pueden dar cuenta indirectamente de los episodios inflamatorios asépticos exacerbando los efectos de trazas de PGN y/o de LPS.
- Definición de métodos de identificación y de evaluación eficaces de dichos contaminantes
- 45 La compañía solicitante se empleó por lo tanto en desarrollar unos métodos de detección y de evaluación más eficaces que los accesibles en el estado de la técnica.
- Estos últimos años, numerosos ensayos que utilizan unas células primarias se han desarrollado para sustituir los modelos animales en los ensayos de respuesta inflamatoria.
- Sin embargo, estos modelos *in vitro* están sujetos a una importante variabilidad interindividual, que puede ser responsable de los sesgos experimentales.

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

5 Es también importante señalar que la respuesta inflamatoria exacerbada es visible para las citoquinas de la fase aguda de la inflamación, tales como:

- TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa)

- IL-1 β (interleucina 1 β) y

10 - las quimioquinas tales como CCL5 (quimiocina (unidad C-C) ligando 5)/RANTES (Regulada tras Activación, Expresada y Secretada por células T normales), pero nada o poco para IL-6 (interleucina 6).

Así, los métodos basados en la producción e IL-6 (US 2009/0239819 y US 2007/0184496) no están adaptados para detectar unos contaminantes en mezcla en una solución.

15 Por lo tanto, es mérito de la compañía solicitante haber desarrollado en su solicitud de patente internacional WO 2012/143647 unos métodos sensibles y eficaces de detección de los contaminantes microbianos que tienen una acción pro-inflamatoria, por debajo del umbral de sensibilidad de los procedimientos actualmente utilizados y/o descritos en la bibliografía, y ulteriormente haber identificado la familia, incluso la naturaleza, de las moléculas pro-inflamatorias presentes en formas de trazas en los lotes que provienen de los circuitos de producción.

Determinación de la eficacia de las etapas unitarias de purificación

20 La compañía solicitante ha buscado después definir mejor las etapas claves de purificación a realizar sobre los polímeros de glucosa destinados a la diálisis peritoneal.

Para ello, se empeñó en validar las etapas claves unitarias de purificación, empleando los métodos de detección y de evaluación basados en las líneas monocitarias tales como se presentan en su solicitud de patente internacional WO 2012/143647.

25 Así, en su solicitud de patente internacional WO 2013/178931, la compañía solicitante ha analizado la eficacia de las etapas unitarias siguientes realizadas en los polímeros de glucosa destinados a la diálisis peritoneal:

- tratamiento térmico,

- acidificación,

- paso sobre carbono activado,

- paso sobre resinas de adsorción, de ultrafiltración, de filtración,

30 - hidrólisis química o enzimática.

35 En una reciente solicitud de patente no examinada todavía, la compañía solicitante se centró en definir una combinación de varias etapas de contaminación juiciosamente seleccionadas y ordenadas por su eficacia para eliminar todas las moléculas inflamatorias susceptibles de estar presentes en los polímeros de glucosa procedente del procedimiento de fabricación, sea cual sea la naturaleza de la contaminación. El procedimiento de esta invención se refiere así a la combinación de etapas siguientes, llevadas a cabo en los polímeros de glucosa destinados a la diálisis peritoneal:

- tratamiento mediante una preparación enzimática con propiedades detergentes y de clarificación,

- tratamiento mediante carbono activado de muy alta capacidad de adsorción, de calidad farmacéutica, y de porosidad "microporosa";

40 - facultativamente, tratamiento con un segundo carbono activado con porosidad "mesoporosa",

- paso sobre una resina adsorbente polimérica macroporosa, que presenta una porosidad superior a 100 angstrom; y

- ultrafiltración en continuo sobre 5 kDa.

45 Aunque estos trabajos han permitido definir la mejor combinación capaz de asegurar los polímeros de glucosa destinados a la diálisis peritoneal de cualquier contaminante potencial, aún sigue habiendo una necesidad no satisfecha de elaborar previamente un procedimiento optimizado de descontaminación de la fuente incluso de los contaminantes potenciales de los circuitos de producción de los polímeros de glucosa destinados a la diálisis

peritoneal, en este caso el almidón de maíz Waxy (denominado ceroso) y de hidrolizado bruto de almidón, que entran en el circuito de preparación de dichos polímeros de glucosa.

5 En efecto, disponer de un procedimiento susceptible de tratar eficazmente el almidón de maíz Waxy contaminado naturalmente por unos restos celulares de microorganismos de tipo levaduras, mohos o bacterias, permitiría entonces simplificar cualquier tratamiento ulterior de los polímeros de glucosa que proceden de ello.

Tal tratamiento de descontaminación en la fuente sobre unos productos brutos conducirá efectivamente a reducir la carga en contaminantes susceptibles de contaminar los circuitos de producción de los polímeros de glucosa y contribuirá así a asegurarlos, permitiendo satisfacer los requisitos previos de las industrias farmacéuticas en materia de grado de purificación de los productos destinados a la diálisis peritoneal.

10 Descripción detallada de la invención

La presente invención propone por lo tanto una combinación de varias etapas de descontaminación juiciosamente seleccionadas y ordenadas que se revela eficaz para eliminar todas las moléculas inflamatorias susceptibles de estar presentes en los almidones e hidrolizados de almidón utilizados como materia prima para la preparación de polímeros de glucosa destinados a la diálisis peritoneal, sea cual sea la naturaleza de la contaminación.

15 El procedimiento conforme a la invención de descontaminación de los almidones utilizados como materia prima para la preparación de polímeros de glucosa destinados a la diálisis peritoneal, comprendiendo el procedimiento las etapas siguientes:

- preparación de un almidón de maíz Waxy,
- 20 - suspensión del almidón Waxy a una concentración comprendida entre el 20 y el 40% de materia seca en un agua del proceso a un pH comprendido entre aproximadamente 5 y aproximadamente 6, en particular aproximadamente 5,5,
- tratamiento de la suspensión de almidón por una solución de ácido peracético a una concentración comprendida entre 100 y 500 ppm, preferentemente de 300 ppm,
- 25 - escurrido del almidón y después recogida en un agua desmineralizada ajustada a pH comprendido entre aproximadamente 5 y aproximadamente 6, en particular aproximadamente 5,5 y a una concentración comprendida entre el 20 y el 40% de materia seca,
- elevación de la temperatura comprendida entre aproximadamente 100°C y 110°C, preferentemente a aproximadamente 107°C, después adición de la α -amilasa durante aproximadamente 10 a 20 minutos, preferentemente aproximadamente 15 minutos,
- 30 - facultativamente, tratamiento por una preparación enzimática con propiedades detergentes y de clarificación,
- filtración de la suspensión sobre lecho de diatomeas,
- tratamiento por un carbono activado de muy alta capacidad de adsorción, de calidad farmacéutica, y de porosidad "microporosa",
- 35 - tratamiento por un segundo carbono activado de porosidad "mesoporosa",
- facultativamente, paso por una resina adsorbente polimérica macroporosa, que presenta una porosidad superior a 100 angstrom,
- facultativamente, ultrafiltración en continuo sobre 5 kDa,
- filtración de seguridad sobre filtro estéril de porosidad 0,22 μ m.

40 Las etapas del procedimiento se tienen que realizar en el orden de aparición.

En un modo de realización preferido, se realizan todas las etapas del procedimiento, incluyendo las facultativas.

En el sentido de la invención, se entiende por:

- 45 - "agua del proceso", todo o parte del agua utilizada en el circuito de producción de almidón húmedo que se recicla en el mismo (véase especialmente el esquema 5 del documento *Bilan énergétique des industries de transformation des céréales dans la CEE* en internet en la dirección file:///J:/CDNA10994FRC_001.pdf)
- "preparación enzimática con propiedades detergentes y de clarificación": actividades enzimáticas de tipo mananasa, tal como la Mannaway® comercializada por la compañía Novozymes;

- "carbóno activado de muy alta capacidad de adsorción, de calidad farmacéutica y de porosidad "microporosa": un carbóno activado de porosidad equivalente al carbóno activado Norit C Extra USP;
 - "carbóno activado con porosidad "mesoporosa"": un carbóno activado de porosidad equivalente al carbóno activado ENO-PC;
- 5 - "resina adsorbente polimérica macroporosa, que presenta una porosidad superior a 100 angstrom": resina de tipo DOWEX OPTIDORE SD2.
- "aproximadamente" significa más o menos un 10% del valor, preferentemente más o menos un 5%. Por ejemplo, aproximadamente 100 significa entre 90 y 110, preferentemente entre 95 y 105. Esto designa también el valor exacto.
- 10 Los contaminantes pro-inflamatorios son sobretodo unas moléculas de origen bacteriano.
- Pueden ser en particular:
- PGN,
 - LPS,
 - lipopéptidos,
- 15 - productos de despolimerización de PGN, en particular MDP,
- péptidos microbianos formilados como f-MLP,
 - β-glucanos,
 - etc.
- 20 Los métodos de medición de las respuestas inflamatoria *in vitro* que se utilizan en el ámbito de la presente invención para controlar la eficacia de las etapas de descontaminación de los procedimientos de preparación de polímeros de glucosa para uso terapéutico en el hombre (por ejemplo soluciones de diálisis peritoneal) se basan en ensayos celulares ("bio ensayos") 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™), ensayos celulares desarrollados por la compañía solicitante a partir de líneas celulares comerciales y detalladas en sus solicitudes de patente anteriores.
- 25 Se usan así preferentemente cinco líneas:
- línea Raw-Blue™: esta línea procedente de macrófagos murinos responde a la mayoría de los contaminantes pro-inflamatorios susceptibles de estar presentes en las matrices y derivados de polímeros de glucosa (PGN, lipopéptidos, LPS, zymosan, LTA). Su utilización permite por lo tanto estimar la carga global en moléculas pro-inflamatorias presentes en las muestras.
- 30 - línea HEK-Blue™ hTLR2: esta línea que expresa el receptor hTLR2 responde específicamente a los agonistas del TLR2 (PGN y lipopéptidos sobretodo). Su utilización permite por lo tanto conocer el porcentaje de estos contaminantes en el inicio 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 porcentaje de estos contaminantes en el inicio 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 porcentaje de MDP y moléculas relacionadas en la inducción de las respuestas inflamatorias,
- línea HEK-Blue™ Null2: se trata de una línea control, no transfectada por un receptor de la inmunidad. Su utilización es necesaria para verificar que las soluciones de polímeros de glucosa o de sus hidrolizados no inducen la producción de SEAP por un mecanismo de toxicidad.
- 40 Sin embargo, cabe señalar que el experto en la materia puede también utilizar otras líneas comerciales (IMGENEX) o puede prepararlas.
- 45 En un modo de realización preferido, las líneas celulares se utilizan a una densidad comprendida entre 0,5 a 1 x 10⁶ células/ml de medio de cultivo, y poner en contacto la preparación de polímeros de glucosa o sus hidrolizados con las células dura aproximadamente 16 a 24h.

Una cuantificación de los contaminantes se puede realizar con la ayuda de una curva dosis-respuesta. Esta curva dosis-respuesta puede realizarse especialmente con las mismas células, en las mismas condiciones, con unas dosis crecientes de contaminantes. Las curvas dosis-respuestas son en particular realizadas con unos estándares de LPS, PGN, lipopéptido y MDP.

5 Preferentemente, tal curva dosis-respuesta se puede realizar para las células que expresan TLR4 (por ejemplo, THP-1, HEK-Blue™ hTLR4 y Raw-Blue™) con unas dosis crecientes de LPS, para las células que expresan TLR2 (por ejemplo, THP-1, HEK-Blue™ hTLR2 y Raw-Blue™) con unas dosis crecientes de PGN, y para las células reactivas vía NOD2 (por ejemplo, HEK-Blue™ hNOD2) con una dosis creciente de MDP.

10 Los ensayos celulares se pueden realizar como se describe en las solicitudes de patente de la solicitante: WO2012/143647 y WO2013/178931.

15 Después de la preparación de la suspensión de almidón Waxy a una concentración comprendida entre el 20 y el 40% de materia seca en un agua del proceso a un pH comprendido entre aproximadamente 5 y aproximadamente 6, en particular aproximadamente 5,5, la primera etapa de descontaminación propiamente dicha del procedimiento conforme a la invención consiste en un tratamiento por el ácido peracético. El ácido peracético se puede utilizar a una concentración comprendida entre 100 y 500 ppm. De manera preferida, se recogerá agua tratada con 300 ppm de ácido peracético. El tiempo de contacto es de aproximadamente 2 horas, a una temperatura comprendida entre aproximadamente 5 y aproximadamente 15°C, preferentemente a aproximadamente 10°C. Este tratamiento del almidón por el ácido peracético ha demostrado una eficacia para reducir los contaminantes en cualquier etapa posterior del procedimiento, especialmente con respecto a los contaminantes de tipo PGN. Este efecto es aún más importante cuando se usa el agua del proceso para preparar la suspensión de almidón.

20 La etapa siguiente, después de escurrir el almidón y recoger este después en un agua desmineralizada ajustada a pH comprendido entre aproximadamente 5 y aproximadamente 6, en particular aproximadamente 5,5 y a una concentración comprendida entre el 20 y el 40% de materia seca, es la licuefacción del almidón. La licuefacción del almidón se realiza colocando la suspensión a una temperatura comprendida entre aproximadamente 100°C y 110°C, preferentemente aproximadamente 107°C, y añadiendo α -amilasa. La hidrólisis enzimática dura aproximadamente 10 a 20 minutos, preferentemente 15 minutos aproximadamente.

25 La etapa siguiente puede consistir, de manera opcional, en un tratamiento por una preparación enzimática con propiedades detergentes y de clarificación.

30 Esta actividad enzimática de tipo mananasa, tal como la preparación enzimática Mannaway® comercializada por la compañía Novozymes que se ha mostrado eficaz para disociar los macro-complejos tales como los restos bacterianos y PGN de peso molecular elevado.

Por lo tanto, se utilizará si los análisis del almidón licuado e hidrolizado revelan un porcentaje elevado de contaminantes de tipo PGN.

35 La actividad de esta preparación enzimática es óptima cuando se utiliza a una concentración final del 0,4% (v/v) en la solución de polímeros de glucosa al 32% (peso/v) ajustada a pH 10 con NaOH, durante un tiempo de tratamiento de 24h a 50°C.

Después del tratamiento, la solución se filtra sobre un lecho de diatomeas, como se ejemplificará a continuación.

La etapa siguiente consiste después en un tratamiento por dos carbonos activados en cascada:

40 1) un primer carbono activado de muy alta capacidad de adsorción, de calidad farmacéutica, de porosidad "microporosa".

La compañía solicitante recomienda utilizar un carbono activado de tipo Norit C Extra USP. El carbono C-extra-USP se muestra en efecto eficaz para eliminar los PGN y sus productos de degradación.

Su acción es máxima cuando se añade a la concentración final del 0,5% (peso/volumen) en la solución de polímeros de glucosa al 32% (peso/v), ajustada a pH 4,5 con HCl.

45 El tratamiento se realiza bajo agitación durante 1h a 80°C.

2) un segundo carbono activado de porosidad "mesoporosa".

Aquí, se prefiere un carbono activado de tipo ENO-PC. Esta calidad de carbono activado tiene un espectro de acción amplio y permite eliminar preferiblemente las moléculas de peso molecular < 100 kDa (por ejemplo, LPS y productos de degradación de PGN).

50 Se utiliza aquí también en una cantidad del 0,5% a pH 4,5 durante 1h a una temperatura de 80°C.

La solución obtenida después del paso sobre estos dos carbonos activados se filtra finalmente sobre membrana de umbral de porosidad de 3 μm .

La etapa siguiente opcional, consiste en un tratamiento sobre una resina adsorbente polimérica macroporosa, que presenta una porosidad superior a 100 angstrom.

- 5 Se selecciona la resina Dowex SD2, que presenta un espectro más amplio de eliminación de las moléculas contaminantes (diferentes de los PGN) que otras resinas de la misma familia.

Como se ejemplificará a continuación, las soluciones de polímeros de glucosa al 32% (250 ml) son eluidas sobre una columna que contiene 20 ml de esta resina.

- 10 Esta etapa se recomienda para las materias primas altamente cargadas de LPS y/o tratadas por una preparación enzimática con propiedades detergentes y de clarificación.

De manera también opcional, la etapa siguiente consiste en una ultrafiltración en continuo sobre una membrana que tiene un umbral de corte a 5 kDa.

Esta etapa se recomienda para las materias primas altamente cargadas de productos de despolimerización de los PGN.

- 15 La última etapa consiste en una filtración de seguridad sobre membrana que presenta un umbral de corte de 0,22 μm .

La invención se entenderá mejor con la ayuda de los ejemplos siguientes, lo cuales son ilustrativos y no limitativos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Características de las líneas celulares utilizadas para los ensayos de respuestas inflamatorias

- 20 Las curvas de respuesta a dosis se realizan con unas moléculas agonistas estándares: LPS, PGN y MDP, solubilizadas en una solución de maltodextrina no contaminada (PGN < 1 ng/g; LPS < 0,5 ng/g; MDP < 0,2 ng/g) a 32% (peso/volumen) en agua apirógena (p.p.i.), según la enseñanza de la solicitud de patente internacional WO 2013/178931 de la compañía solicitante.

Las células Raw-Blue™ y HEK-Blue™ hTLR2, hTLR4, hNOD2 y Null2 se incuban con unas concentraciones crecientes en agonistas, y la respuesta celular se mide por cuantificación de la actividad SEAP:

- 25
- Línea Raw-Blue™: las células responden a las moléculas inflamatorias principales susceptibles de estar presentes en las matrices y derivados de polímeros de glucosa (PGN y LPS); tienen especialmente una fuerte reactividad frente a PGN, pero no responden a sus productos de despolimerización (MDP).
- 30
- Línea HEK-Blue™ hTLR2: fuerte reactividad frente a PGN; las células no muestran ninguna reactividad frente a LPS y MDP,
 - Línea HEK-Blue™ hTLR4: fuerte reactividad frente a LPS; las células no muestran ninguna reactividad frente a PGN y MDP,
 - Línea HEK-Blue™ hNOD2: fuerte reactividad vis-a-vis du MDP; las células no muestran ninguna reactividad frente a PGN y LPS,
- 35
- Línea HEK-Blue™ Null2: control de ausencia de toxicidad celular; las células no muestran ninguna reactividad frente a PGN, LPS y MDP.

Ejemplo 2: Preparación de las materias primas de polímeros de glucosa

Las etapas de preparación de las materias primas se han realizado todas a escala piloto.

Las materias primas se preparan a partir de almidón Waxy suspendido a una concentración comprendida entre el 20 y el 40% de materia seca (peso/volumen).

- 40 El almidón en suspensión se deja una noche a 4°C, se escurre, y después se resuspende en agua ajustada a pH 5,5 a una concentración comprendida entre el 20 y el 40%. La suspensión se calienta entonces a 107°C y después se trata en presencia de α -amilasa durante 15 min. Después de la licuefacción, la reacción enzimática se detiene por adición de HCl 1N (pH 4), y los productos de licuefacción se filtran sobre un lecho de diatomeas (40 μm).

- 45 Según los ensayos, el almidón se pone en solución en agua desmineralizada o agua del proceso, a fin de estimar la parte de contaminación aportada en las materias primas por este agua de uso corriente.

Con el fin de reducir la carga en contaminantes al principio del proceso, la suspensión de almidón se puede tratar por una solución de ácido peracético al 0,03%. En este caso, el almidón Waxy se suspende a una concentración comprendida entre el 20 y el 40% (p/v), se deja una noche a 4°C, se escurre, se resuspende y después se trata en presencia de ácido peracético (300 ppm). Después de un nuevo escurrido, el almidón se resuspende en agua desmineralizada ajustada a pH 5,5 a una concentración comprendida entre el 20 y el 40% (p/v). Como anteriormente, la solución se calienta, después se añade α -amilasa durante 15 min. La reacción se detiene por adición de HCl 1N (pH 4) y después se filtra.

Las enseñanzas de la solicitud de patente internacional WO 2013/178931 de la compañía solicitante han mostrado que la preparación enzimática Mannaway® es eficaz para disociar macro-complejos tales como restos bacterianos y PGN de alto peso molecular en una preparación de polímeros de glucosa final. Su actividad es óptima cuando se utiliza a una concentración final del 0,4% (v/v) en una solución de polímeros de glucosa al 32% (peso/v) ajustada a pH 8 con NaOH, durante un tiempo de tratamiento de 24h a 50°C. Después del tratamiento, la solución se neutraliza por HCl y la enzima se inactiva por calentamiento a 85°C durante 10 minutos. Sin embargo, la preparación enzimática Mannaway® está contaminada por trazas de LPS. Además, pueden permanecer después del tratamiento trazas. A fin de tener en cuenta estas contaminaciones exógenas, la etapa de tratamiento enzimático se coloca al final de la preparación de las materias primas antes de la filtración y, en consecuencia, antes del comienzo del procedimiento de descontaminación.

Después de cada etapa, se realizan unas extracciones para analizar la carga inflamatoria global (ensayo con las células Raw-Blue™) y las cantidades de contaminantes de tipo PGN, LPS y MDP (respuestas de las células HEK-Blue™).

Ejemplo 3: Comparación de las respuestas inflamatorias inducidas por las materias primas antes de la descontaminación

El objetivo de estos ensayos es determinar la reactividad pro-inflamatoria de las materias primas, identificar la naturaleza de los bio-contaminantes, y ensayar los medios que permiten reducir sus antes de la realización del procedimiento de descontaminación. La presencia de bio-contaminantes en las diferentes materias primas se analiza con la ayuda de cinco tipos celulares, a fin de obtener una idea de las respuestas inflamatorias específicas a algunos contaminantes:

- Línea Raw-Blue™: cualquier contaminante con reactividad elevada para los PGN,
- Línea HEK-Blue™hTLR2: reactividad elevada para los PGN y los lipopéptidos,
- Línea HEK-Blue™hTLR4: reactividad elevada para los LPS,
- Línea HEK-Blue™hNOD2: MDP y productos de despolimerización de los PGN,
- Línea HEK-Blue™ Null2: control de ausencia de toxicidad celular.

Para estos ensayos celulares, las materias primas se diluyen en el medio de cultivo de las células para obtener una concentración final igual al 3,2% (p/v). Los resultados se expresan como la actividad (respuesta SEAP) con respecto a la respuesta máxima de las células.

Ensayo 1: El almidón Waxy se ha recogido a un 20% en agua a pH 5,5, después se ha tratado en presencia de α -amilasa. Se ensayan dos preparaciones:

- preparación 1: almidón Waxy + agua desmineralizada (WD)
- preparación 2: almidón Waxy + agua del proceso (WR)

Se efectuaron unas extracciones después de cada etapa del proceso: suspensión del almidón en agua, adición de α -amilasa (E), luciación (DE). Los resultados de los ensayos celulares se presentan en la figura 1.

La suspensión del almidón en agua desmineralizada (WD) ha liberado bajas cantidades de PGN y de LPS en el sobrenadante (respuestas moderadas en las células HEK-TLR2, HEK-TLR4 y Raw). La adición de la enzima (WD + E) no ha producido contaminación. Por el contrario, la licuefacción ha liberado importantes cantidades de contaminantes, como lo muestran las fuertes respuestas de la muestra DEWD medidas con HEK-TLR2 y HEK-TLR4. Estos resultados indican que los PGN y los LPS están asociados a los granos de almidón y que la licuefacción ha provocado su liberación.

En comparación con el agua desmineralizada, el agua del proceso contiene altas cantidades de PGN, ya que las respuestas TLR2 están saturadas. Se observa un aumento menor para la respuesta de las células HEK-TLR4, lo que indica la presencia de LPS en esta agua del proceso, pero a porcentajes más bajos que los PGN.

Las respuestas de las células HEK-NOD2 no son significativas con las dos preparaciones, o relativamente bajas para la observada después de la licuefacción del almidón recogido en el agua del proceso. Esta observación sugiere que los PGN están poco degradados, y por lo tanto esencialmente presentes en forma de complejos de tamaño importante.

5 Para verificar esta hipótesis, las extracciones se filtraron sobre unas unidades de microfiltración de tipo Centricon 30 (umbral de corte 30 kDa). Los ensayos celulares con HEK-TLR2 y HEK-TLR4 se realizaron sobre los filtrados y las respuestas se compararon con las obtenidas con los productos no filtrados. Los resultados se presentan en la figura 2.

10 La muestra que proviene de la suspensión del almidón en agua del proceso (WR) contiene unas cantidades elevadas de PGN y de LPS, que no se encuentran en los filtrados correspondientes. El agua del proceso sola (agua R) indujo también a fuertes respuestas en las células HEK-TLR2 y HEK-TLR4, prueba de que los contaminantes de tipo LPS y PGN presentes en la extracción WR provienen en su mayoría de la etapa de suspensión. Además, las respuestas moderadas observadas con la suspensión en agua desmineralizada (WD) confirman que el almidón no licuado libera pocos contaminantes.

15 Por el contrario, las dos muestras que provienen de la licuefacción del almidón (DWEW y DEWR) están altamente contaminadas. No se encuentra ninguna traza significativa de PGN o de LPS en los filtrados, lo que confirma su presencia en forma de moléculas o de agregados de masa molecular > 30 kDa. Estos datos respaldan, por lo tanto, la presencia de grandes moléculas, de agregados y/o de restos celulares, aportados por el agua del proceso y/o liberados de los granos de almidón por la etapa de licuefacción.

20 Ensayo 2: En este ensayo, el efecto del ácido peracético se ha evaluado realizando los experimentos sobre el mismo lote de almidón puesto en solución en agua desmineralizada.

El almidón Waxy se ha recogido a un 20% en agua a pH 5,5, después se trató en presencia de α -amilasa. Se han ensayado dos preparaciones:

- preparación 1: almidón Waxy + agua desmineralizada (WD)
- preparación 2: almidón Waxy + agua desmineralizada y después tratamiento por el ácido peracético (WAD).

25 Se han efectuado unas extracciones después de cada etapa del proceso: suspensión del almidón en agua, adición de α -amilasa (E), licuefacción (DE). Los resultados de los ensayos celulares se presentan en la figura 3.

30 La suspensión del almidón en agua desmineralizada (preparación 1) ha liberado bajas cantidades de PGN y de LPS en el sobrenadante (respuestas de la muestra WD con HEK-TLR2, HEK-TLR4 y Raw). La adición de la enzima no ha aportado contaminación. Por el contrario, la licuefacción ha liberado grandes cantidades de bio-contaminantes, como lo muestran las fuertes respuestas obtenidas con la muestra DEW en los ensayos HEK-TLR2 y HEK-TLR4. Estos resultados confirman que PGN y LPS están altamente asociados a los granos de almidón y que la licuefacción provoca su solubilización.

35 Los resultados obtenidos con la preparación 2 muestran que el ácido peracético ha tenido un efecto neutralizante sobre los PGN asociados a los granos de almidón. En efecto, no hay respuesta TLR2 en las muestras antes de la licuefacción, ya que los valores obtenidos con las muestras WAD y WAD+E están en el umbral de detección de la evaluación. Además, la respuesta TLR2 se reduce de forma importante después de la licuefacción (DEWAD frente a DEWD).

40 Por otro lado, el tratamiento tiene poco efecto sobre los LPS, ya que las respuestas TLR4 obtenidas con la preparación 2 son similares a las observadas en ausencia de ácido peracético para todas las muestras. Estos datos indican que los LPS son poco sensibles al tratamiento por el ácido peracético. Además, la presencia de estos contaminantes explica por qué la eliminación de los PGN induce sólo una reducción moderada de la respuesta inflamatoria observada con las células Raw.

45 Las respuestas HEK-NOD2 no son significativas. Esta observación indica que la acción del ácido peracético no se acompaña de la formación de productos de degradación potencialmente inflamatorios, tales como pequeños fragmentos de PGN y/o productos de despolimerización de tipo MDP, sino ciertamente por una neutralización de la actividad inflamatoria de los PGN.

Ensayo 3: En este ensayo, el efecto del ácido peracético se ha evaluado realizando los experimentos sobre el mismo lote de almidón puesto en solución en agua del proceso.

50 El almidón Waxy se ha recogido a aproximadamente un 30% de materia seca en agua a pH 5,5, después se ha tratado en presencia de α -amilasa sobre un "horno de chorro". Se han ensayado dos preparaciones:

- preparación 1: almidón Waxy se pone en solución en agua del proceso, se deja una noche a 4°C, se escurre, y después se recoge en agua del proceso ajustada a pH 5,5 (WR).

- preparación 2: almidón Waxy se pone en solución en agua del proceso, se deja una noche a 4°C, y después se trata con ácido peracético a 300 ppm. Se escurre nuevamente y después se recoge en agua desmineralizada ajustada a pH 5,5 (WRAD).

5 La preparación 1 corresponde por lo tanto al protocolo estándar. En la preparación 2, el almidón se recoge en agua desmineralizada después del tratamiento por el ácido peracético para no aportar nuevos contaminantes.

Se efectuaron unas extracciones después de las etapas de suspensión del almidón en agua del proceso y de licuefacción. Los resultados de los ensayos celulares se presentan en la figura 4.

10 Como se esperaba, el agua del proceso ha aportado una cantidad importante de PGN soluble en la preparación 1 (respuesta TLR2 para la muestra WR). Después de la licuefacción, la respuesta TLR2 se satura (DEWR), lo que confirma la liberación de contaminantes de tipo PGN asociados a los granos de almidón. Por comparación, el tratamiento con ácido peracético ha sido muy eficaz para reducir la carga en PGN en la preparación 2, ya sea aportada por el agua (WRAD) o liberada por licuefacción (DEWRAD).

15 El agua del proceso aportó también una gran cantidad de LPS solubles (respuesta TLR4 en la muestra WR), pero al contrario de lo que se observó con los PGN, la licuefacción ha liberado menos este tipo de contaminante (respuestas TLR4 para las muestras WR y DEWR). Por comparación, el ácido peracético ha tenido un efecto moderado sobre la carga en LPS, ya que se observa una ligera reducción de la carga en contaminante aportada por el agua del proceso en la preparación 2 (WRAD).

En las dos preparaciones, el agua no está cargada en MDP o fragmentos de PGN, y la licuefacción ha liberado una baja cantidad de los mismos (respuestas NOD2 similares para DEWR y DEWRAD).

20 Finalmente, las respuestas de las células Raw que reflejan la carga inflamatoria global se reducen en las muestras después de la acción del ácido peracético, lo que está en consonancia con la pérdida importante de PGN en la preparación 2 (WRAD frente a WR y DEWRAD frente a DEWR). La reactividad residual de las células Raw después de la acción del ácido peracético es por lo tanto mayoritariamente imputable a los LPS aportados por el agua del proceso.

25 En el conjunto, estos datos demuestran la eficacia del tratamiento por el ácido peracético para reducir considerablemente la carga en PGN en la materia prima antes del procedimiento de descontaminación. La ventaja de la descontaminación se continúa en las etapas posteriores del procedimiento.

30 Ensayo 4: los primeros ensayos sugieren que la mayoría de las moléculas inflamatorias aportadas por el agua del proceso y/o liberadas de los granos de almidón por la etapa de licuefacción están presentes en forma de complejos de pesos moleculares elevados, tales como unos agregados y/o unos restos celulares.

En este nuevo ensayo, se añadió un tratamiento por la enzima Mannaway® entre las etapas de licuefacción y de filtración, debido a la eficacia de esta preparación enzimática para disociar los agregados y los PGN de alto peso molecular.

35 Se recogió el almidón Waxy a aproximadamente un 30% en agua del proceso a pH 5,5, se dejó una noche, después se trató con ácido peracético a 300 ppm. Después de escurrir y de recoger en agua desmineralizada ajustada a pH 5,5, se añadió α -amilasa para la etapa de licuefacción (DEWRAD). La solución se ajustó después a pH 8 y después se trató en presencia de la preparación enzimática Mannaway® (0,4%) durante 24h a 50°C. Finalmente, la solución se filtró sobre lecho de diatomeas (DEWRADM).

40 Se efectuaron unas extracciones después de las etapas de tratamiento por el ácido peracético (WRAD), de licuefacción (DEWRAD) y de acción de la preparación enzimática Mannaway® (DEWRADM). Los resultados de los ensayos celulares se presentan en la figura 5.

45 Como se esperaba, el agua del proceso aportó una cantidad importante de PGN solubles en la preparación (WRAD). En este ensayo, el agua debía estar particularmente contaminada en PGN, ya que las respuestas TLR2 y Raw son todavía muy elevadas después de la acción del ácido peracético (WRAD), y ampliamente saturadas después de la licuefacción (DEWRAD). Sin embargo, cabe señalar una reducción de la respuesta Raw después de la acción de la Mannaway®, lo que es la prueba de que la preparación enzimática eliminó bien una parte de los contaminantes inflamatorios (DEWRADM frente a DEWRAD).

50 A diferencia del PGN, la carga en LPS se modifica poco después de la licuefacción, prueba de que la mayor parte se aporta por el agua del proceso. Por el contrario, después de la adición de la Mannaway®, se observa un fuerte aumento de la respuesta TLR4, lo que era previsible dado que esta solución está en sí misma contaminada por LPS.

Este último resultado indica que se necesitará seguramente tener en cuenta esta aportación exógena de LPS durante el procedimiento de descontaminación.

Ejemplo 4: Efecto de los procedimientos de descontaminación sobre las respuestas inflamatorias inducidas por las materias primas.

5 Se ensayaron diferentes tratamientos de descontaminación de los polímeros de glucosa (en forma de producto acabado) individualmente y en combinación, y detallados en la solicitud de patente internacional WO 2013/178931 de la compañía solicitante. Estos trabajos han permitido identificar los tratamientos más adecuados a cada tipo de contaminantes presentes en las muestras y determinar las condiciones para su aplicación sobre matrices de polímeros de glucosa.

Los inventores han querido ensayar la eficacia de estos tratamientos, elaborados sobre un producto terminado en la etapa de purificación última, en una mezcla compleja tal como el hidrolizado de almidón.

10 Lo tratamientos seleccionados son:

- tratamiento sobre carbonos activados: los carbonos activados seleccionados para el presente estudio son: C-extra-USP, por su eficacia para eliminar los PGN; ENO-PC, por su ancho espectro sobre los contaminantes de peso molecular < 100 kDa (por ejemplo, LPS y productos de degradación de los PGN).

15 La acción de los carbonos es máxima cuando se añaden a la concentración final del 0,5% (peso/volumen) en la solución de polímeros de glucosa al 32% (peso/v), ajustada a pH 4,5 con HCl 1N. El tratamiento se realiza bajo agitación durante 1h a 80°C. Después del tratamiento, la solución (500 ml) se neutraliza por NaOH y después se filtra sobre sinterizado (porosidad 3 µm). Dado que los tratamientos por carbonos se realizan por lotes y necesitan unas etapas de calentamiento, neutralización y filtración, éstos se realizan antes que los otros tratamientos.

20 - paso sobre resinas de adsorción: las resinas seleccionadas para el presente estudio son: Dowex SD2, por su amplio espectro de eliminación de los contaminantes; MN-100 por su eficacia para retener las moléculas de tipo LPS.

Para los experimentos, las soluciones de polímeros de glucosa al 32% (250 ml) se eluyen sobre una columna que contiene 20 ml de cada resina. Las enseñanzas del estudio anterior han mostrado que este procedimiento no provoca un fenómeno de saturación de las resinas por las soluciones de polímeros de glucosa.

25 - ultrafiltración sobre 5 kDa: el tratamiento por ultrafiltración tiene como objetivo eliminar las moléculas de tamaño pequeño (productos de degradación de los PGN y MDP) todavía presentes en las soluciones de polímeros de glucosa. Esta etapa es por lo tanto facultativa y se utiliza al final del procedimiento si la respuesta NOD2 es positiva.

30 Los ensayos se realizan inyectando de forma continua la solución de polímeros de glucosa sobre un filtro 5kDa a un caudal de 25 ml/min. durante 3h a temperatura ambiente. Para compensar la pérdida del filtrado, el retenido se inyecta en la solución inicial y se ajusta de forma continua al volumen inicial (100 ml) por adición de agua desmineralizada estéril.

35 Las diferentes etapas de descontaminación se realizaron en laboratorio. Después de cada etapa, se realizaron extracciones en condición estéril y se utilizaron en los ensayos celulares, a fin de evaluar la carga inflamatoria global (respuesta Raw) y las cantidades de bio-contaminantes (respuestas TLR2, TLR4 y NOD2). Para las respuestas celulares saturadas, las muestras se diluyeron previamente (1/10 y 1/100).

Las concentraciones en contaminantes se calcularon refiriéndose a las curvas de respuestas a dosis producidas con unas moléculas agonistas estándares: LPS, PGN y MDP, descritas en el ejemplo 1 y establecidas según la enseñanza de la solicitud de patente internacional WO 2013/178931 de la compañía solicitante.

40 Las concentraciones en contaminantes se redujeron después a la cantidad de polímero de glucosa presente en la muestra. Después, los valores obtenidos después de cada etapa de descontaminación se compararon con los de la materia prima de partida, a fin de estimar la eficacia de los procedimientos de descontaminación. Los resultados se expresan en porcentaje de reducción con respecto a la carga inicial de contaminantes y de contaminación residual con respecto a los umbrales límites de detección (SLD) de cada *bio-ensayo* (en ng por g de polímero de glucosa):
45 HEK-TLR2, < 1 ng PGN; HEK-TLR4, < 0,5 ng LPS; HEK-NOD2, < 0,2 ng MDP; Raw, < 2 ng PGN

Se analizaron los procedimientos siguientes:

50 - Procedimiento 1: En este primer ensayo de descontaminación, se ha preparado la materia prima siguiendo el protocolo descrito en el ejemplo 3, ensayo 3: almidón Waxy (a aproximadamente un 20%) puesto en solución en agua del proceso, dejado una noche a 4°C (WR), y después tratado por ácido peracético a 300 ppm. Se escurre y después se recoge en agua desmineralizada a pH 5,5 (WRAD). Licuefacción y después filtración sobre lecho de diatomeas (DEWRAD).

La materia prima que corresponde a la muestra DEWRAD se descontaminó después utilizando la combinación siguiente:

1. tratamiento por carbono C extra USP (0,5%), seguido de una filtración sobre sinterizado (3 µm).
2. tratamiento por carbono ENO-PC (0,5%), seguido de una filtración sobre sinterizado (3 µm),
3. paso sobre una columna de resina SD2,
4. filtración en filtro estéril (0,22 µm).

5 Se efectuaron unas extracciones después de las diferentes etapas de preparación de la materia prima después del procedimiento de descontaminación.

Los resultados de los ensayos celulares se presentan en la figura 6.

10 En primer lugar, el tratamiento por el ácido peracético (WRAD frente a WR) ha reducido el contenido en PGN antes de la licuefacción (respuestas TLR2 y Raw), pero no ha tenido ningún efecto significativo sobre los LPS (respuesta TLR4). La licuefacción ha liberado unas cantidades importantes de PGN asociados a los granos de almidón, ya que las respuestas TLR2 y Raw se saturan para la muestra DEWRAD, mientras que la respuesta TLR4 aumenta sólo muy ligeramente. Se puede concluir que en este ensayo, el almidón estaba muy cargado de PGN, ya que se tiene una saturación de las respuestas TLR2 y Raw, incluso después de la acción del ácido peracético (figura 6A).

15 Para calcular la eficacia de las etapas de descontaminación, las concentraciones iniciales en contaminantes se determinaron a partir de la muestra DEWRAD para cada tipo celular; para las respuestas celulares saturadas (TLR2 y Raw), la muestra se diluyó al 1/100 previamente, después los valores de concentración se corrigieron por el factor de dilución. Las concentraciones residuales en contaminantes se calcularon después de cada etapa de descontaminación, después los valores se relacionaron con las concentraciones iniciales a fin de expresar los resultados en porcentaje de reducción (figura 6B y tabla I).

20 De manera muy sorprendente, el procedimiento de descontaminación ha permitido una reducción muy marcada de la respuesta TLR2, con una reducción de la carga en PGN > 99,9% (umbral de detección). Además, los carbonos C-extra-USP y ENO-PC en serie tienen un efecto aditivo sobre la eliminación de los PGN antes del paso sobre resina, lo que refuerza la elección de estos dos carbonos por su acción complementaria.

25 El procedimiento es también eficaz para reducir la respuesta NOD2, dado que el umbral límite de detección se alcanza para esta línea celular al final del proceso. En comparación con el PGN, la reducción es sólo del 90%, pero este valor está relacionado con el hecho de que los agonistas NOD2 (productos de despolimerización de los PGN y MDP) estaban presentes en estado de trazas en la materia prima de partida.

30 La eliminación de los LPS es > 99,9% al final del procedimiento, y la respuesta TLR4 alcanza también el umbral límite de detección. Se puede observar que el paso sobre la resina SD2 es para alcanzar este umbral de descontaminación. En efecto, aún están presentes trazas significativas de LPS después del tratamiento con los dos carbonos. Sin embargo, la materia estaba fuertemente contaminada en LPS, lo que puede explicar por que la acción combinada de dos carbonos no fue suficiente para eliminar todo.

35 Finalmente, la respuesta de las células Raw confirma la eficacia de este primer procedimiento para eliminar todos los tipos de contaminantes presentes en la materia prima. En efecto, no se observa ya respuesta inflamatoria significativa (< umbral límite de detección), lo que refleja una reducción > 99,9% de la carga inflamatoria global.

Tabla I: Valores de reducción (en % de la carga inicial) y de carga residual al final del proceso de descontaminación				
	HEK-TLR2	HEK-TLR4	HEK-NOD2	Raw
Reducción (%)	> 99,9	> 99,9	> 90	> 99,9
Cargas residuales	< 1 ng/g	< 0,5 ng/g	< 0,2 ng/g	< SLD
<i>SLD, umbral límite de detección</i>				

40 - Procedimiento 2: el primer ensayo sugiere que la resina SD2 puede utilizarse de manera facultativa con la condición de que el porcentaje de LPS no sea demasiado elevado en la materia prima. Para probar esta hipótesis, se ha preparado una materia prima siguiendo el protocolo descrito anteriormente: almidón Waxy (a aproximadamente un 20%) puesto en solución en el agua del proceso, dejado una noche a 4°C (WR), después tratado con ácido peracético a 300 ppm. Se escurre y después se recoge en agua desmineralizada a pH 5,5 (WRAD). Licuefacción y después filtración sobre lecho de diatomeas (DEWRAD).

La materia prima que corresponde a la muestra DEWRAD se descontaminó después utilizando una combinación “simplificada” sin paso sobre resina SD2.

1. tratamiento por carbono C extra USP (0,5%), seguido de una filtración sobre sinterizado (3 μm).
2. tratamiento por carbono ENO-PC (0,5%), seguido de una filtración sobre sinterizado (3 μm),
- 5 3. filtración en filtro estéril (0,22 μm).

Se efectuaron unas extracciones después de las diferentes etapas de preparación de la materia prima después del procedimiento de descontaminación.

Los resultados de los ensayos celulares se presentan en la figura 7.

10 Antes de la licuefacción, la respuesta TLR2 obtenida con la muestra WR se satura, lo que indica que el agua del proceso está muy contaminada por PGN. El tratamiento con el ácido peracético reduce parcialmente esta contaminación (WRAD), pero la licuefacción libera nuevos PGN, ya que la respuesta TLR2 se satura de nuevo con la muestra DEWRAD. A la inversa, las contaminaciones en LPS (respuestas TLR4) siguen siendo moderadas, que provengan del agua del proceso o de la licuefacción. La materia prima utilizada para este nuevo procedimiento está por lo tanto más altamente contaminada de PGN que la anterior, pero menos de LPS (figura 7A).

15 La muestra DEWRAD se trató después según el procedimiento de descontaminación que asocia los dos carbonos C-extra y ENO-PC y la filtración sobre filtro 0,22 μm . Las cargas iniciales en contaminantes contenidas en la muestra DEWRAD se redujeron un 100% y los porcentajes de reducción relativos se calcularon a partir de las cargas residuales en contaminantes después de cada etapa (figura 7B).

20 El procedimiento de descontaminación ha permitido una reducción muy marcada de la respuesta TLR2 (> 99,9%), a pesar de la alta contaminación en PGN en la materia prima y la ausencia de paso sobre resina SD2. Este resultado confirma la eficacia de los carbonos para eliminar este tipo de contaminante. La combinación es también suficiente para reducir la carga de productos de despolimerización de los PGN, dado que el umbral límite de detección de la respuesta NOD2 se alcanza al final del proceso.

25 A diferencia del primer ensayo de descontaminación, la resina SD2 no aparece ya necesariamente aquí para reducir la contaminación en LPS. En efecto, la respuesta TLR4 alcanza también el umbral límite de detección, y la eliminación de los LPS es > 99,9% al final del procedimiento.

Finalmente, la respuesta de las células Raw confirma la eficacia de este procedimiento “simplificado” para eliminar los contaminantes presentes en una materia prima poco cargada de LPS. En efecto, no se observa ya respuesta inflamatoria significativa al final del procedimiento (< umbral límite de detección).

30 - procedimiento 3: en este tercer ensayo de descontaminación, se ha preparado la materia prima siguiendo el protocolo descrito en el ejemplo 3, ensayo 4, en el que un tratamiento por la enzima Mannaway[®] se ha añadido entre las etapas de licuefacción y de filtración sobre lecho de diatomeas. En efecto, la preparación enzimática ha demostrado su eficacia para disociar los agregados y los PGN de alto peso molecular.

35 Por el contrario, la Mannaway[®] está contaminada con LPS. A fin de eliminar esta aportación exógena, la resina SD2 se ha sustituido por la resina MN-100, por su eficacia para retener las moléculas de tipo LPS durante ensayos unitarios.

Preparación: almidón Waxy (a aproximadamente un 30% de MS) puesto en solución en agua del proceso, dejado una noche a 4°C, después tratado por ácido peracético al 0,03%. Se escurre y después se recoge en agua desmineralizada ajustada a pH 5,5 (WRAD). Adición de α -amilasa y licuefacción (DEWRAD). Ajuste a pH 8 y tratamiento por Mannaway[®] (0,4%) durante 24h a 50°C (DEWRADM).

40 La materia prima que corresponde a la muestra DEWRADM se ha descontaminado después utilizando la combinación siguiente:

1. tratamiento por carbono C extra USP (0,5%), seguido de una filtración sobre sinterizado (3 μm).
2. tratamiento por carbono ENO-PC (0,5%), seguido de una filtración sobre sinterizado (3 μm),
3. paso sobre una columna de resina MN-100,
- 45 4. filtración en filtro estéril (0,22 μm).

Se efectuaron unas extracciones después de las diferentes etapas de preparación de la materia prima después del procedimiento de descontaminación.

Los resultados de los ensayos celulares se presentan en la figura 8.

Antes de la licuefacción, la respuesta TLR2 obtenida con la muestra WRAD no estaba saturada, lo que indica que el tratamiento por el ácido peracético es eficaz para reducir la contaminación con PGN aportada por el agua del proceso. Por el contrario, la licuefacción libera nuevos PGN, puesto que la respuesta TLR2 se satura con la muestra DEWRAD. La contaminación con LPS es elevada en el agua del proceso (WRAD), y como se esperaba, la licuefacción no modifica significativamente la respuesta TLR4. Por el contrario, la adición de la Mannaway® aporta una fuerte contaminación con LPS exógena, ya que la respuesta TLR4 inducida por la muestra DEWRADM se satura. La materia prima utilizada para este nuevo ensayo está por lo tanto muy altamente contaminada con PGN y con LPS (figura 8A).

La muestra DEWRAD se trató entonces según el procedimiento que asocia los dos carbonos C-extra y ENO-PC, la resina MN-100 y la filtración sobre filtro 0,22 µm. Las cargas iniciales de contaminantes contenidas en la muestra DEWRADM se redujeron un 100% y los porcentajes de reducción relativos se calcularon a partir de las cargas residuales después de cada etapa (figura 8B y tabla II).

El procedimiento de descontaminación fue muy eficaz para eliminar los LPS, ya que se observa una reducción marcada de la respuesta TLR4 (> 99,8%), que alcanza el umbral límite de detección de la evaluación. La resina MN-100 ha retenido por lo tanto estos contaminantes, ya sean aportados por agua del proceso o por la preparación enzimática Mannaway®.

La combinación es también eficaz para eliminar los productos de despolimerización de los PGN, dado que el umbral límite de detección de la respuesta NOD2 se alcanza también al final del procedimiento.

Por el contrario, se mantiene una respuesta TLR2 (equivalente a 5,2 ng de PGN por g de materia seca), a pesar de una reducción de aproximadamente un 99% de la carga inflamatoria al final del proceso. Estos datos indican que aún están presentes agonistas TLR2 en estado de trazas en la materia prima, y eso a pesar de la eficacia combinada de los dos carbonos para eliminar los PGN.

La respuesta de las células Raw confirma la presencia de contaminantes inflamatorios en la materia prima al final del procedimiento. En efecto, la reducción de la carga inflamatoria global es sólo del 98,5%, y la respuesta está significativamente por encima del umbral límite de detección (equivalente a 8 ng de PGN por g de materia seca).

Tabla II: Valores de reducción (en % de la carga inicial) y de carga residual al final del proceso de descontaminación

	HEK-TLR2	HEK-TLR4	HEK-NOD2	Raw
Reducción (%)	98,9	> 99,8	> 90	98,4
Cargas residuales	5,2 ng/g (PGN)	< 0,5 ng/g	< 0,2 ng/g	8 ng/g (PGN)

Como los ensayos anteriores demostraron la eficacia de los dos carbonos para eliminar los PGN, incluso en materias primas muy contaminadas, tanto estos resultados sugieren que la preparación enzimática Mannaway® ha aportado unos agonistas TLR2 de naturaleza química diferente de los PGN. Estos contaminantes pueden ser, por ejemplo, unos lipopéptidos, conocidos por ser fuertes inductores de las respuestas TLR2. Así, la asociación carbonos + resina MN-100, a pesar de ser eficaz para retener los PGN y los LPS, habría permitido pasar este tipo de contaminante, lo que explicaría las respuestas TLR2 y Raw residuales.

Para paliar este problema, se ha sustituido la resina MN-100 por la resina SD2 en el ensayo siguiente, debido a su espectro de acción más amplio.

- procedimiento 4: en este ensayo, la materia prima corresponde a la muestra DEWRADM utilizada para el procedimiento 3. El procedimiento de descontaminación recoge las etapas anteriores, pero sustituyendo la resina MN-100 por la resina SD2 de amplio espectro:

1. tratamiento por carbono C extra USP (0,5%), seguido de una filtración sobre sinterizado (3 µm).
2. tratamiento por carbono ENO-PC (0,5%), seguido de una filtración sobre sinterizado (3 µm),
3. paso sobre una columna de resina SD2,
4. filtración en filtro estéril (0,22 µm).

Se efectuaron unas extracciones después de las diferentes etapas de preparación de la materia prima después del procedimiento de descontaminación.

Los resultados de los ensayos celulares se presentan en la figura 9.

Las reducciones relativas para cada contaminante se calcularon a partir de las cargas residuales medidas después de cada etapa de la combinación y se expresan en porcentajes con respecto a las cargas iniciales contenidas en la muestra DEWRADM (figura 9 y tabla III).

5 A diferencia de la combinación ensayada en el procedimiento 3, esta combinación que recoge la resina SD2 permite anular la respuesta de las células HEK-TLR2 a nivel del umbral límite de detección, con una reducción de la carga inflamatoria > 99,9%. Así, la asociación carbonos C-extra-USP y ENO-PC en serie y resina SD2 tiene aparentemente un efecto complementario sobre la eliminación de los agonistas TLR2, ya sean de tipo PGN u otro. El procedimiento conserva también su eficacia para eliminar los contaminantes agonistas de NOD.

10 La elección de la resina MN-100 se basó en el hecho de que la preparación enzimática Mannaway® está contaminada con LPS. La sustitución por la resina SD2 permite una eliminación de los LPS igual de eficaz, con una reducción < 99,9% al final del procedimiento (umbral límite de detección). Por lo tanto, se puede concluir de sus resultados que la resina SD2 es al final una mejor opción que la resina MN-100 para eliminar los LPS y los otros contaminantes aportados por la Mannaway® en la materia prima.

15 Finalmente, la respuesta de las células Raw confirma la eficacia de este procedimiento para eliminar todos los tipos de contaminantes presentes en la materia prima. En efecto, no se observa ya respuesta inflamatoria significativa (< umbral límite de detección), lo que refleja una reducción > 99,9% de la carga inflamatoria global.

Tabla III: Valores de reducción (en % de la carga inicial) y de carga residual al final del proceso de descontaminación				
	HEK-TLR2	HEK-TLR4	HEK-NOD2	Raw
Reducción (%)	> 99,9	> 99,9	> 90	> 99,9
Cargas residuales	< 1 ng/g	< 0,5 ng/g	< 0,2 ng/g	< SLD
<i>SLD, umbral límite de detección</i>				

Resultado:

20 En su conjunto, los resultados obtenidos en este estudio muestran que la combinación de varias etapas de producción y de descontaminación juiciosamente seleccionadas y ordenadas demuestra ser eficaz para eliminar las moléculas inflamatorias susceptibles de estar presentes en las materias primas utilizadas para la preparación de polímeros de glucosa.

La combinación comprende las etapas siguientes:

- 25 - suspensión del almidón Waxy a una concentración comprendida entre el 20 y el 40% de materia seca en un agua del proceso a un pH = 5,5.
- tratamiento de la suspensión de almidón cn una solución de ácido peracético a una concentración final comprendida entre 100 y 500 ppm, preferentemente de 300 ppm,
- escurrido del almidón y después recogida en un agua desmineralizada ajustada a pH 5,5 a una concentración comprendida entre el 20 y el 40% de materia seca,
- 30 - elevación de la temperatura a 107°C después adición de α -amilasa durante 15 minutos,
- facultativamente, tratamiento con una preparación enzimática con propiedades detergentes y de clarificación, por ejemplo Mannaway® para las materias primas altamente cargadas de PGN,
- filtración de la suspensión sobre lecho de diatomeas,
- tratamiento por un carbono activado de porosidad equivalente a C-extra-USP,
- 35 - tratamiento por un segundo carbono activado de porosidad equivalente a ENO-PC,
- facultativamente, paso sobre una resina de adsorción de tipo Dowex-SD2, para las materias primas altamente cargadas de LPS y/o tratadas con una preparación enzimática con propiedades detergentes y de clarificación, por ejemplo Mannaway®,
- 40 - facultativamente, ultrafiltración en continuo sobre 5 kDa, para las materias primas altamente cargadas de productos de despolimerización de los PGN,
- filtración de seguridad en filtro estéril de porosidad 0,22 μ m.

La combinación de estas etapas permite identificar las diferentes familias de contaminantes y proponer unas materias primas de polímeros de glucosa libres de reactividad inflamatoria.

Figuras

- 5 Figura 1: respuestas celulares inducidas por las materias primas preparadas o bien en agua desmineralizada, o bien en agua del proceso. Los resultados se expresan en valores de absorbancia medidos a 620 nm (ensayo SEAP).
- Figura 2: respuestas celulares inducidas por las materias primas preparadas no filtradas y por los filtrados obtenidos después de la ultrafiltración 30 kDa. Los resultados se expresan en valores de absorbancia medidos a 620 nm (ensayo SEAP).
- 10 Figura 3: respuestas celulares inducidas por las materias primas preparadas en agua desmineralizada y tratadas o no con ácido peracético. Los resultados se expresan en valores de absorbancia medidos a 620 nm (ensayo SEAP).
- Figura 4: respuestas celulares inducidas por las materias primas preparadas en agua del proceso y tratadas o no con ácido peracético. Los resultados se expresan en valores de absorbancia medidos a 620 nm (ensayo SEAP).
- Figura 5: respuestas celulares inducidas por las materias primas preparadas en agua del proceso y tratadas con Mannaway®. Los resultados se expresan en valores de absorbancia medidos a 620 nm (ensayo SEAP).
- 15 Figura 6: (A) Respuestas celulares inducidas por la materia prima preparada para el procedimiento 1 de descontaminación. Los resultados se expresan en valores de absorbancia medidos a 620 nm (ensayo SEAP). (B) reducción de la carga de contaminantes durante el procedimiento 1. Los valores de carga se obtienen a partir de las curvas de respuesta a dosis para cada tipo celular y se expresan en porcentajes con respecto a los obtenidos para la muestra DEWRAD reducidos un 100%.
- 20 Figura 7: (A) Respuestas celulares inducidas por la materia prima preparada para el procedimiento 2. Los resultados se expresan en valores de absorbancia medidos a 620 nm (ensayo SEAP). (B) Reducción de la carga de contaminantes durante el procedimiento "simplificado" de descontaminación. Los valores de carga se obtienen a partir de las curvas de respuesta a dosis y se expresan en porcentajes con respecto a los obtenidos para la muestra DEWRAD reducidos un 100%.
- 25 Figura 8: A) Respuestas celulares inducidas por la materia prima preparada para el procedimiento 3. Los resultados se expresan en valores de absorbancia medidos a 620 nm (ensayo SEAP). (B) Reducción de la carga de contaminantes durante el procedimiento 3. Los valores de carga se obtienen a partir de las curvas de respuesta a dosis y se expresan en porcentajes con respecto a los obtenidos para la muestra DEWRADM reducidos un 100%.
- 30 Figura 9: Reducción de la carga de contaminantes durante el procedimiento 4. Los valores de carga se obtienen a partir de las curvas de respuesta a dosis y se expresan en porcentajes con respecto a los obtenidos para la muestra DEWRADM reducidos un 100%.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de descontaminación de los almidones utilizados como materia prima para la preparación de polímeros de glucosa destinados a la diálisis peritoneal, comprendiendo el procedimiento las etapas siguientes:

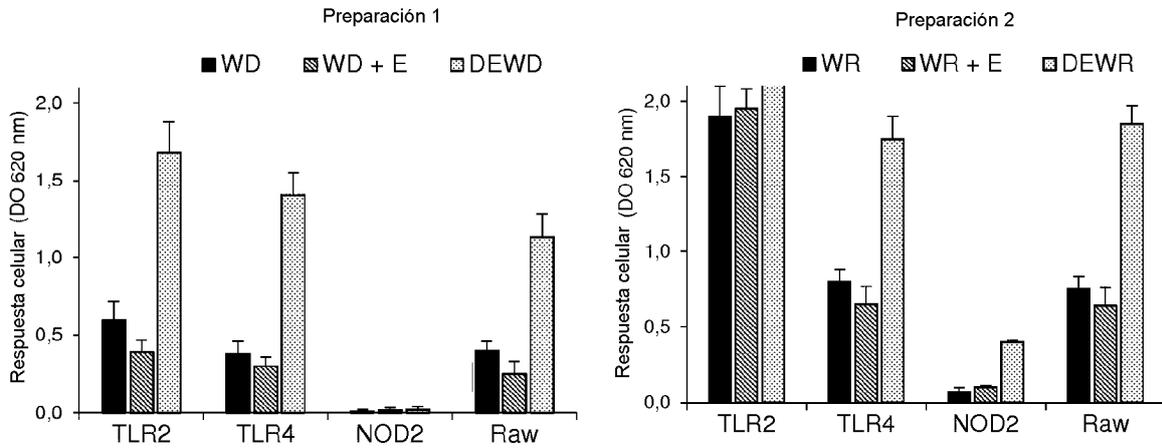
- preparación de un almidón de maíz Waxy,
- 5 - puesta en suspensión del almidón Waxy a una concentración comprendida entre el 20 y el 40% de materia seca en un agua del proceso a un pH comprendido entre aproximadamente 5 y aproximadamente 6, en particular de aproximadamente 5,5,
- tratamiento de la suspensión de almidón con una solución de ácido peracético a una concentración comprendida entre 100 y 500 ppm, preferentemente de 300 ppm,
- 10 - escurrido del almidón y después recogida en un agua desmineralizada ajustada a pH comprendido entre aproximadamente 5 y aproximadamente 6 en particular aproximadamente 5,5 y a una concentración comprendida entre el 20 y el 40% de materia seca,
- elevación de la temperatura comprendida entre aproximadamente 100°C y 110°C, preferentemente a aproximadamente 107°C y después adición de una α -amilasa durante aproximadamente de 10 a 20 minutos, preferentemente 15 minutos aproximadamente,
- 15 - facultativamente, tratamiento por una preparación enzimática con propiedades detergentes y de clarificación,
- filtración de la suspensión sobre lecho de diatomeas,
- tratamiento con un carbono activado de muy alta capacidad de adsorción, de calidad farmacéutica, y de porosidad "microporosa",
- 20 - tratamiento por un segundo carbono activado de porosidad "mesoporosa",
- facultativamente, paso sobre una resina adsorbente polimérica macroporosa, que presenta una porosidad superior a 100 angstrom,
- facultativamente, ultrafiltración en continuo sobre 5 kDa,
- 25 - filtración de seguridad en filtro estéril de 0,22 μ m de porosidad,

2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que la preparación enzimática con propiedades detergentes y de clarificación presenta una actividad enzimática de tipo mannanasa.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que la etapa de tratamiento con una preparación enzimática con propiedades detergentes y de clarificación se realiza si el almidón licuado e hidrolizado muestra un porcentaje elevado de contaminantes de tipo PGN.

4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que se realizan todas las etapas, incluso las facultativas.

Figura 1



WD: almidón Waxy en agua desmineralizada

WD + E: almidón Waxy en agua desmineralizada + enzima

DEWD: almidón Waxy en agua desmineralizada después de la licuefacción

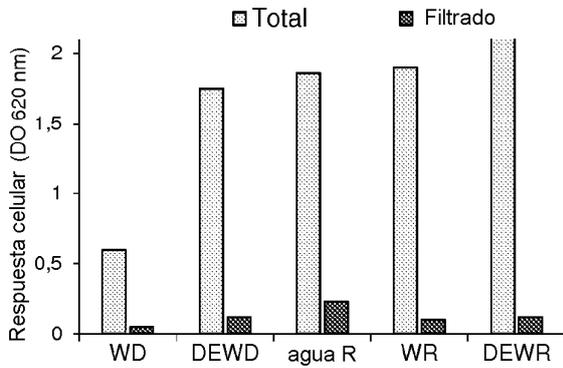
WR: almidón Waxy en agua del proceso

WR +E: almidón Waxy en agua del proceso + enzima

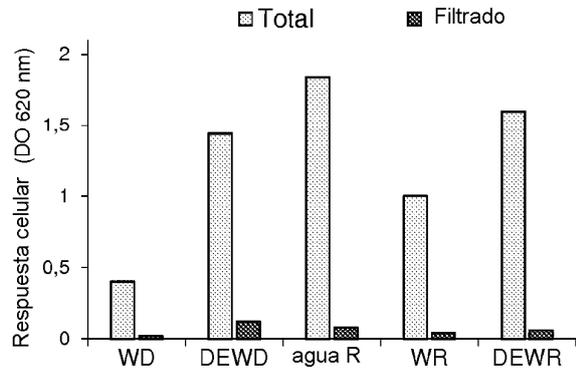
DEWR: almidón Waxy en agua del proceso después de la licuefacción

Figura 2

Respuestas HEK-TLR2



Respuestas HEK-TLR4



WD: almidón Waxy en agua desmineralizada

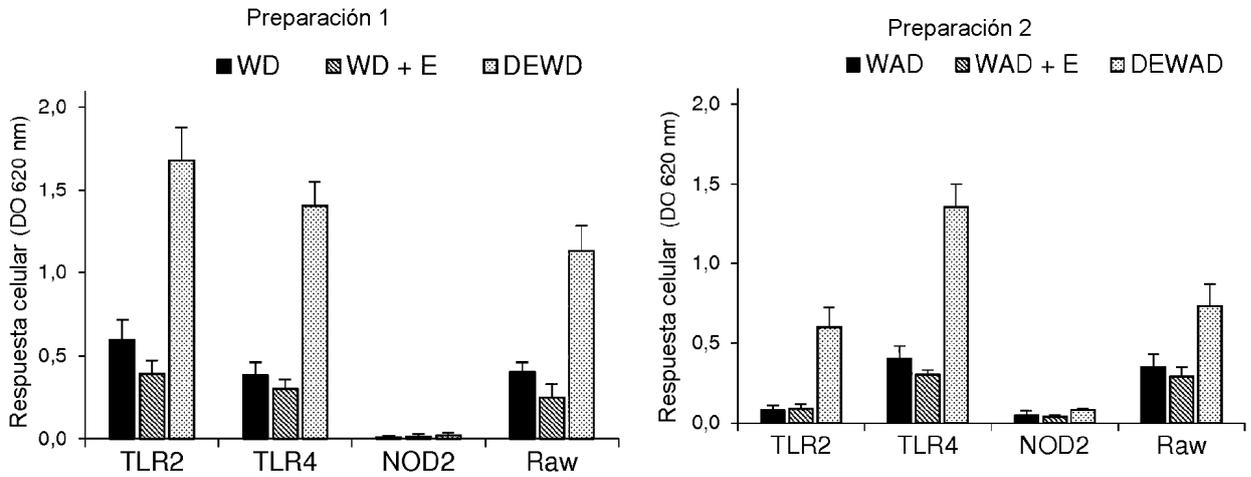
DEWD: almidón Waxy en agua desmineralizada después de la licuefacción

Agua R: agua del proceso

WR: almidón Waxy en agua del proceso

DEWR: almidón Waxy en agua del proceso después de la licuefacción

Figura 3



WD: almidón Waxy en agua desmineralizada

WD + E: almidón Waxy en agua desmineralizada + enzima

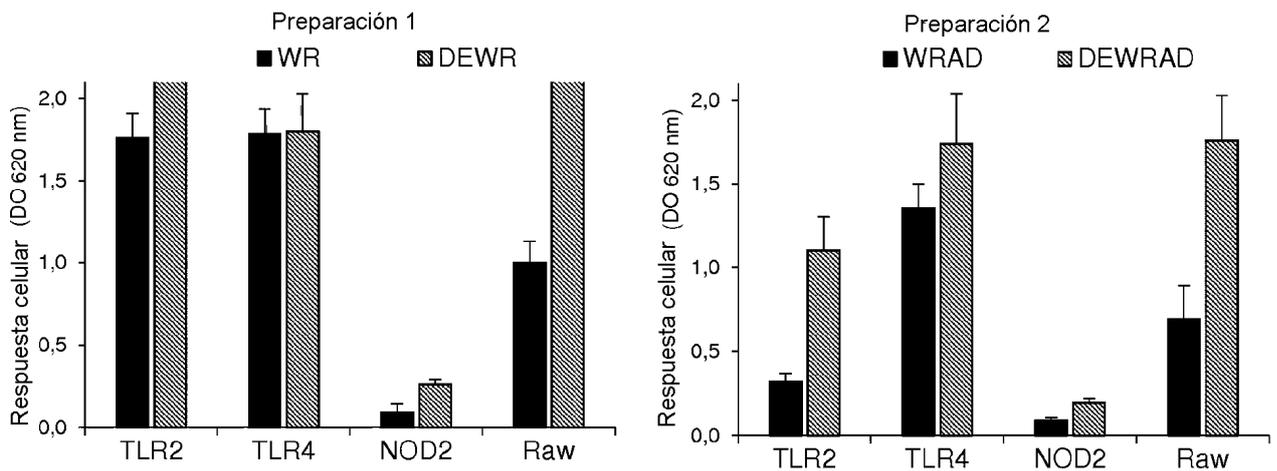
DEWD: almidón Waxy en agua desmineralizada después de la licuefacción

WAD: almidón Waxy en agua desmineralizada tratado por el ácido peracético

WAD + E: almidón Waxy en agua desmineralizada tratado por el ácido peracético + enzima

DEWAD: almidón Waxy en agua desmineralizada tratado por el ácido peracético después de la licuefacción

Figura 4



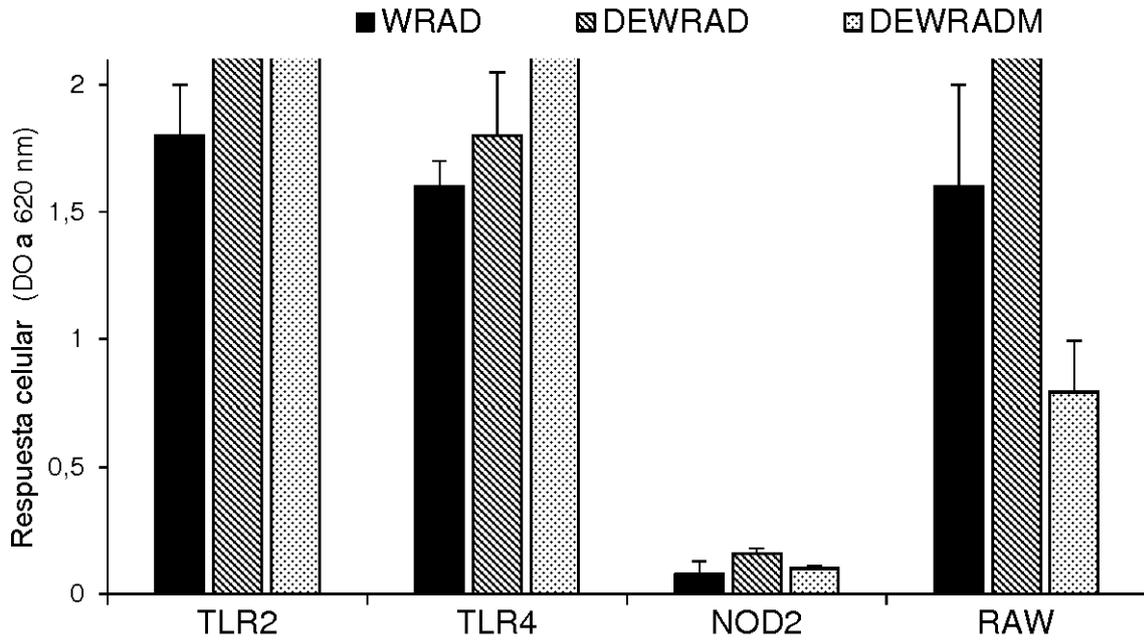
WR: almidón Waxy en agua del proceso

DEWR: almidón Waxy en agua del proceso después de la licuefacción

WRAD: almidón Waxy en agua del proceso tratado por el ácido peracético

DEWRAD: almidón Waxy en agua del proceso tratado por el ácido peracético después de la licuefacción

Figura 5



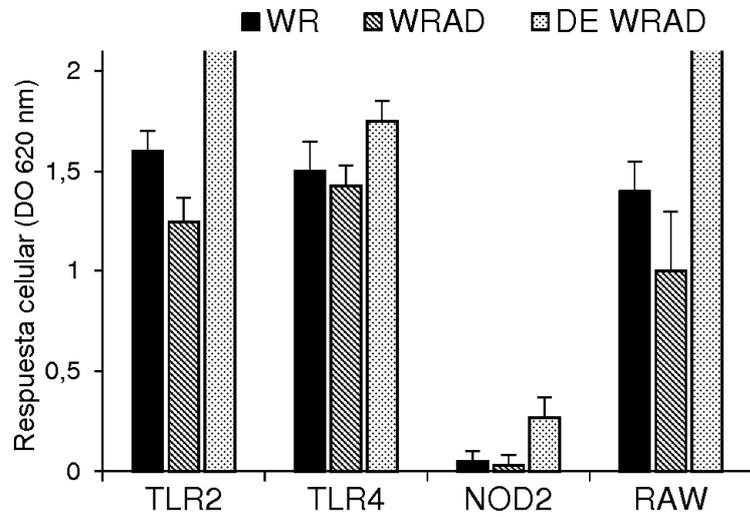
WRAD: almidón Waxy en agua del proceso tratado por el ácido peracético

DEWRAD: almidón Waxy en agua del proceso tratado por el ácido peracético y después licuado

DEWRADM: almidón Waxy en agua del proceso tratado por el ácido peracético, licuado y después tratado por Mannaway®

Figura 6

A

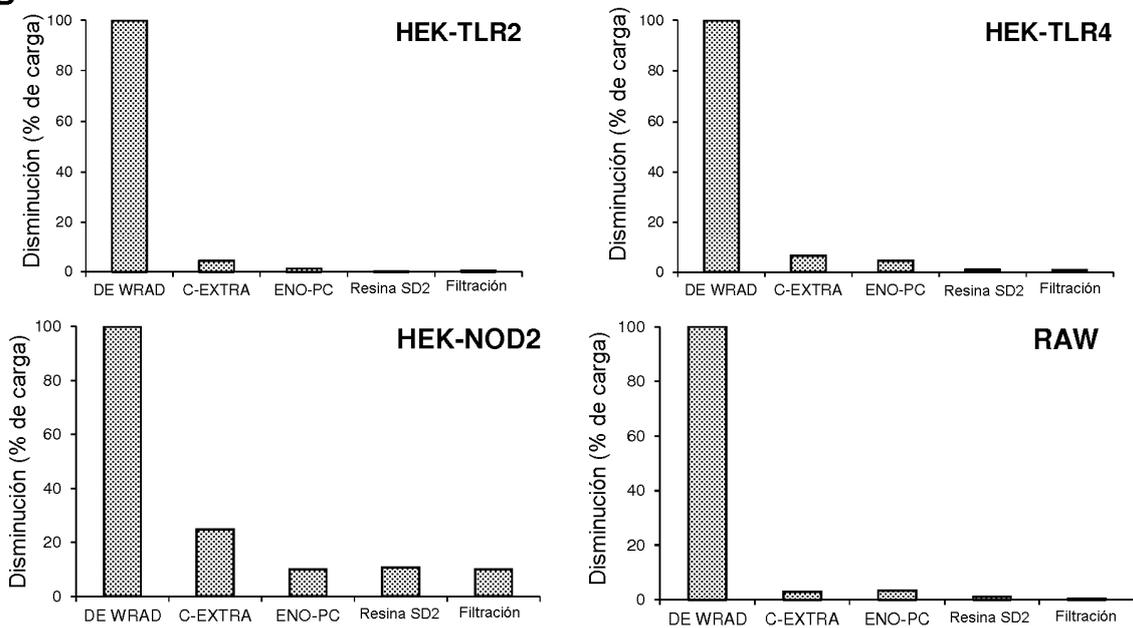


WR: almidón Waxy en agua del proceso

WRAD: almidón Waxy en agua del proceso tratado por el ácido peracético

DEWRAD: almidón Waxy en agua del proceso tratado por el ácido peracético después de la licuefacción

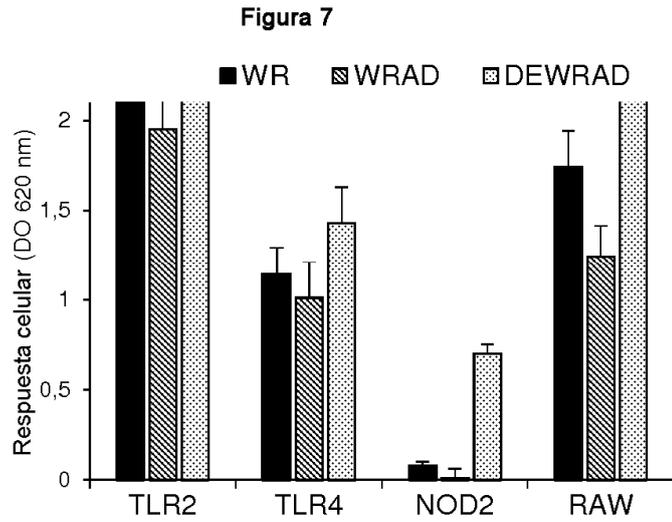
B



Procedimiento de descontaminación:

1. Tratamiento por carbono C extra USP (0,5%),
2. Tratamiento por carbono ENO-PC (0,5%),
3. Paso sobre resina SD2,
4. Filtración sobre filtro estéril 0,22 μ m.

A

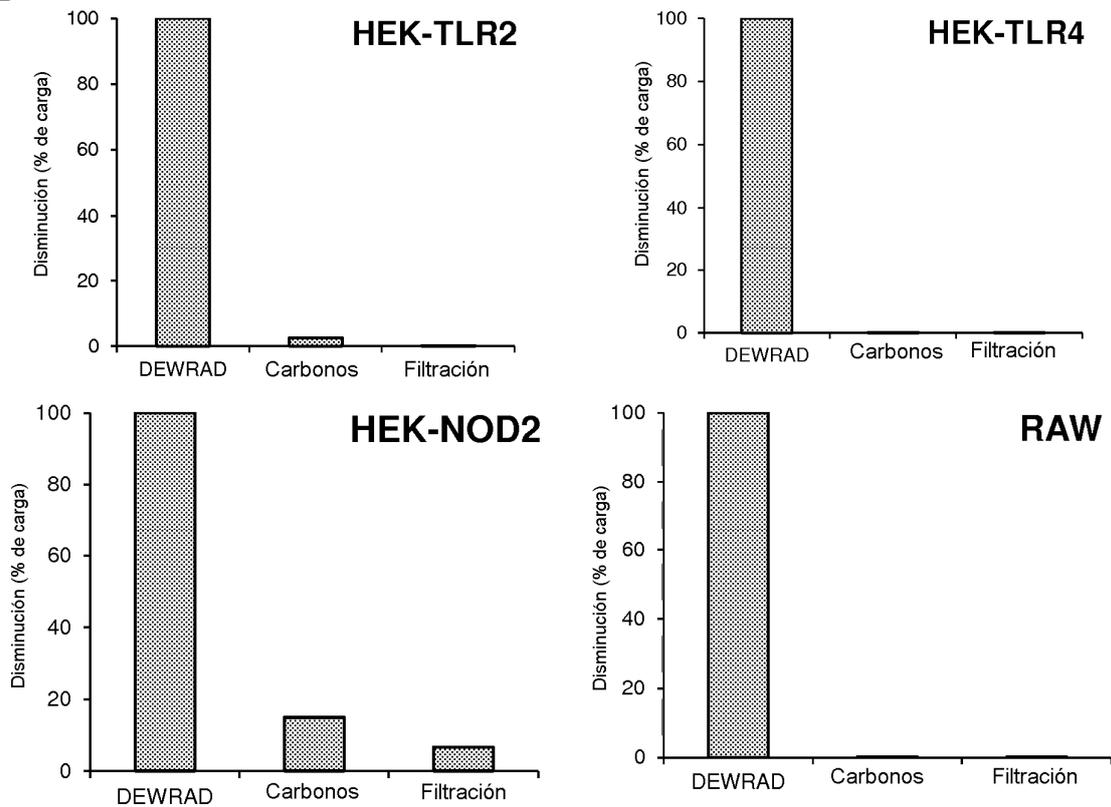


WR: almidón Waxy en agua del proceso

WRAD: almidón Waxy en agua del proceso tratado por el ácido peracético

DEWRAD: almidón Waxy en agua del proceso tratado por el ácido peracético después de la licuefacción

B

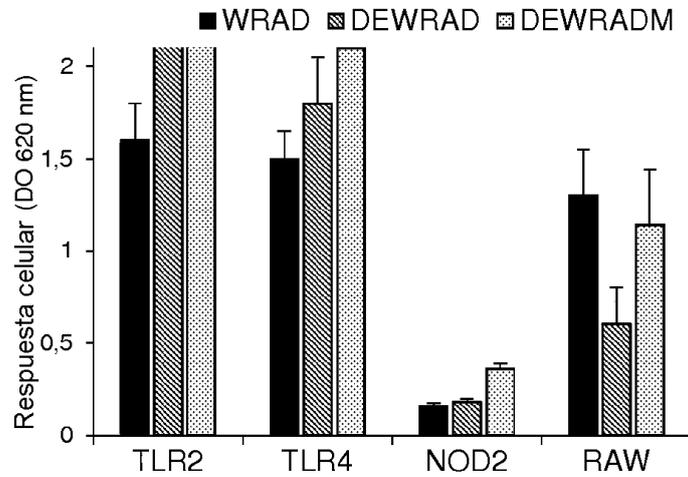


Procedimiento de descontaminación:

1. Tratamiento por carbonos C extra USP (0,5%) y ENO-PC (0,5%),
2. Filtración sobre filtro estéril 0,22 μ m.

Figura 8

A

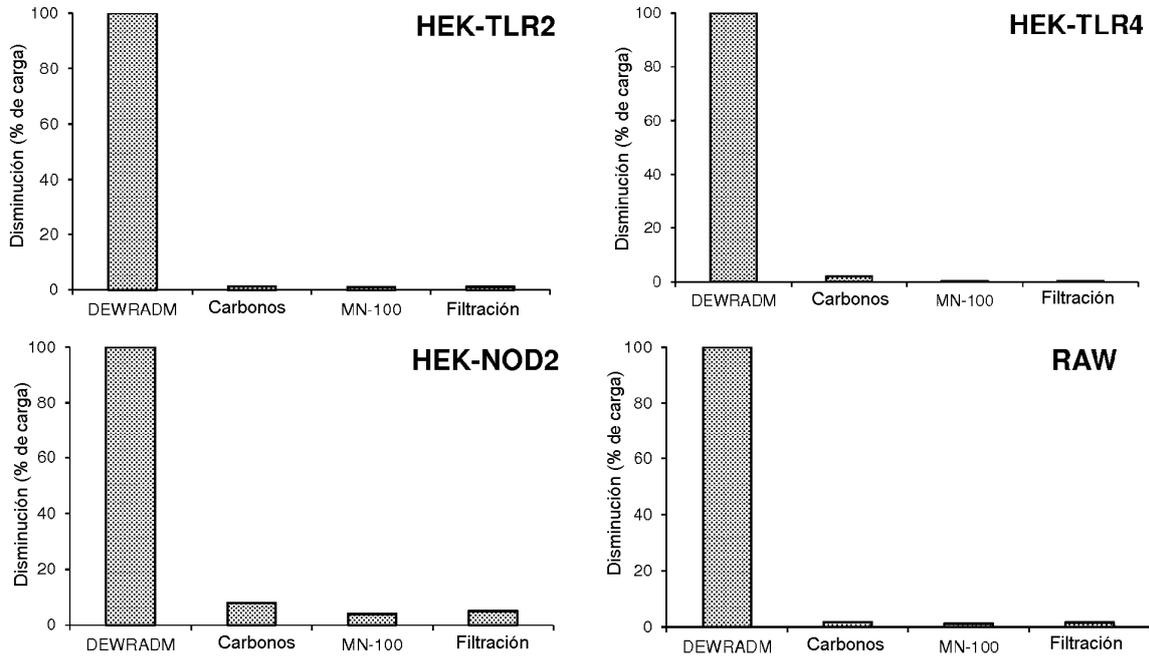


WRAD: almidón Waxy en agua del proceso tratado por el ácido peracético

DEWRAD: almidón Waxy en agua del proceso tratado por el ácido peracético después de la licuefacción

DEWRADM: almidón Waxy en agua del proceso tratado por el ácido peracético, licuado, después tratado por Mannaway®

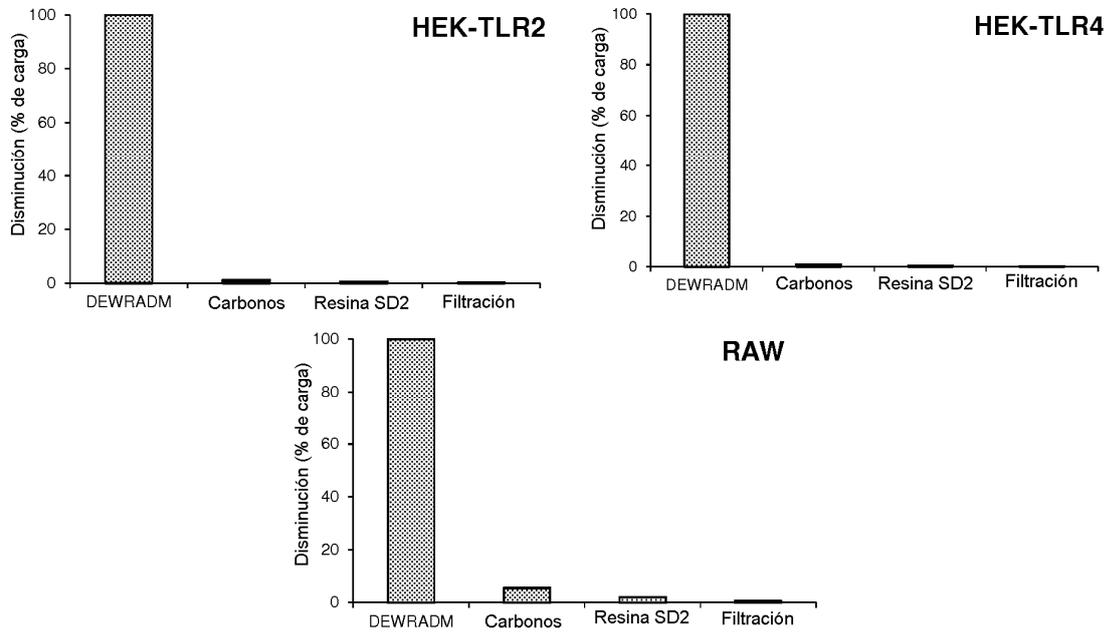
B



Procedimiento de descontaminación:

1. Tratamiento por carbono C extra USP (0,5%),
2. Tratamiento por carbono ENO-PC (0,5%),
3. Paso sobre resina MN-100,
4. Filtración sobre filtro estéril 0,22 µm.

Figura 9



Procedimiento de descontaminación:

1. Tratamiento por carbono C extra USP (0,5%),
2. Tratamiento por carbono ENO-PC (0,5%),
3. Paso sobre resina SD2,
4. Filtración sobre filtro estéril 0,22 μm .