

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 915 380**

51 Int. Cl.:

A61K 36/81 (2006.01)
B01D 11/02 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
A61K 38/02 (2006.01)
A61K 31/715 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.07.2014** **PCT/RU2014/000541**
87 Fecha y número de publicación internacional: **28.05.2015** **WO15076699**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2014** **E 14864729 (0)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2022** **EP 3082835**

54 Título: **Procedimiento de producción de una sustancia con actividad antimicrobiana, antiviral e inmunoestimuladora, una sustancia y una composición**

30 Prioridad:

21.11.2013 RU 2013151824

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.06.2022

73 Titular/es:

9541659 CANADA INC. (100.0%)
31 Ridge Drive
Toronto, ON M4T 1B6, CA

72 Inventor/es:

ATAULLAKHANOV, RAVSHAN INOYATOVICH;
PICHUGIN, ALEKSEY VASILIEVICH;
MELNIKOVA, TATYANA MIKHAILOVNA y
KHAITOV, RAKHIM MUSAEVICH

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 915 380 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de producción de una sustancia con actividad antimicrobiana, antiviral e inmunoestimuladora, una sustancia y una composición

Campo de la invención

La presente invención está relacionada con el campo de la medicina y, más concretamente, con la industria químico-farmacéutica, y se refiere al procedimiento de producción de una sustancia derivada de plantas con actividades antimicrobianas, antivirales e inmunoestimuladoras, en particular hacia las células dendríticas, la sustancia producida mediante dicho procedimiento, y una composición farmacéutica que comprende dicha sustancia.

Antecedentes de la invención

Muchos polisacáridos vegetales presentan aparentes actividades biológicas y se utilizan ampliamente con fines medicinales [Bhushan Patwardhan y Manish Gautam. Botanical immunodrugs: scope and opportunities. // Reviews. DRUG DISCOVERY TODAY. 2005. Vol. 10. P. 495-502]. En comparación con los análogos bacterianos y sintéticos, los polisacáridos botánicos no tienen efectos secundarios y son de baja toxicidad, lo que les da ventajas considerables durante el desarrollo de sustancias inmunomoduladoras, antitumorales y de curación de heridas [Schepetkin I.A., Quinn M.T. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. // Int. Immunopharmacol. 2006. Vol. 6. P. 317-333].

El papel de las células dendríticas en la respuesta inmunitaria fue estudiado por primera vez por Ralph Steinman [Jacques Banchereau y Ralph M. Steinman. Dendritic cells and the control of immunity. // Nature, 19 de marzo de 1998, Vol. 392: 245-52]. Las células dendríticas desempeñan un papel fundamental en el control de la respuesta inmunitaria; captan antígenos extraños y estimulan la respuesta de las células T. El resultado de la vacunación y la respuesta inmunitaria a la infección dependen de las células dendríticas [Howard CJ, Charleston B, Stephens SA, Sopp P, Hope JC. El papel de las células dendríticas en la formación de la respuesta inmunitaria. // Anim Health Res Rev, 2004, 5(2):191-5]. Por lo tanto, las células dendríticas atraen una gran atención como objetivo para los agentes inmunomoduladores [Mohty M., Gaugler B, Mami NB, Olive D. Regulation of Dendritic Cell Function with Immunomodulatory Drugs Current Medicinal Chemistry.// Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents, 2005, Vol. 4, No. 2, pp. 169-175(7)].

Existe un procedimiento conocido para producir polisacáridos derivados de plantas con actividad inmunomoduladora, que consiste en tratar una materia prima vegetal con una solución acuosa de formalina, mantenerla en agua acidificada y, a continuación, extraer los polisacáridos pécticos con una solución acuosa de oxalato de amonio, tratar el extracto de forma conocida y liofilizar el producto deseado. Como materia prima vegetal se utilizan plantas con flores de agua dulce, por ejemplo, cualquier tipo de lenteja de agua (Lemna spp.) o partes aéreas frescas y previamente picadas de plantas superiores, por ejemplo, el campión de vejiga (Oberna behen(L)) (Patente rusa 2149642 C1, A 61 35/78, 27.05.2000). Sin embargo, las sustancias pécticas producidas tienen una actividad inmunoestimulante muy baja (el índice de estimulación para neutrófilos y macrófagos es de 1,09 a 1,12 y de 1,12 a 1,39, respectivamente) y no tienen actividad hacia las células dendríticas.

Existe una sustancia conocida con actividad antiinfecciosa y sin actividad hemaglutinante, que se obtiene a partir de células en división de plantas (maíz, patata, champiñón) y se denomina Gamma-planta (γ-PL) (L.A. Chekanovskaya, Patente rusa 2028303 C1, C08B37/00). Se han descrito las propiedades físico-químicas de la sustancia biológicamente activa Gamma-plant. Esta última es una glicoproteína con un peso molecular de 900-2.000 kD, compuesta por porciones de carbohidratos y proteínas con una relación porcentual de peso de 90:10. Al mismo tiempo, la porción de carbohidratos de la sustancia comprende un 70-80 % de glucosa y un 12-18 % de ácido urónico.

Las desventajas de la solución conocida son la actividad mitogénica de la sustancia, que puede conducir a la activación policlonal de las células, lo que hace peligroso el uso de la sustancia como medicamento, y la ausencia de actividad inmunoestimuladora hacia las células dendríticas y los macrófagos.

También se conoce un procedimiento para producir una sustancia con actividades inmunoestimulantes, antivirales y antimicrobianas, la sustancia producida mediante dicho procedimiento y una composición farmacéutica con base en dicha sustancia (Patente rusa no. 2195308 A 61K 35/78, 27.12.2002). Este procedimiento consiste en extraer la materia prima vegetal picada con agua, centrifugar, concentrar y precipitar el extracto acuoso, y purificar y secar el producto deseado. Las plantas de las familias Dioscoreaceae, Plantaginaceae y Solanaceae pueden utilizarse como materias primas vegetales. La precipitación se realiza con etanol al 96% en presencia de cloruro de sodio. El precipitado se vuelve a precipitar con una sal o un agente ácido, y el peptidoglicano ácido crudo así obtenido se trata con álcali o con una solución saturada de sal de metal alcalino. El producto deseado se purifica mediante cromatografía de permeación en gel. La sustancia producida con este procedimiento es un peptidoglicano ácido soluble en agua que tiene un peso molecular de 1200 - 40.000 kD y una relación de peso entre glucosa y ácido urónico de 1 a 2-4. La porción peptídica de la molécula de peptidoglicano ácido es 13±3 % en peso.

El inconveniente del procedimiento conocido se refiere a la dificultad de la precipitación (consiguiente reprecipitación con etanol). La sustancia conocida no tiene actividad inmunoestimuladora hacia las células dendríticas.

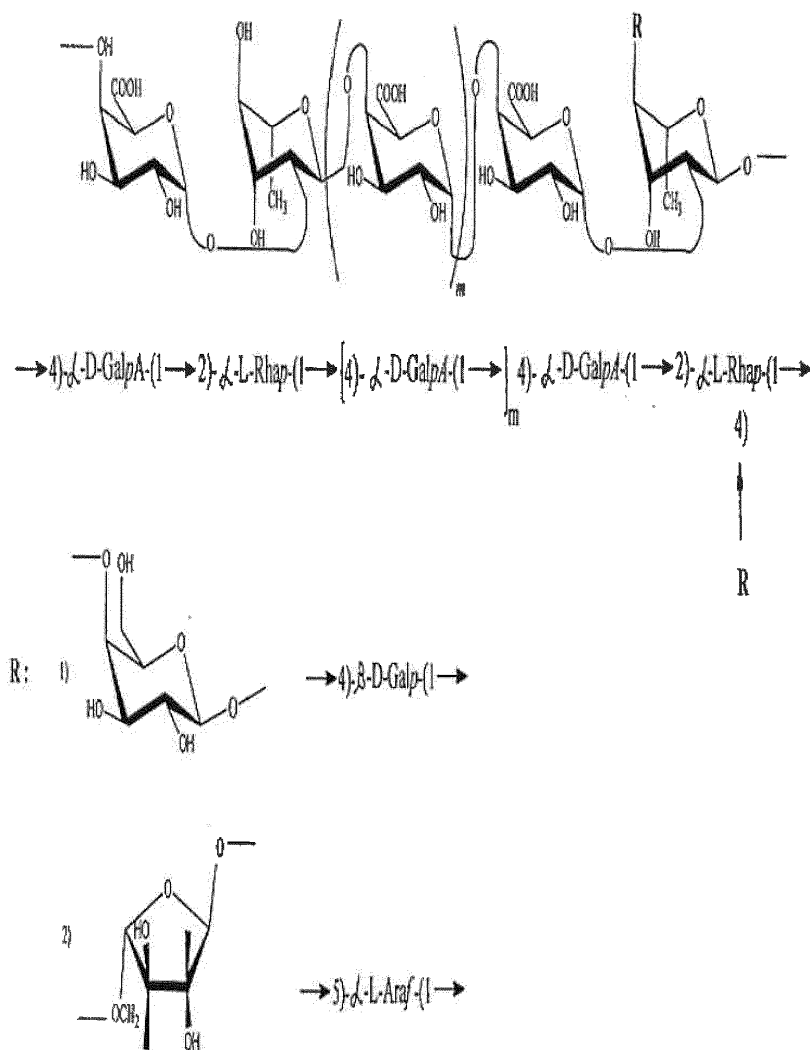
- 5 El documento WO 03043647 divulga una sustancia que tiene actividades inmunoestimulantes, antivirales y/o antibacterianas, obtenible por extracción a partir de materia prima vegetal triturada de la familia Dioscoreaceae, Plantaginaceae o Solanaceae con agua, y que es un peptidoglicano ácido soluble en agua que tiene un peso molecular de 1200-40-000 kD, y una relación de peso entre glucosa y ácido urónico de 1 a 2-4.
- 10 El documento US2005059579 A1 divulga péptidos biodegradables de N-acetil-glucosamina-N-acetil-muramilo liberados tras la digestión específica de endopeptidasas y lisozimas del género *Lactobacillus* y *Bifidum* que son capaces de inhibir la acción prooxidante del TNF alfa. ATAULLAKHANOV R ET AL, JOURNAL OF MEN'S HEALTH, vol. 7, no. 4, páginas 396 - 405, (2010), divulga un nuevo inmunoestimulante fabricado a partir de brotes de patata que consiste en peptidoglicanos ácidos con una masa molecular de 1.000-40.000 kDa, con uso en el tratamiento de infecciones por el
- 15 virus del papiloma, y el carcinoma de próstata.

Divulgación de la invención

- 20 De acuerdo con la presente invención se proporciona un procedimiento para producir una sustancia que tiene actividades antimicrobianas, antivirales e inmunoestimuladoras, en particular hacia las células dendríticas, que comprende extraer brotes de patata picados con agua, separar el extracto acuoso de la pella, añadir un agente salino al extracto, concentrar la solución salina obtenida usando ultrafiltración a través de un filtro de 300 kD, congelar la solución durante 24 horas, descongelar y filtrar la solución, eliminar la pella, precipitar la sustancia bruta de la solución utilizando un agente salino ácido, volver a solubilizar la sustancia bruta con álcali, dializar la solución alcalina contra
- 25 agua destilada en un filtro, y purificar la sustancia de la solución resultante utilizando cromatografía de permeación en gel, en la que el peso molecular de la sustancia es de 500 kDa a 17.000 kDa.

- La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una sustancia producida por este procedimiento, así como una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una infección bacteriana o una infección vírica, o para su uso en la estimulación de la respuesta inmunitaria en un sujeto que la necesite, en la que la composición farmacéutica comprende una sustancia aislada de brotes de patata, y en la que la sustancia comprende:
- 30

- (i) 40-60 % (p/p) de polisacárido, en la que el polisacárido comprende la siguiente estructura
- 35 (ii)



(iii)

donde $m = 3-5$ y cada segundo residuo $\alpha\text{-L-Rhap}$ lleva un sustituyente R , donde R son los residuos monosacáridos u oligosacáridos de $\beta\text{-D-galactopiranos}$, que a su vez llevan residuos monosacáridos u oligosacáridos de $\alpha\text{-L-arabinofuranosa}$, con una relación en peso de ramnosa a ácido galacturónico de 1:6 a 1:4;

(ii) 4-20 % (p/p) de péptido; y

(iii) 2-7 % (p/p) de lípidos.

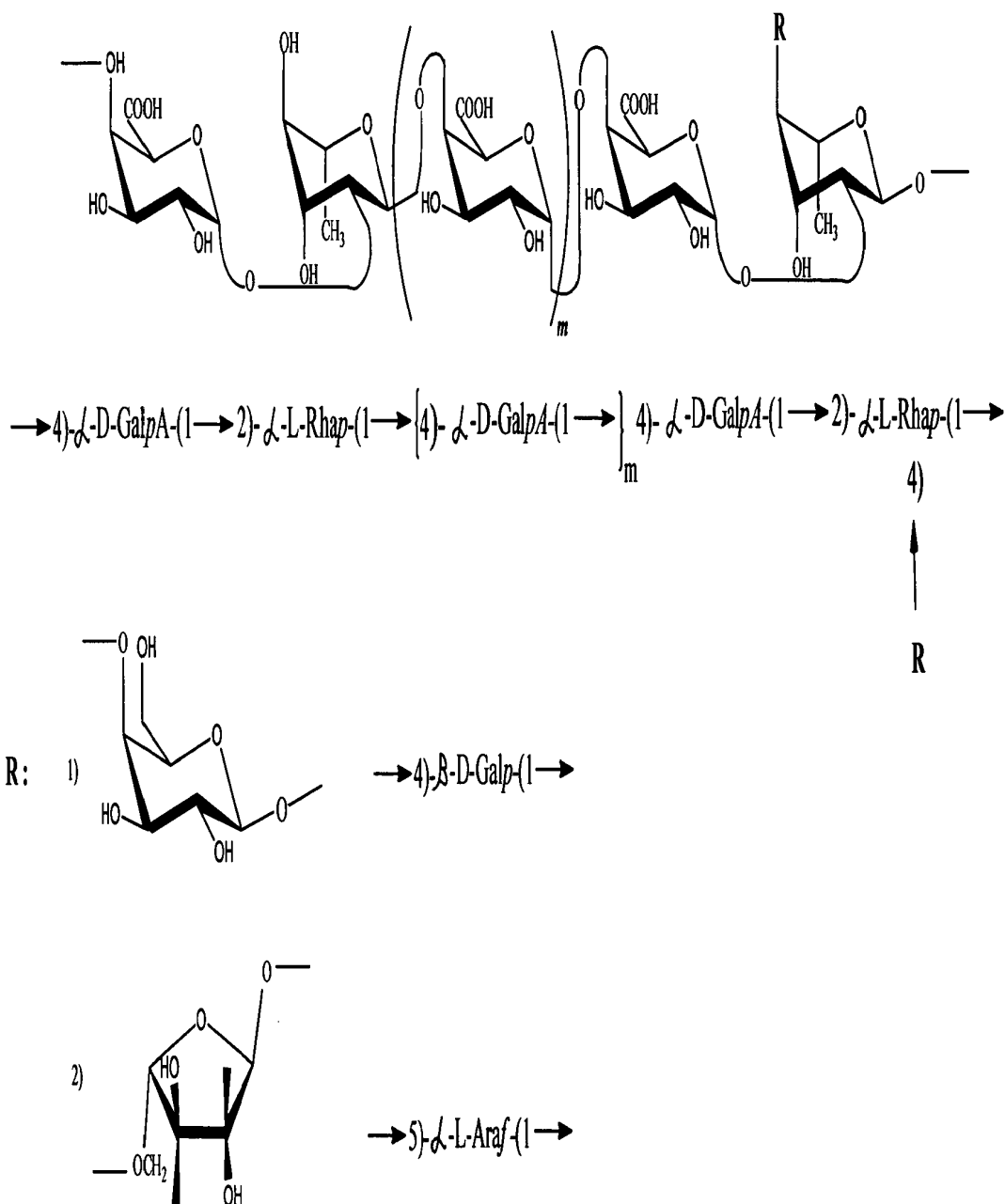
La tarea de la presente invención fue producir una nueva sustancia con base en polisacáridos derivados de plantas a partir de materias primas vegetales disponibles y con un buen rendimiento, que es bien soluble en agua y tiene no sólo fuertes actividades antivirales y antimicrobianas, sino también actividad inmunoestimuladora, en particular hacia las células dendríticas, desarrollar el procedimiento eficaz y tecnológico de producción de dicha sustancia, y crear una composición farmacéutica altamente eficaz con base en dicha sustancia.

Para lograr esta tarea, se ha desarrollado un procedimiento de producción de una sustancia con actividades antimicrobianas, antivirales e inmunoestimuladoras, en particular hacia las células dendríticas, que consiste en que los brotes de patata picados utilizados como materia prima vegetal se extraen con agua, luego se separa el extracto acuoso de la pella, se añade un agente salino al extracto, y la solución salina resultante se concentra mediante ultrafiltración a través de un filtro de 300 kD, a continuación, la solución se congela durante 24 horas, se descongela y se filtra, y la pella así obtenida se retira, y el peptidoglicano crudo se precipita de la solución utilizando un agente salino ácido y se vuelve a solubilizar con álcali, luego la solución alcalina se dializa contra agua destilada en un filtro, y el peptidoglicano se purifica de la solución resultante utilizando cromatografía de permeación en gel. En esta realización, el cloruro de sodio se utiliza principalmente como agente salino, una sal inorgánica de amonio se utiliza

como agente salino ácido en la etapa de precipitación, y la solución alcalina se dializa contra agua destilada en un filtro de 12 kD.

5 La sustancia producida tiene actividades antimicrobianas, antivirales e inmunoestimuladoras, particularmente hacia las células dendríticas, y es un biopolímero complejo que comprende las porciones de polisacáridos, péptidos y lípidos.

La porción de polisacárido de la molécula es 40-60 % del peso de toda la molécula y tiene la siguiente estructura:



10 donde $m = 3 - 5$ y cada segundo residuo $\alpha-L-Rhap$ lleva un sustituyente R, donde R son los residuos monosacáridos u oligosacáridos de $\beta-D$ -galactopiranosas, que a su vez llevan residuos monosacáridos u oligosacáridos de $\alpha-L$ -arabinofuranosa, con una relación en peso de ramnosa a ácido galacturónico de 1:6 a 1:4.

15 La porción peptídica de la molécula de peptidoglicano ácido es 4 al 20 %. La parte lipídica de la molécula está representada por los ácidos grasos y es 2 al 7 %. En esta realización, el peso molecular de la sustancia es 500 kD a 17.000 kD. Se ha formulado una composición farmacéutica que ejerce actividades antimicrobianas, antivirales e inmunomoduladoras, en particular hacia las células dendríticas, y que comprende el principio activo creado en cantidad
20 eficaz y un portador o relleno farmacéuticamente aceptable.

Breve Descripción de los Dibujos

Fig. 1. Espectro típico de ^{13}C RMN de WSAP. La solución del 3-5 % de WSAP en D₂O a 55°C se estudió utilizando el espectrómetro de RMN Bruker DRX 600 MHz (Alemania).

Se asignaron los desplazamientos químicos de la porción de polisacárido de la molécula de peptidoglicano ácido soluble en agua, en adelante WSAP, (véase la Tabla 3) de acuerdo con los espectros de ^{13}C RMN y ^1H RMP y los espectros bidimensionales de COSY, TOCSY, ROESY y HSQC, y, con base en esto, se elaboró la fórmula estructural de la porción de polisacárido del WSAP.

Fig. 2. El espectro ^1H RMP típico de WSAP. La solución del 3-5 % de WSAP en D₂O a 55°C se estudió utilizando el espectrómetro de RMN Bruker DRX 600 MHz (Alemania) (se utilizó el ácido trimetilsilil propanoico, TMSP, como estándar interno). Este espectro también se utilizó para elaborar la fórmula estructural del WSAP.

Fig. 3. La fórmula estructural de la porción de polisacáridos del WSAP. Los espectros se decodificaron utilizando los espectros homonucleares bidimensionales COSY, TOCSY y ROESY y el espectro heteronuclear $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ CHMQS, donde $m = 3 - 5$, cada segundo residuo α -L-Rhap lleva un sustituyente **R**, donde **R** son los residuos monosacáridos u oligosacáridos de β -D-galactopiranososa, que a su vez llevan residuos monosacáridos u oligosacáridos de α -L-arabinofuranosa, con una relación de peso de ramnosa a ácido galacturónico de 16 a 1:4.

Fig. 4. Efecto del WSAP en las células dendríticas esplénicas clasificadas. A - pureza de las células dendríticas clasificadas; B - histograma de la expresión de CD80; C - histograma de la expresión de CD86; la línea negra indica la incubación con WSAP; la línea gris indica el control (incubación sin WSAP); la línea discontinua indica el control de isotipo para WSAP; y la línea punteada indica el control de isotipo para la incubación sin WSAP; y D - datos normalizados que muestran el aumento de la expresión de CD80 y CD86 bajo la influencia de WSAP. Se muestran los valores medios normalizados y las desviaciones estándar con base en los datos de 3 experimentos (* significancia $P < 0,05$).

Fig. 5. El WSAP induce la producción in vitro de las citocinas IL-6, MCP-1 y TNF- α por parte de los macrófagos de ratón. A - (1) TNF- α y (2) IL-6; B - MCP-1; eje X: WSAP, $\mu\text{g/ml}$; eje Y: concentración de citoquinas (pg/mL) en el medio de cultivo. Se muestran los valores medios y las desviaciones estándar con base en los datos de 3 experimentos.

Fig. 6. El WSAP induce la producción de óxido de nitrógeno (NO) en macrófagos murinos in vitro.

Fig. 7. El WSAP aumenta la expresión de CD86 y CD69 en las células dendríticas humanas. A - identificación de las células dendríticas mieloides (mDC) como $\text{Lin}^{\text{neg}}\text{CD}11\text{c}^{\text{alto}}\text{CD}123^{\text{neg}}\text{HLA-DR}^{\text{alto}}$ mediante citometría de flujo; B - histogramas de expresión de CD86 y CD69 en las células dendríticas mieloides (mDC) humanas.

Fig. 8. Una composición farmacéutica de WSAP en una solución isotónica de cloruro de sodio induce la producción de citoquinas MCP-1 (1) e IL-6 (2) en ratones. Se inyectó WSAP (10 $\mu\text{g/ratón}$) por vía intraperitoneal en un volumen de 0,2 ml. Se midieron las citocinas en el lavado peritoneal recogido 1-6 horas después de la inyección de WASP.

Eje X: horas después de la administración del WSAP; eje Y: concentración de citoquinas (pg/ml). Los datos son medias y desviaciones estándar para tres ratones en cada punto de tiempo.

Fig. 9. Actividad antiviral de WSAP contra el citomegalovirus (CMV). Los fibroblastos de pulmón embrionario humano (HELFI, 2×10^5 células/ml) se incubaron durante 5 días en presencia de CMV (10-4 PFU/célula) y diferentes concentraciones de WSAP. El número de placas infectadas por el CMV se calculó mediante la técnica de la inmunoperoxidasa utilizando anticuerpos monoclonales específicos para las proteínas del CMV. El efecto inhibitor se calculó como una relación entre el número de células infectadas (placas) en el cultivo de prueba tratado preliminarmente con la sustancia de prueba y el número de placas en el cultivo celular de control no tratado.

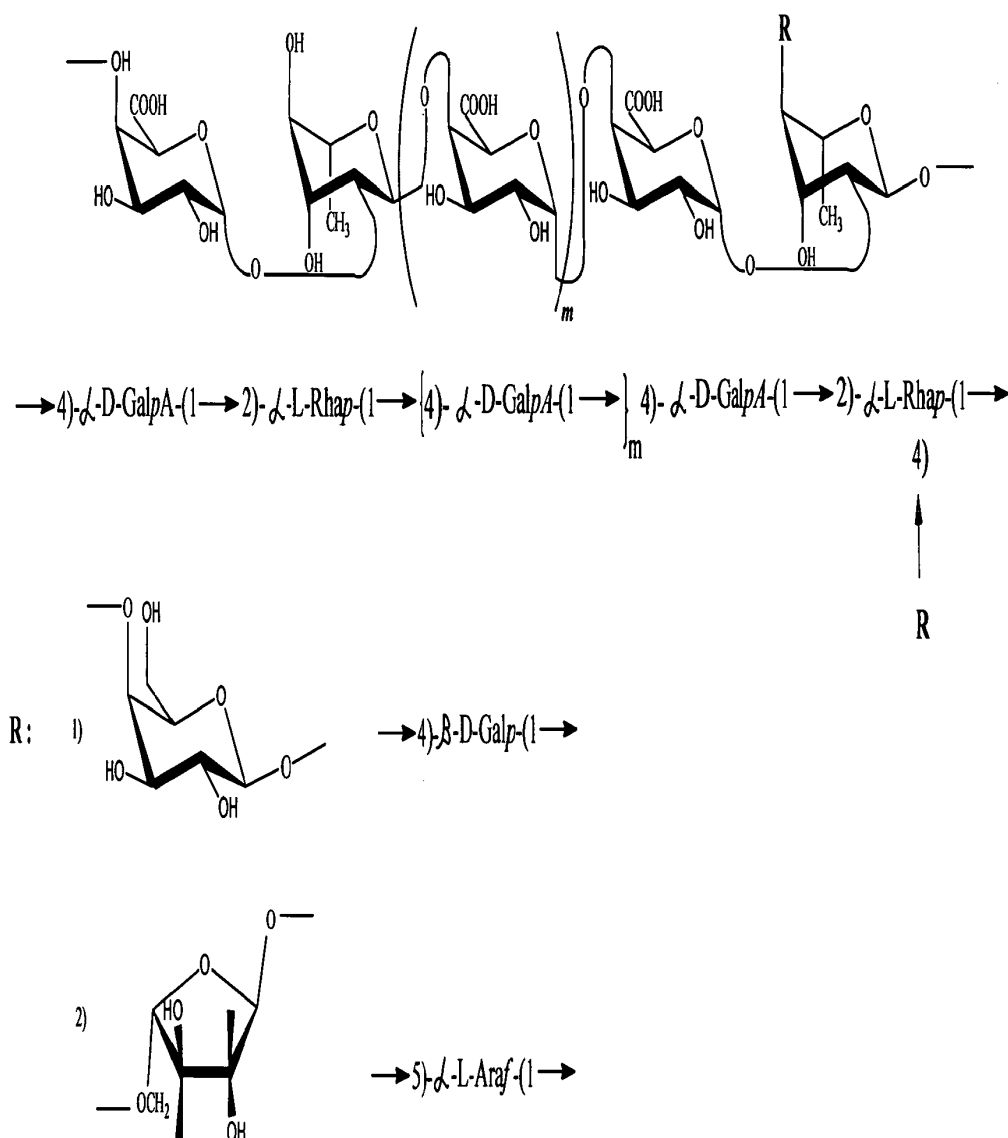
El procedimiento propuesto para producir una sustancia derivada de plantas con alta actividad antimicrobiana, antiviral e inmunoestimuladora, en particular hacia las células dendríticas, consiste en que los brotes de patata picados utilizados como materia prima vegetal se extraen con agua, luego se centrifuga el extracto acuoso, se añade un agente salino al extracto y la solución salina resultante se concentra mediante ultrafiltración a través de un filtro de 300 kD, a continuación, la solución se congela durante 24 horas, se descongela y se filtra, y la así obtenida se retira, y el peptidoglicano en bruto se precipita de la solución utilizando un agente salino ácido y se trata además con álcali, luego la solución alcalina se dializa contra agua destilada en un filtro de 12 kD, y el peptidoglicano que tiene un peso molecular de 500 kD a 17.000 kD se purifica de la solución resultante utilizando cromatografía de permeación en gel.

El cloruro de sodio se utiliza principalmente como agente salino, y una sal inorgánica de amonio se utiliza como agente salino ácido en la etapa de precipitación.

- 5 El presente procedimiento difiere del procedimiento conocido (Patente rusa No. 2195308 A 61K 35/78) en varias etapas importantes del proceso: (1) la etapa de concentración del extracto vegetal acuoso se realiza en la solución salina, en particular la que contiene NaCl, mediante ultrafiltración a través de un filtro de 300 kD; (2) una etapa adicional de congelación de la solución obtenida tras la ultrafiltración; y (3) la etapa de precipitación se realiza con el agente salino ácido; y (4) se aplica una etapa adicional de diálisis antes de la purificación cromatográfica.

10 La combinación de las características específicas del procedimiento propuesto y la ejecución de los procedimientos anteriores permitieron producir una nueva sustancia con buen rendimiento, que es bien soluble en agua y tiene actividad inmunoestimuladora, en particular hacia las células dendríticas, y fuertes actividades antivirales y antimicrobianas. La nueva sustancia producida (su parte identificada) es un peptidoglicano ácido soluble en agua (en adelante WSAP) que tiene un peso molecular de 500 kD a 17.000 kD, que es un biopolímero complejo que comprende las porciones de polisacáridos, péptidos y lípidos, donde la porción de polisacáridos es 40-60 %, la porción de péptidos es 4 % al 20 %, y la porción de lípidos es 2 % al 7 % y contiene ácidos grasos, principalmente ácido palmítico.

20 Sobre la base de la espectroscopia de ^{13}C RMN (espectro típico de ^{13}C RMN, Fig. 1) y ^1H RMP (espectro típico de ^1H RMP, Fig. 2) y de los espectros bidimensionales de COSY, TOCSY, ROESY y HSQC, se asignaron los desplazamientos químicos de la porción de polisacárido de la molécula de WSAP (Tabla 3) y se elaboró la siguiente fórmula estructural de WSAP representada en la Fig. 3:



donde $m = 3 - 5$ y cada segundo residuo $\alpha\text{-L-Rhap}$ lleva un sustituyente R ,

donde R son los residuos monosacáridos u oligosacáridos de β -D-galactopiranososa, que a su vez llevan residuos monosacáridos u oligosacáridos de α -L-arabinofuranosa, con una relación en peso de ramnosa a ácido galacturónico de 1:6 a 1:4.

- 5 La etapa de ultrafiltración de la solución salina (NaCl) del extracto acuoso a través de un filtro de 300 kD permitió eliminar las interacciones no covalentes entre los polímeros y los monómeros del extracto acuoso y, por lo tanto, eliminar más eficazmente las impurezas múltiples menores de 300 kD y purificar más eficazmente las sustancias poliméricas con un peso molecular mayor de 300 kD.
- 10 La etapa adicional de congelación-descongelación permitió purificar el peptidoglicano ácido de los polímeros no activos y poco solubles, como los glucanos, permitiendo obtener un peptidoglicano sin glucosa y mejorar así su pureza, homogeneidad y, en consecuencia, su actividad.
- 15 La precipitación de los polímeros se realizó en una etapa, sin precipitación con alcohol, y se utilizó una sal de amonio inorgánica ácida como agente salino. La ultrafiltración no convencional propuesta en la etapa de concentración y la etapa adicional de congelación-descongelación también permitieron excluir la precipitación con alcohol.
- 20 La precipitación con el agente de sal ácida y la eliminación del precipitado después de la congelación-descongelación permitieron separar el peptidoglicano ácido crudo de múltiples impurezas satélites como polisacáridos, proteínas y otros polímeros con su peso molecular superior a 300 kD.
- Tras la purificación mediante cromatografía en columna de permeación de gel en TSK HW-75F o TSK HW-65F, se recoge el producto objetivo que tiene un peso molecular de 500 kD a 17.000 kD.
- 25 La sustancia (WSAP) producida por este procedimiento, novedosa por sus partes estructurales, es un biopolímero complejo que comprende las porciones de polisacáridos, péptidos y lípidos y es diferente del conocido peptidoglicano ácido (Patente rusa no. 2195308 A 61K 35/78, 27.12.2002), tiene las siguientes características:
 - 30 1. La porción de polisacáridos no contiene glucosa. La porción polisacárida de la molécula comprende un ácido galacturónico como monosacárido principal, galactosa, arabinosa y ramnosa (véase la fórmula estructural en la Fig. 3).
De acuerdo con los espectros de RMN, la relación de peso entre la ramnosa y el ácido galacturónico es de 1:6 a 1:4, mientras que la misma relación para el peptidoglicano ácido conocido (Patente rusa no. 2195308 A 61K 35/78) es de aproximadamente 1:12 a 1:8,5.
 - 35 2. La porción peptídica de la molécula de WSAP es de 4-20 % en peso, mientras que para el conocido peptidoglicano ácido (Patente rusa no. 2195308 A 61K 35/78) era del 13 $\pm$ 3 %.
 - 40 3. La porción lipídica de la molécula está formada por ácidos grasos. La cantidad de ácidos grasos en una muestra, principalmente ácido palmítico (C-16), es 2 % al 7 %, mientras que el conocido peptidoglicano (Patente rusa no. 2195308 A 61K 35/78) no comprende la porción lipídica.
Además de las partes estructurales identificadas, la nueva sustancia (WSAP) contiene elementos químicos estructurales nuevos y desconocidos que constituyen el porcentaje restante de la sustancia.
 - 45 4. La nueva sustancia (WSAP) producida por el procedimiento descrito anteriormente tiene actividad inmunoestimulante, particularmente hacia las células dendríticas, y fuertes actividades antimicrobianas y antivirales. La sustancia tiene una buena solubilidad en agua, lo que permite crear una composición farmacéutica con base en la sustancia reivindicada y que incluye portadores o cargas farmacéuticamente aceptables en cantidades eficaces.
 5. El procedimiento permite producir el producto deseado con un buen rendimiento.

Ejemplos de uso de la invención

Ejemplo 1. Hacer que el producto objetivo sea WSAP.

- 50 Cinco kilogramos de brotes de patata (lote 1) se picaron en 10 L de agua y se extrajeron durante 2 horas a temperatura ambiente, con agitación. La mezcla se exprimió con una prensa mecánica. Se añadieron 500 g de cloruro de sodio al extracto acuoso y se disolvieron, y la solución se concentró a 1 L por ultrafiltración a través de un filtro de 300 kD.
- 55 La solución se congeló durante 24 horas. Tras la descongelación y el filtrado, los peptidoglicanos se precipitaron con un agente salino ácido, el cloruro de amonio. Para ello, se añadió 1 L de solución saturada de cloruro de amonio a 1 L del concentrado. El precipitado se desprendió por centrifugación, luego se le agregaron 50 ml de agua destilada y

se agregó gota a gota una solución de amoníaco al 25 % con agitación hasta que el precipitado se disolvió completamente. La solución se dializó utilizando una membrana de 12 kD contra agua destilada.

5 La solución resultante se introdujo en una columna TSK HW-75F. La columna se eluyó con agua destilada. Se recogió el pico de alto peso molecular de 500 kD a 17.000 kD. La solución se concentró en un evaporador de rotor y se liofilizó. El rendimiento del producto deseado (WSAP) fue de 640 mg.

10 Los azúcares ácidos se cuantificaron por reacción de color con 3,5-dimetilfenol en ácido sulfúrico concentrado (A.I. Usov, M.I. Bilan, N.G. Klochkova. - Botanica Marina, 1995, 38, 43-51). El contenido de azúcares ácidos era del 30,3 %.

Los azúcares neutros se analizaron como acetatos de poliol por GLC (P.Albersheim. - Methods Enzymol, 1987, 118, 3-40). El contenido de azúcares neutros en el WSAP fue 26,9 %.

15 Los péptidos se cuantificaron por el procedimiento de Lowry utilizando albúmina de suero bovino como estándar (O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough et al., J. Biol. Chem., 1951, 193, 265-275). El contenido de péptidos en el WSAP fue 19,5 %.

20 Los ácidos grasos se determinaron mediante GLC como ésteres metílicos de ácidos grasos producidos a partir de polisacáridos por metanólisis en HCl 1M en metanol (a 100 °C, 5 h). Se añadió el éster metílico del ácido láurico (C12) como patrón interno. El contenido de ácidos grasos (principalmente el ácido palmítico (C16)) en la muestra era del 7 %.

25 Basándose en el espectro PNR, el Rhap : La proporción de GalpA se calculó en 1:6 (desplazamiento químico de 5,67 y 1,60).

30 El análisis del peso molecular se realizó mediante cromatografía de permeación en gel: columna, d = 10 mm, L = 500 mm; relleno - Toyopearl HW75F; fase líquida - azida sódica al 0,05% en agua desionizada; tasa de elución = 0,6 ml/min; y detector RI Gilson 131. La calibración se realizó con dextranos estándar de 500 kD, 1500 kD, 3000 kD y 17000 kD de peso molecular (Polymer Standards Service GmbH, Alemania). Bajo las condiciones cromatográficas especificadas, el peso molecular del WSAP se sitúa en el intervalo de 500 kD a 17000 kD.

Tabla 1. El rendimiento y la composición de cuatro lotes de WSAP producidos a partir de cuatro lotes de brotes de patata utilizando el procedimiento descrito en este ejemplo.

35

	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4
Rendimiento, mg	640	585	609	672
Azúcares ácidos, %	30,3	27,0	27,6	32,0
Azúcares neutros, %	26,9	21,8	24,6	27,2
Péptidos, %	19,5	13,8	8,3	17,6
Ácidos grasos, %	7,0	6,3	6,1	6,2
Relación Rhap :GalpA	1:4	1:6	1:4	1:5

Ejemplo 2. Producción de WSAP mediante el uso de un agente salino ácido.

40 Este ejemplo es similar al Ejemplo 1, excepto que después de la descongelación y la filtración, el WSAP se precipita con un agente salino ácido, el sulfato de amonio. El rendimiento del producto deseado es de 560 mg. El contenido de azúcares ácidos es 19,1 %; el contenido de azúcares neurales es 21,0 %; el contenido de péptidos (por el procedimiento de Lowry) es 4 %; y el contenido de ácidos grasos es 2,5 %. Con base en el espectro PNR, el Rhap : La relación de GalpA se calcula como 1:5 (desplazamiento químico de 5,66 y 1,60).

45 Se repitió el procedimiento de obtención del producto objetivo utilizando tres lotes más de brotes de patata.

Tabla 2. El rendimiento y la composición de cuatro lotes de WSAP producidos a partir de cuatro lotes de brotes de patata utilizando el procedimiento descrito en este ejemplo.

	Lote	Lote 2	Lote 3	Lote 4
Rendimiento, mg	560	537	511	606
Azúcares ácidos, %	19,1	23,3	22,9	19,8
Azúcares neutros, %	21,0	25,4	18,0	20,9
Péptidos, %	4,0	7,5	4,8	13,0

	Lote	Lote 2	Lote 3	Lote 4
Ácidos grasos, %	2,5	5,9	3,0	7,9
Rhap : Relación de GalpA	1:5	1:6	1:4	1:5

Ejemplo 3. Análisis estructural de la porción polisacárida de WASP.

Los espectros de ^{13}C RMN de soluciones de WASP al 3-5% en D₂O se midieron a 55 °C utilizando un espectrómetro de RMN Bruker DRX 600 MHz (se utilizó TMS⁺ como estándar interno). Se midieron los espectros COSY, TOCSY, ROESY y HSQC bidimensionales utilizando los procedimientos estándar de Bruker.

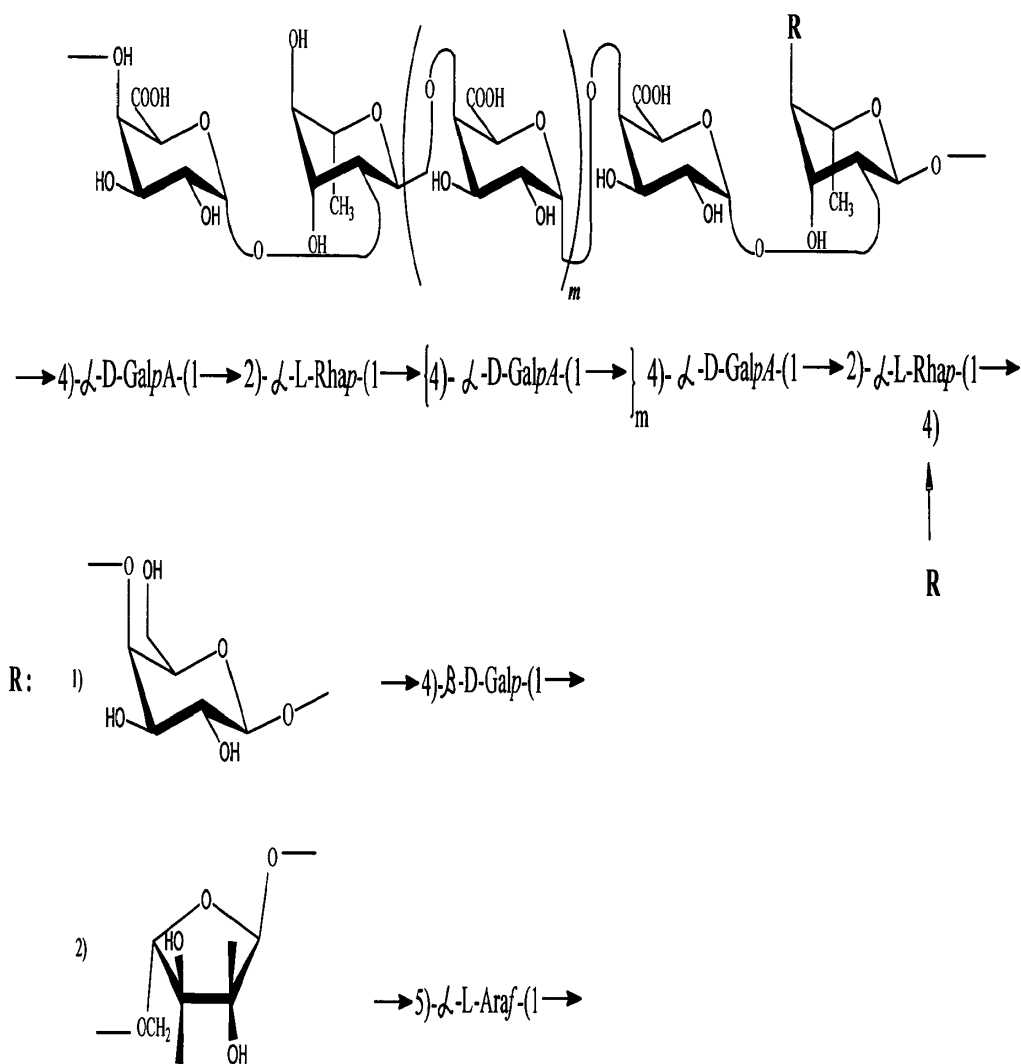
Los desplazamientos químicos se asignaron de acuerdo con los datos de referencia (Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry, vol. 42, 1984, p.193-225) y los datos recientes de la literatura sobre la espectroscopia de RMN de los polisacáridos.

Con base en la espectroscopia de ^{13}C RMN (espectro típico de ^{13}C RMN, Fig. 1) y ^1H RMP d(espectro típico de ^1H RMP, Fig. 2) y en los espectros bidimensionales de COSY, TOCSY, ROESY y HSQC, se asignaron los desplazamientos químicos de la porción de polisacárido de la molécula de WSAP (Tabla 3).

Tabla 3. Desplazamientos químicos de fragmentos de la parte polisacárida de la molécula WASP.

Residuos	Desplazamiento químico del ^{13}C (δc acetona 31,45 ppm) y ^1H (δH TSP 0,0 ppm)					
	C-1 H-1	C-2 H-2	C-3 H-3	C-4 H-4	C-5 H-5	C-6
$\rightarrow 4\text{)-}\alpha\text{-D-GalpA-(1}\rightarrow$	101,0 ^a ^b 99,5 ^a 5,38 ^b 4,98	72,8 3,65	72,6 3,85	77,9 3,96	74,5 3,97	176,6
$\rightarrow 2\text{)-}\alpha\text{-L-Rhap-}$ ($1\rightarrow$ $\rightarrow 2\text{)-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow$ 4 $\uparrow$	101 5,34	78,3 4,02	70,4 3,95	72,9 3,44	70,8 3,66	17,9 1,27 ^c 18,0 ^c 1,31
$\rightarrow 4\text{)-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow 4$	105,5 104,2 4,63 4,52	73 3,7 3,68	74,6 3,78	78,8 4,18	75,8 3,72	62 3,88, 3,83
$\alpha\text{-L-Araf-(1}\rightarrow$	110,3 5,26	82 4,13	78,2 4,02	85,4 4,15	62,4 3,84, 3,73	
$\rightarrow 5\text{)}\alpha\text{-L-Araf(1}\rightarrow$	108,9 510	82 4,13	78,2 4,02	82,2 4,23	68,4 3,90, 3,80	
^a - Para el residuo que glicosila $\alpha\text{-D-GalpA}$ en el hidroxilo C-4						
^b - Para el residuo que glicosila $\alpha\text{-L-Rhap}$ en el hidroxilo C-2						
^c - Residuo 2,4-di-sustituido						

El WSAP tiene la porción de polisacárido de la siguiente estructura (Fig. 3)



donde m = 3 - 5 y cada segundo residuo α -L-Rhap lleva un sustituyente R, donde R son los residuos monosacáridos u oligosacáridos de β -D-galactopiranosas, que a su vez llevan residuos monosacáridos u oligosacáridos de α -L-arabinofuranosas, con una relación en peso de ramnosa a ácido galacturónico de 1:6 a 1:4.

Ejemplo 4. El WSAP tiene un efecto inmunoestimulador sobre las células dendríticas aisladas del bazo de ratón.

En los experimentos se utilizaron ratones hembra BALB/c de 18-20 g de peso corporal procedentes del vivero Stolbovaya. Los ratones fueron eutanasiados con CO₂ en una cámara. Los bazo de los ratones se extrajeron asépticamente y se picaron; las células mononucleares esplénicas se aislaron en Ficoll 1,09 g/cm³ (1.500 rpm a 15 °C durante 25 min) y luego se lavaron dos veces por centrifugación (1.200 rpm a 4°C durante 10 min) en la solución salina tamponada con fosfato (10mM Na₂HPO₄, 137mM NaCl, y 2,7mM KCl) suplementada con 0,5 % BSA, 1% de glucosa, y 10 mM HEPES, pH 7,3 - 7,5 (PBS completo). Las células mononucleares esplénicas aisladas se volvieron a suspender en el PBS completo, se tiñeron con una mezcla de anticuerpos anti-CD19 FITC, anti-I-A PE y anti-CD11c PerCP-Cy5-5 (BD Biosciences) durante 20 minutos a 4°C, se lavaron con el PBS completo y se volvieron a suspender en la misma solución a una concentración de 20-30 millones de células/ml. Las células dendríticas se clasificaron en un BD FACSaria™ II Cell Sorter (BD Biosciences) utilizando una combinación de marcadores CD19⁻, CD11c⁺, I-A⁺. La pureza de las células dendríticas clasificadas fue 97-99 % (Fig. 4). Las células dendríticas aisladas se suspendieron en un medio de cultivo completo (RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal de ternera (FCS), 2 mM de L-glutamina, aminoácidos no esenciales, 1 mM de piruvato sódico, 50 µM de β-mercaptoetanol, 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomycin) a una concentración de 10⁵ células por 1 ml y se transfirieron a una placa de 96 pocillos a razón de 20.000 células por pocillo en 200 µl de medio en dupletas.

Se añadió WSAP a una concentración de 10 µg/ml a los cultivos de prueba de células dendríticas. A los cultivos de control de células dendríticas se les añadió el volumen correspondiente de solución salina fisiológica. Las células se incubaron durante 20 horas (37°C, 5 % CO₂). Tras el final de la incubación, el contenido de los pocillos se lavó con un PBS completo, se transfirió a microtubos de centrifuga y se centrifugó a 1200 rpm durante 8 min. Se añadió a la pella una mezcla de anticuerpos anti-CD80 FITC y anti-CD86 APC, se incubó durante 20 min a 4°C, se lavó con un PBS completo y se volvieron a suspender las células en 200 µl de la misma solución con la adición de 2 µg/ml de DAPI. La expresión de CD80 y CD86 en las células dendríticas se analizó utilizando un clasificador celular BD FACS Aria™ II (BD Biosciences). Los resultados (Tabla 4) muestran que la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86, necesarias para la presentación de antígenos a las células T y la posterior activación de las mismas, aumenta significativamente (p<0,05) en la superficie de las células dendríticas bajo la influencia del WSAP.

Tabla 4. Aumento de la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 en las células dendríticas de ratón bajo la influencia del WSAP.

Unión del anticuerpo fluorescente en la superficie de las células dendríticas	Expresión de CD80 y CD86 (fluorescencia normalizada por la muestra de control)		Significancia
	Media	Desviación estándar	
CD80-FITC	1,5	0,12	P<0,05
CD86-APC	1,6	0,1	P<0,05
Nota: Los datos son las medias y las desviaciones estándar de tres muestras, normalizadas por las medias correspondientes de tres muestras de control. Las muestras de control de células dendríticas se incubaron en un medio de cultivo completo sin ningún ligando estimulante.			

Ejemplo 5. El WSAP activa la expresión de la molécula coestimuladora CD86, la producción de las citoquinas IL-12, IL-6, MCP-1 y TNF-α y la producción de NO por parte de las células dendríticas y los macrófagos derivados de la médula ósea de ratón.

Aumento de la expresión de la molécula CD86 en la superficie de las células dendríticas de ratón bajo la influencia de WASP

En los experimentos se utilizaron ratones hembra BALB/c de 18-20 g de peso corporal procedentes del vivero Stolbovaya. Los ratones fueron eutanasiados con CO₂ en una cámara. La médula ósea femoral se lavó asépticamente utilizando una jeringa G25 y un PBS completo. Las células se suspendieron en un PBS completo y se dispersaron por centrifugación a 1.200 rpm durante 10 minutos, los eritrocitos se lisaron por choque hipotónico añadiendo 9 ml de agua destilada estéril durante 15 s, y la lisis de los eritrocitos se detuvo añadiendo 1 ml de solución salina equilibrada de Hank 10x y luego 20 ml de una solución PBS completa. Las células se transformaron en pellas y se suspendieron en el PBS completo. La concentración y la viabilidad de las células se evaluaron mediante citometría de flujo utilizando perlas calibradas y yoduro de propidio (2 µg/ml) en un clasificador celular BD FACS Aria™ II (BD Biosciences).

Se cultivaron 10 millones de células de médula ósea en 10 ml de un medio de cultivo completo (DMEM suplementado con 10 % FCS, 2 mM de L-glutamina, aminoácidos no esenciales, 1 mM de piruvato de sodio, 50 µM de β-mercaptoetanol, 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomycin) complementado con 10 ng/ml de GM-CSF (GIBCO) en placas Petri de 90 mm durante 9 días. El medio (complementado con GM-CSF) se cambió los días 3 y 6 después del inicio del cultivo. El día 9, se recogió la fracción de células no adherentes del cultivo, se transformó en pellas por centrifugación (a 1200 rpm durante 10 min) y se suspendió en el PBS completo, y se evaluó la concentración y viabilidad celular por citometría de flujo utilizando perlas calibradas y yoduro de propidio (2 µg/ml) en un BD FACS Aria™ II Cell Sorter (BD Biosciences). Las células dendríticas se identificaron mediante citometría de flujo utilizando la expresión de CD11c y MHC clase II en la superficie celular. El contenido de células dendríticas en las suspensiones utilizadas fue 70-80 %.

Las células dendríticas a una concentración de 1 millón de células por 1 ml del medio de cultivo DMEM completo se transfirieron a pocillos de una placa de cultivo celular de 24 pocillos (Nunc). Se añadió WSAP a una concentración de 10 µg/ml en tres pocillos. Otros tres pocillos con células dendríticas sin ningún efector sirvieron como controles negativos. Dieciocho horas después de la incubación a 37°C y 5% de CO₂, se transfirieron las células a tubos de centrifuga, el contenido de los pocillos se lavó con el PBS completo y se transfirió a los mismos tubos, y las células se transformaron en pellas por centrifugación a 1.200 rpm durante 10 min. La pella de células se tiñó con una mezcla de anticuerpos monoclonales anti-CD11c-PE y anti-CD86-APC (BD Biosciences) marcados con fluorocromos, y las células se analizaron por citometría de flujo utilizando un BD FACS Aria™ II Cell Sorter (BD Biosciences). Los resultados (Tabla 5) muestran que bajo la influencia del WSAP las células dendríticas de ratón aumentan 5,9 veces la expresión de las moléculas coestimuladoras CD86, que son necesarias para la función de presentación de antígenos de estas células y la activación de las células T.

Tabla 5. Aumento de la expresión de las moléculas coestimuladoras CD86 en las células dendríticas de ratón bajo la influencia del WSAP.

Medio en el que se cultivaron las células dendríticas	Expresión de CD86, unidades de fluorescencia relativas		Significancia
	Media	Desviación estándar	
Medio de cultivo completo	4.295,1	2.132	-
Medio de cultivo completo con WSAP (10 µg/ml)	25.176,5	3.423	P<0,001
Nota: Los datos son medias y desviaciones estándar de tres cultivos idénticos			

Aumento de la producción de la citoquina IL-12 en las células dendríticas de ratón bajo la influencia del WSAP

Las células dendríticas derivadas de la médula ósea se obtuvieron cultivando células de la médula ósea en presencia de 10 ng/ml de GM-CSF durante 9 días, como se describe anteriormente en este ejemplo. Se cultivaron dos millones de células por 1 ml de un medio de cultivo completo en pocillos de una placa de cultivo celular de 24 pocillos (Nunc). Se añadió WSAP (10 µg) en dos pocillos, y el volumen correspondiente de solución salina fisiológica se transfirió a otros dos pocillos que sirvieron de controles negativos. La placa se incubó durante 18 horas en un incubador de CO₂, luego se añadió brefeldina-A a una concentración final de 5 µM, y la placa se incubó durante otras 6 horas.

Tras el final de la incubación, se añadieron 2 ml de PBS completo frío en cada pocillo, se pipeteó suavemente y se transfirió a tubos de 4,5 ml (BD Biosciences). Las células se dispersaron por centrifugación (durante 10 minutos a 1.200 rpm) y, a continuación, el sedimento celular se resuspendió en 1 ml de PBS completo y se transfirió a microtubos de 1,2 ml. Las células fueron transformadas en pellas por centrifugación (durante 10 minutos a 1.200 rpm). Se añadió una mezcla de anticuerpos anti-I-A FITC y anti-CD11c PerCP-Cy5-5 (BD Biosciences) a 50 µl del sedimento celular y se incubó durante 20 minutos en la oscuridad a 4°C, después se lavaron las células con un PBS completo. La pella se agitó y se mezcló con 100 µl de solución FixPerm (BD Biosciences), se incubó durante 20 minutos y se lavó dos veces con una solución PermWash (BD Biosciences). La pella celular se suspendió en 50 µl de PermWash, se dividió en dos alícuotas de 20 µl cada una, a las que se añadió el anticuerpo anti-IL-12 PE (BD Biosciences), y se incubó durante 30 min. Las células se lavaron dos veces con solución PermWash, se suspendieron en 200 µl de PBS completo y se analizaron por citometría de flujo en un BD FACSAria™ II Cell Sorter (BD Biosciences). Los datos presentados en la Tabla 6 muestran que la producción de la citoquina IL-12 se incrementa significativamente en las células dendríticas bajo la influencia del WSAP, concretamente, el número de células que sintetizan IL-12 se incrementa 4,3 veces (p<0,01).

Tabla 6. Aumento de la producción de IL-12 por parte de las células dendríticas de ratón bajo la influencia del WSAP.

Medio en el que se cultivaron las células dendríticas	Porcentaje de células dendríticas que producen IL-12		Significancia
	Media	Desviación estándar	
Medio de cultivo completo	2,7	1,1	-
Medio de cultivo completo suplementado con WSAP (10 µg/ml)	11,7	1,0	P<0,01

Aumento de la secreción de las citocinas IL-6, MCP-1 y TNF-α y de la producción de NO por parte de los macrófagos bajo la influencia del WSAP

Los macrófagos derivados de la médula ósea de ratón se obtuvieron mediante la incubación de la médula ósea en presencia de 10 ng/ml de GM-CSF durante 9 días, como se describe anteriormente en este ejemplo. El día 9, se recogió la fracción de células adherentes del cultivo, se transformó en pellas por centrifugación (a 1.200 rpm durante 10 min) y se suspendió en un PBS completo, y se evaluó la concentración celular y la viabilidad por citometría de flujo utilizando perlas calibradas y yoduro de propidio (2 µg/ml) en un BD FACSAria™ II Cell Sorter (BD Biosciences). Se transfirieron macrófagos a una concentración de 1 millón de células por 1 ml de un medio de cultivo DMEM completo en pocillos de una placa de cultivo de tejidos de 24 pocillos (Nunc). El WSAP se añadió a una concentración de 10 µg/ml, 1 µg/ml, o 0,1 µg/ml en tríos. Se añadió el volumen correspondiente de solución salina fisiológica en tres pocillos que sirvieron de controles negativos. La placa se incubó durante 24 horas a 5% CO₂ y 37 °C. Tras el final de la incubación, se recogieron muestras de sobrenadantes de cultivo para determinar una concentración de citoquinas y NO. Las concentraciones de las citocinas TNF-α, IL-6 y MCP-1 se midieron en un clasificador celular BD FACS Aria™ II (BD Biosciences) utilizando un BD™ Cytometric Bead Array, Mouse Inflammation Kit (BD Biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración de citoquinas se calculó utilizando el software FCAP Array™ v1 (BD Biosciences).

Como se muestra en la Fig. 5, el WSAP simula significativamente la producción de citoquinas TNF-α, IL-6 y MCP-1.

Más concretamente, la concentración de IL-6, MCP-1 y TNF- α en el sobrenadante del cultivo aumentó 186 veces, 8 veces y 54 veces, respectivamente, bajo la influencia del WSAP.

La producción de NO se evaluó midiendo el nitrito de sodio en el sobrenadante del cultivo mediante la reacción de Griess (L.C.Green, 1982). El reactivo de Griess se preparó inmediatamente antes del ensayo mezclando volúmenes iguales de la solución A (solución de dihidrocloruro de naftilendiamina al 0,1% en agua) y de la solución B (sulfanilamida al 1% en H₃PO₄ al 5%). Para determinar la concentración de nitrito sódico, se añadió el líquido de cultivo (50 μ l) a los pocillos de una placa de fondo plano de 96 pocillos (Medpolymer), y se añadieron 150 μ l de reactivo de Griess a cada pocillo. La mezcla de reacción se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y se midió la densidad óptica con un espectrofotómetro Dynex MRX a $\lambda=545$ nm. La mezcla de reacción que contenía un volumen equivalente de medio de cultivo celular completo en lugar de sobrenadante de cultivo se utilizó como control. Se utilizaron diluciones dobles de NaNO₂ en el medio de cultivo celular completo como muestras estándar para obtener la curva de calibración.

Los hallazgos muestran que los macrófagos producen activamente NO bajo la influencia del WSAP. Con base en los datos de la Fig. 6, podemos concluir que la producción de NO es estimulada diez veces por el WSAP.

Ejemplo 6. El WSAP activa la expresión de CD69 y CD86 en las células dendríticas humanas.

La sangre entera de donantes sanos se recogió en tubos Vacutainer (Becton-Dickinson) que contenían heparina, se diluyó 1:1 con medio RPMI-1640 y se incubó durante 18 horas en presencia de 5 μ g/ml de WSAP. Tras el final de la incubación, las muestras de sangre se tiñeron con una mezcla de anticuerpos contra Lin1-FITC (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56), CD123 PE, HLA-DR APC-H7, CD11c BD Horizon, CD69 APC y CD86 PerCP Cy5.5. (BD Biosciences) durante 20 minutos, después se añadió 1 ml de BD FACS Lysing Solution (BD Biosciences) para eliminar los eritrocitos y fijar los glóbulos blancos. Las muestras se analizaron por citometría de flujo en un clasificador celular BD FACS Aria II.

Los datos obtenidos (Tablas 7 y 8, y Fig. 7) muestran que la expresión de la molécula coestimuladora CD86 ($p<0,05$) y de la molécula de activación CD69 ($p<0,05$) se multiplica por 2 en las células dendríticas mieloides humanas bajo la influencia de WASP.

Tabla 7. Aumento de la expresión de la molécula coestimuladora CD86 en las células dendríticas humanas bajo la influencia de WASP.

Medio en el que se cultivaron las células dendríticas	Expresión de CD86, unidad de fluorescencia relativa		Significancia
	Media	Desviación estándar	
Medio de cultivo completo	3425	1005	-
Medio de cultivo completo suplementado con WSAP (5 μ g/ml)	6686	666	P<0,05

Tabla 8. Aumento de la expresión de la molécula de activación CD69 en las células dendríticas humanas bajo la influencia del WSAP.

Medio en el que se cultivaron las células dendríticas	Expresión de CD69, unidad de fluorescencia relativa		Significancia
	Media	Desviación estándar	
Medio de cultivo completo	1137	378	-
Medio de cultivo completo suplementado con WSAP (5 μ g/ml)	2.230	367	P<0,05

Ejemplo 8. Una composición farmacéutica de WSAP estimula la producción de citoquinas *in vivo*.

En los experimentos se utilizaron ratones macho (CBA $\times$ C57Bl/6)F1 de 18-20 g de peso corporal procedentes del vivero de cría Stolbovaya. Se creó una composición farmacéutica mezclando una preparación seca y liofilizada de WSAP y una solución farmacéutica isotónica de cloruro de sodio, filtrada a través de un filtro de 0,22 μ m, e inyectada por vía intraperitoneal a una dosis de 10 μ g en 0,2 ml por ratón. Los ratones inyectados con 0,2 ml de solución isotónica de cloruro de sodio de calidad farmacéutica se utilizaron como controles. Todos los grupos estaban compuestos por cinco ratones. Los ratones fueron sometidos a eutanasia a las 1, 3 y 6 horas. Justo antes de la inyección de las soluciones mencionadas, los ratones fueron utilizados como punto de tiempo "0 h". Para obtener el exudado peritoneal, se inyectó por vía intraperitoneal un volumen de 3 ml de solución isotónica fría (cloruro sódico al 0,9%). Las muestras de exudado peritoneal recogidas se centrifugaron a 1.500 rpm durante 10 minutos para eliminar las células, y el sobrenadante se analizó para determinar la concentración de citoquinas. La concentración de citoquinas IL-6 y MCP-1 se midió utilizando un BD™ Cytometric Bead Array, Mouse Inflammation Kit (BD Biosciences) en un BD FACSAria™

II Cell Sorter (BD Biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración de citoquinas se calculó utilizando el software FCAP Array™ v1 (BD Biosciences).

Los datos obtenidos muestran que la composición farmacéutica de WSAP inyectada por vía parenteral y la solución isotónica de cloruro de sodio causaron una estimulación significativa de la producción de IL-6 y MCP-1 en ratones, con los valores máximos de 220 pg/ml y 600 pg/ml, respectivamente, 4 horas después de la inyección (véase la Fig. 8).

Ejemplo 9. El WSAP tiene una actividad antimicrobiana.

La mejora de la defensa antimicrobiana en animales con una composición farmacéutica que contiene WSAP en cantidad efectiva y NaCl farmacéutico se estudió utilizando un modelo de absceso bacteriano purulento en cobayas. La composición farmacéutica se preparó disolviendo el liofilizado estéril de 5 µg de WSAP en 1 ml de la solución isotónica de NaCl de grado farmacéutico diseñada para uso inyectable. Las heridas purulentas experimentales en cobayas de laboratorio (100-150 g de peso corporal) se hicieron de la siguiente manera. Durante el experimento, no sólo se controló el estado de la herida purulenta experimental, sino también el estado general de los animales y su movilidad y apetito.

Los animales se dividieron en dos grupos, el grupo principal y el grupo de control, cada uno de ellos compuesto por 10 animales. Para crear un absceso experimental en la herida, los animales fueron afeitados en la región interescapular bajo anestesia general (ketamina + relanio). A continuación, se disecó un área de piel de 2 cm², dejando intacta la grasa subcutánea. El tejido blando del lecho y los bordes de la herida se apretó con unas pinzas de Kocher durante 3-4 minutos. Se inyectó bajo el tejido blando exprimido un mililitro de suspensión bacteriana que contenía 2 × 10⁹ cuerpos microbianos de *Staphylococcus aureus* (cepa 150) y *Escherichia coli* (cepa 20), los agentes infecciosos más comunes de las heridas quirúrgicas. Dos o tres días después de la inoculación, se inició el tratamiento y el seguimiento de la inflamación purulenta de la herida.

Durante el tratamiento de los animales de los grupos de control y de prueba se aplicaron los procedimientos estándar para las heridas locales purulentas que se utilizan habitualmente en la práctica quirúrgica clínica. Tres días después de la infección de las heridas, se extirpó asépticamente el tejido blando necrosado (necrectomía). La piel que rodeaba la herida se desinfectó con una solución de yodo al 3% y la propia herida se lavó con una solución de peróxido de hidrógeno al 3%. A continuación, se aplicó un apósito de gasa con pomada de Levomecol en la superficie de la herida. Los apósitos de las heridas se cambiaban todos los días.

Los animales del grupo principal fueron inyectados por vía intramuscular con 5 µg de WSAP en los días 1, 3 y 5 del tratamiento. Los animales del grupo de control fueron inyectados por vía intramuscular con 1 ml de NaCl al 0,9%.

El seguimiento del proceso de la herida en los animales de los grupos de control y de prueba mostró una aceleración significativa de la cicatrización de las heridas purulentas en los animales que fueron inyectados con WSAP. Dos días después de la infección de las heridas, en todos los animales, independientemente de la opción de tratamiento, se observó adinamia, atonía motora, aumento de la ingesta de agua y disminución de la ingesta de alimentos sólidos, es decir, síntomas generales de inflamación grave y purulenta junto con los síntomas locales del proceso purulento. Localmente, la herida estaba cubierta por una costra levantada sobre las zonas hinchadas y rojas que la rodeaban. Al presionar la costra, empezó a salir pus de la herida. La costra se podía quitar fácilmente, sin que sangrara. Tras retirar la costra, el tejido blando aparecía hinchado y parcialmente necrótico, lleno de pus y coágulos de fibrina. Tres días después del inicio del tratamiento, los animales del grupo principal eran más móviles que los del grupo de control. Los animales de ambos grupos comieron poco pero su consumo de agua aumentó. El edema local y la hiperemia alrededor de la herida disminuyeron ligeramente. El lecho de la herida estaba cubierto por una capa de pus y fibrina. En los animales tratados con WSAP, el edema y el enrojecimiento de los bordes de la herida fueron menos pronunciados. No se pudieron obtener diferencias significativas entre los grupos de prueba y los de control utilizando la planimetría de las áreas de las heridas. Cinco días después del inicio del tratamiento, los animales inyectados con WASP mostraron una mejora de la movilidad y el apetito y una disminución del edema y la hiperemia de los tejidos que rodean la herida. Surgieron islas de granulaciones rosas en el fondo de la herida en 7 de 10 animales del grupo de prueba y en 4 de 10 animales del grupo de control (las diferencias entre los grupos fueron significativas, $p < 0,05$). El área de la herida se redujo dos veces en ambos grupos, en comparación con el área inicial, y no se observaron diferencias significativas en el área de la herida en este día entre los grupos. Siete días después del inicio del tratamiento, los animales del grupo principal estaban activos, su apetito se había restablecido por completo y la ingesta de agua era ligeramente superior a la de los animales sanos. Localmente, la superficie de la herida estaba completamente limpia, y el lecho de la herida estaba cubierto por una capa de granulaciones de color rosa pálido en la mayoría de los animales. La superficie de la herida se redujo al 31 % de la superficie inicial. En el grupo de control, la superficie de la herida también estaba limpia y cubierta por una capa de tejido de granulación, pero las heridas producían una gran cantidad de exudado seroso y mucoso. No había edema ni hiperemia de la piel alrededor de la herida. El área de la herida era el 38% del área de la herida inicial y era significativamente mayor ($p < 0,05$) que la del grupo de prueba. En el día 9 de tratamiento, en los animales tratados con WSAP, las heridas se llenaron de tejido de granulación rosa y el área de la herida se redujo al 13 % del área inicial de la herida, mientras que en el grupo de control, el área de la herida se redujo al 18 % del área inicial de la herida ($p < 0,05$). Al mismo tiempo, la superficie de la herida estaba

cubierta de una capa de fibrina de color gris sucio y sangraba al tacto en la mitad de los animales del grupo de control. Quince días después del inicio del tratamiento, las heridas estaban casi completamente epitelizadas en los animales tratados con WSAP. En el grupo de control, las heridas estaban completamente epitelizadas dos días después, es decir, 17 días después del inicio del tratamiento.

En general, la comparación de los cambios dinámicos en la infección purulenta de la herida causada por *St. aureus* y *E. coli* mostró que la inyección intramuscular de 5 µg de WSAP condujo a una eliminación más rápida de la infección en la herida, a una mayor formación de tejido de granulación y epitelización, y a la curación completa de la herida.

Ejemplo 10. Estudio de la actividad antiviral de WSAP en el modelo de infección por Citomegalovirus in vitro.

En este estudio se utilizó la cepa de referencia de Citomegalovirus (CMV, cepa AD169). La actividad de infección por CMV se estimó utilizando células altamente sensibles, los fibroblastos de pulmón diploides humanos (HELFL) obtenidos de la colección de cultivos de tejidos del Instituto de Virología Ivanovsky, del Ministerio de Sanidad de la Federación Rusa. Las células HELFL se cultivaron utilizando el medio de cultivo DMEM complementado con un 10% de FCS, 2mM de L-glutamina y 50 µg/ml de gentamicina. El estudio preliminar de la citotoxicidad in vitro del WSAP mostró que el WSAP en dosis de 3000 µg/ml, 300 µg/ml, 30 µg/ml, 3 µg/ml y 0,3 µg/ml no tenía efectos citotóxicos en las células HELFL a los siete días de exposición.

Para estimar la actividad antiviral (anti-CMV) de WSAP, se cubrieron monocapas de células HELFL en placas de 48 pocillos (2×10^5 células/ml) con el medio libre de suero que contenía la sustancia de ensayo en sus diferentes concentraciones (concentración final de 300 µg/ml, 30 µg/ml, 3 µg/ml y 0,3 µg/ml) y se incubaron durante 1 hora. A continuación, la monocapa de células HELFL se infectó con CMV a una multiplicidad de infección de 10-4 PFU/célula durante 1 hora a 37°C. Se lavó la monocapa celular y se añadió un medio de cultivo completo. Las células se incubaron a 37 °C en 5 % de CO₂ durante 5 días. Las células infectadas con la misma dosis de CMV pero no tratadas con la sustancia de ensayo se utilizaron como control. Cada concentración del WSAP se estudió en triplicas.

El número de placas infectadas por el CMV se estimó mediante la técnica de inmunoperoxidasa utilizando anticuerpos monoclonales contra las proteínas del CMV. La dosis de WSAP que inhibe el CMV se determinó en función de la relación (porcentaje) entre el número de células infectadas (placas) en el cultivo de prueba previamente tratado con el WSAP y el número de placas en el cultivo de células de control, no tratadas. A continuación, se calculó la concentración de WSAP correspondiente a la inhibición del 50% de la formación de placas de CMV (dosis inhibitoria, ID₅₀) mediante el paquete de análisis Probit (versión 1.0, de A. Polekhin).

El WSAP a una dosis de 300 µg/ml, 30 µg/ml y 3 µg/ml inhibió la formación de placas en 63,3 %, 41/1 % y 16,7 %, respectivamente, en relación con el control (Fig. 9). La ID₅₀ se calculó en 18 µg/ml (intervalo del 95 %: 8 - 48 µg/ml).

Se puede concluir que el WSAP no es tóxico para las células HELFL y tiene un efecto antiviral contra la infección por CMV.

Los Ejemplos 1-10 presentados anteriormente demuestran que se ha obtenido una nueva sustancia, que es un peptidoglicano ácido soluble en agua (WSAP) que tiene un peso molecular de 500 kD a 17.000 kD y que comprende porciones de polisacáridos, péptidos y lípidos. Con base en la espectroscopia ¹³CRMN y ¹H RMP, se descifró la estructura de la porción de polisacárido. La sustancia obtenida mediante el procedimiento propuesto es una sustancia novedosa y presenta las siguientes características específicas:

- La porción de polisacáridos del WSAP no contiene glucosa. La porción de polisacáridos de la molécula contiene un ácido galacturónico como monosacárido principal, galactosa, arabinosa y ramnosa. De acuerdo con la espectroscopia de RMN, la relación de peso entre la ramnosa y el ácido galacturónico es 1:6 a 1:4.
- La porción de péptidos del WSAP es de 4-20 % en peso.
- La porción de lípido de la molécula es 2-7 % y está formada por ácidos grasos, principalmente ácido palmítico.

Las pruebas biológicas presentadas anteriormente (Figs. 4-8) demuestran que el WSAP, una nueva sustancia obtenida mediante el procedimiento propuesto tiene una actividad inmunoestimuladora hacia las células dendríticas y los macrófagos y una fuerte actividad antimicrobiana y antiviral. La sustancia tiene una buena solubilidad en agua, lo que permite crear una composición farmacéutica utilizando portadores o cargas farmacéuticamente aceptables tomados en cantidades suficientes.

Por lo tanto, se ha resuelto la tarea de la presente invención, es decir, producir una nueva sustancia con base en polisacáridos derivados de plantas a partir de materias primas vegetales disponibles y con un buen rendimiento, que sea bien soluble en agua y que tenga no sólo fuertes actividades antivirales y antimicrobianas, sino también actividad inmunoestimuladora, en particular hacia las células dendríticas, desarrollar el procedimiento eficaz y tecnológico de producción de dicha sustancia, y crear una composición farmacéutica con base en dicha sustancia y que tenga un alto efecto farmacológico.

Aplicabilidad industrial

La presente invención cumple el criterio de aplicabilidad industrial. Todas las operaciones químicas se adaptan a las condiciones industriales de producción y purificación de un nuevo polímero biológicamente activo.

5

Lista de abreviaturas:

D - dalton (unidad de medida del peso molecular)

10

kD - kilodalton

WSAP – peptidoglicano ácido soluble en agua

15

RMN - resonancia magnética nuclear

RMP - resonancia magnética de protones

GLC - cromatografía gas-líquido

20

BSA - albúmina de suero bovino

PBS - solución amortiguadora de fosfatos

25

FCS - suero fetal de ternera

IL-12 - interleucina-12, citoquina

IL-6 - interleucina-6, citoquina

30

MCP-1 - proteína quimiotáctica de monocitos-1, quimiocina

TNF- α - factor de necrosis tumoral alfa, citoquina

35

GM-CSF- factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, citoquina

NO - óxido nítrico

CMV - citomegalovirus humano

40

HELFL - fibroblastos de pulmón embrionario humano

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir una sustancia que tiene actividades antimicrobianas, antivirales e inmunoestimuladoras, en particular hacia las células dendríticas, que comprende extraer de brotes de patata picados con agua, separar el extracto acuoso de la pella, añadir un agente salino al extracto, concentrar la solución salina obtenida mediante ultrafiltración a través de un filtro de 300 kD, congelar la solución durante 24 horas, descongelar y filtrar la solución, eliminar la pella, precipitar la sustancia bruta de la solución utilizando un agente salino ácido, volver a solubilizar la sustancia bruta con álcali, dializar la solución alcalina contra agua destilada en un filtro y purificar la sustancia de la solución resultante utilizando cromatografía de permeación en gel, en la que el peso molecular de la sustancia es de 500 kDa a 17.000 kDa.

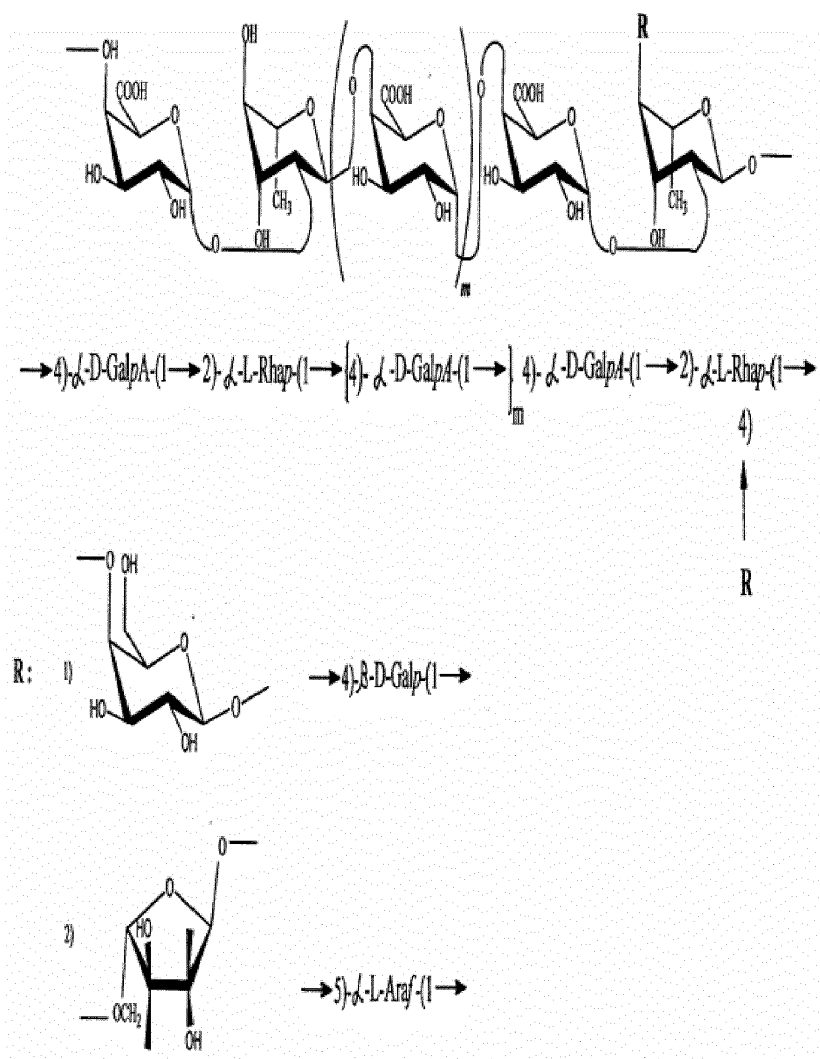
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el agente salino es cloruro de sodio.

3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el agente salino ácido es una sal de amonio inorgánica.

4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la solución alcalina se dializa contra agua destilada en un filtro de 12 kD.

5. Una sustancia con actividades antimicrobianas, antivirales e inmunoestimuladoras, en particular hacia las células dendríticas, producida de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una porción de polisacáridos, una porción de péptidos y una porción de lípidos.

6. La sustancia de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la porción de polisacáridos es 40-60 % de la sustancia, en la que la porción de polisacáridos comprende la siguiente estructura:



donde $m = 3 - 5$ y cada segundo residuo α -L-Rhap lleva un sustituyente R,
donde R son los residuos monosacáridos u oligosacáridos de β -D-galactopiranos, que a su vez llevan
residuos monosacáridos u oligosacáridos de α -L-arabinofuranosa, con una relación de peso entre ramnosa
y ácido galacturónico de 1 :6 a 1 :4.

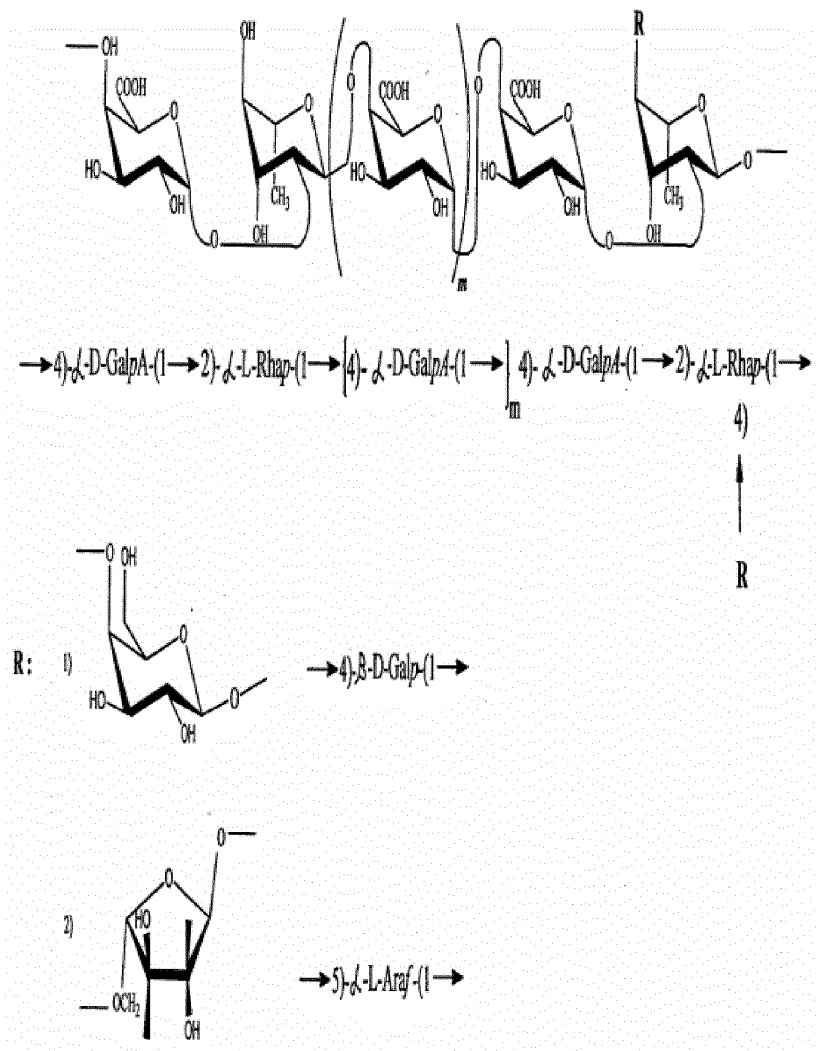
7. La sustancia de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la porción de péptidos es 4 a 20 % de la sustancia.

8. La sustancia de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la porción lipídica está representada por ácidos grasos y
es 2 a 7 % de la sustancia.

9. Una composición farmacéutica que consiste en una sustancia y un portador o relleno farmacéuticamente aceptable,
en la que la sustancia se produce de acuerdo con la reivindicación 1 y comprende una porción de polisacáridos, una
porción de péptidos y una porción de lípidos.

10. Una composición farmacéutica que consiste en una sustancia aislada de brotes de patata y un portador o relleno
farmacéuticamente aceptable, en la que la sustancia consiste en:

(i) 40-60 % (p/p) de polisacárido, en la que el polisacárido comprende la siguiente estructura



donde $m = 3-5$ y cada segundo residuo α -L-Rhap lleva un sustituyente R,
donde R son los residuos monosacáridos u oligosacáridos de β -D-galactopiranos, que a su vez llevan
residuos monosacáridos u oligosacáridos de α -L-arabinofuranosa, con una relación en peso de ramnosa a
ácido galacturónico de 1:6 a 1:4;

(ii) 4-20 % (p/p) de péptido; y

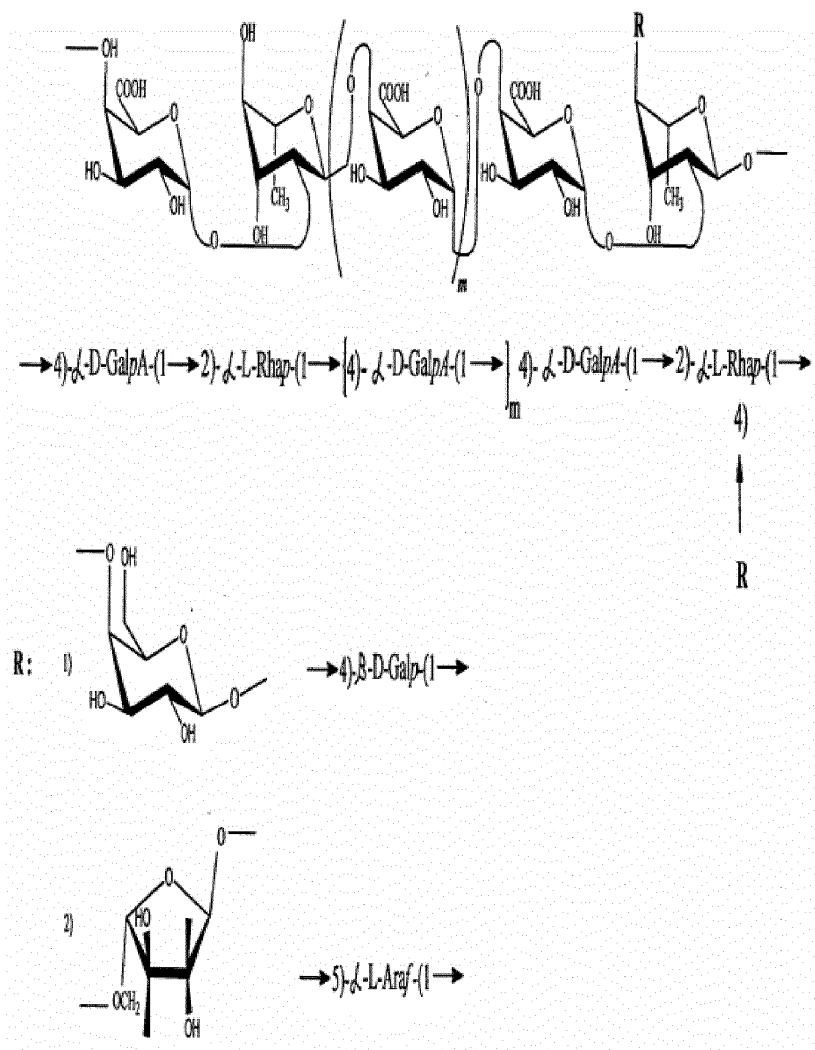
(iii) 2-7 % (p/p) de lípidos.

11. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, en la que la composición farmacéutica está formulada para su administración por inyección.

12. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, en la que el peso molecular de la sustancia es 500 kDa a 17.000 kDa.

13. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una infección bacteriana o una infección viral, o para su uso en la estimulación de la respuesta inmune en un sujeto que necesita la misma, en la que la composición farmacéutica consiste en una sustancia aislada de brotes de patata y un portador de relleno farmacéuticamente aceptable, y en la que la sustancia consiste en:

(i) 40-60 % (p/p) de polisacárido, en la que el polisacárido comprende la siguiente estructura



donde $m = 3-5$ y cada segundo residuo $\alpha\text{-L-Rhap}$ lleva un sustituyente R , donde R son los residuos monosacáridos u oligosacáridos de $\beta\text{-D-galactopiranosas}$, que a su vez llevan residuos monosacáridos u oligosacáridos de $\alpha\text{-L-arabinofuranosa}$, con una relación en peso de ramnosa a ácido galacturónico de 1:6 a 1:4;

(ii) 4-20 % (p/p) de péptido; y

(iii) 2-7 % (p/p) de lípidos.

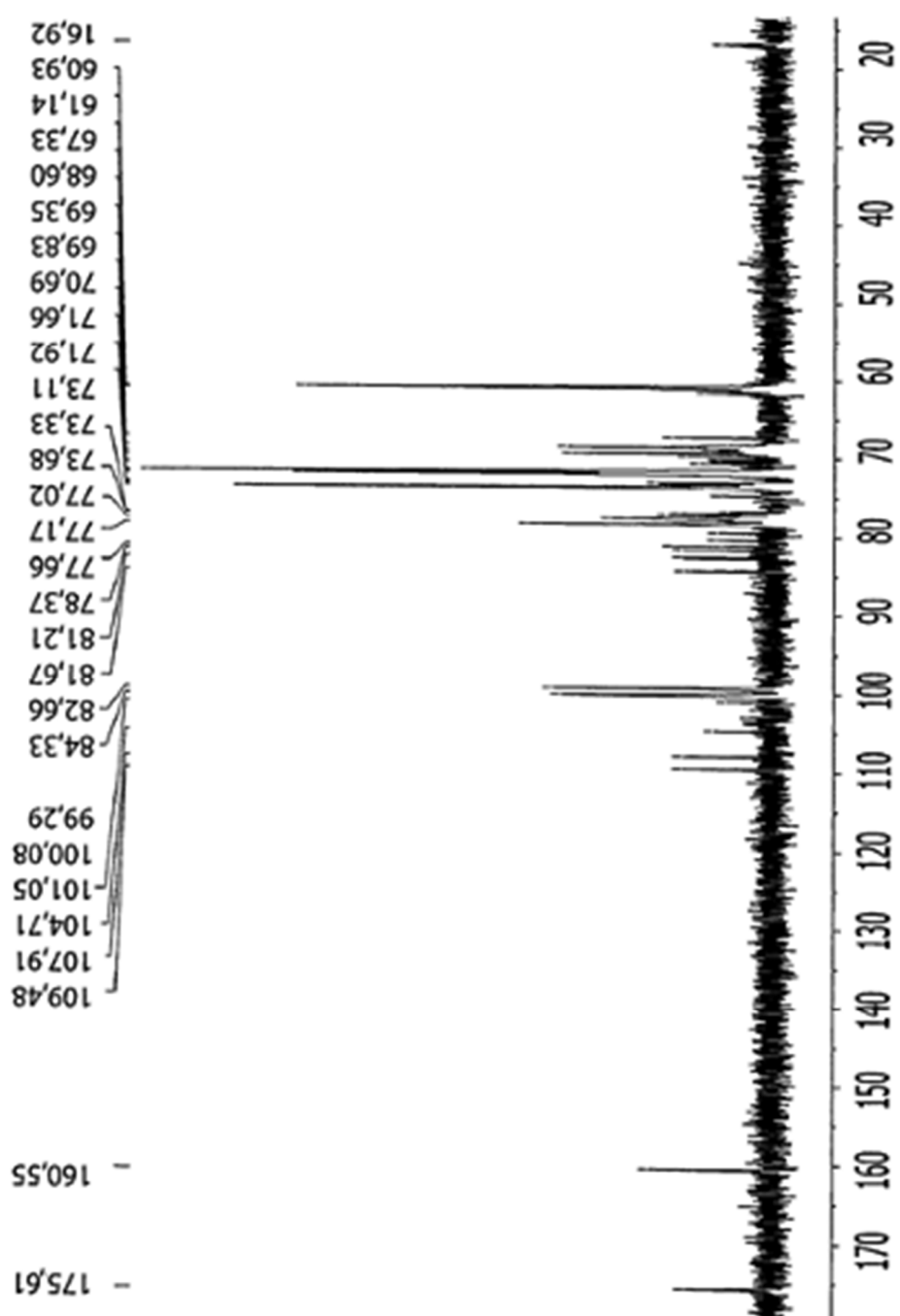


Fig. 1

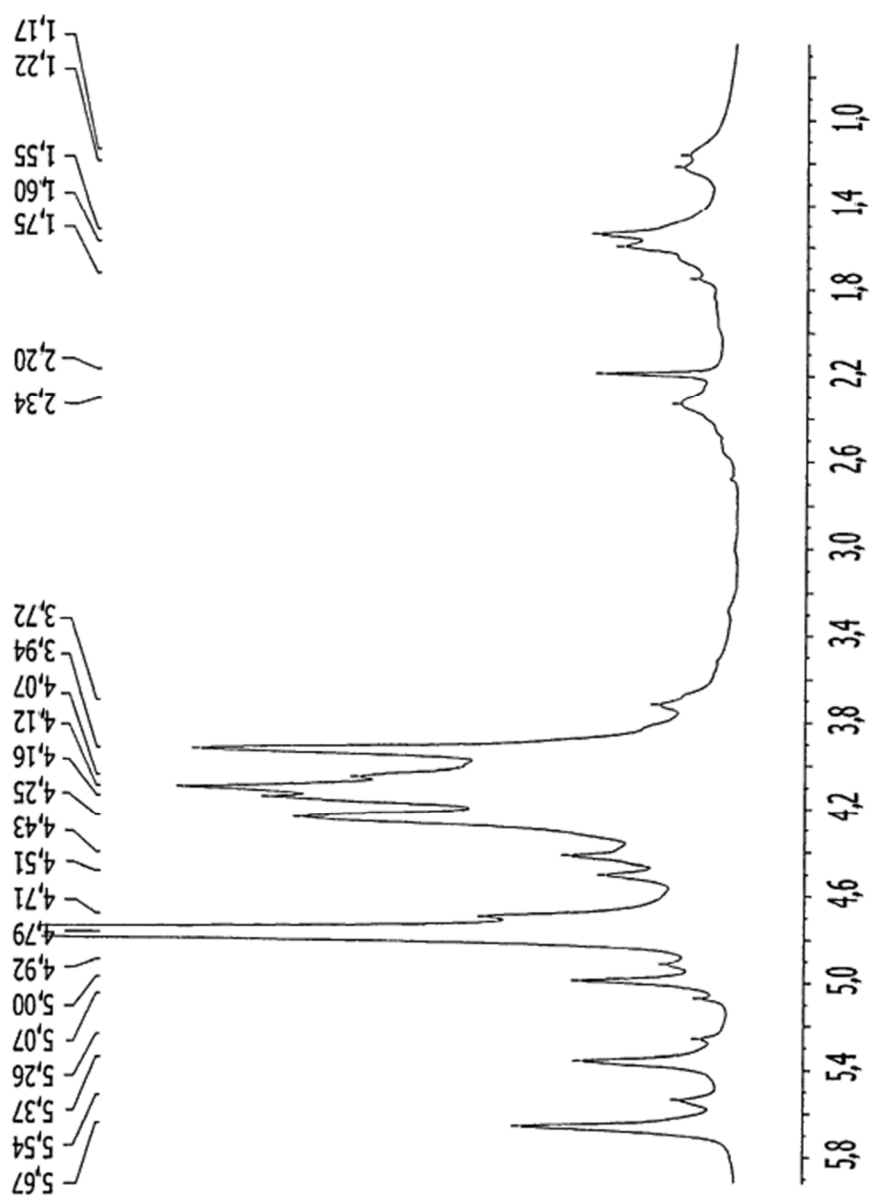


Fig. 2

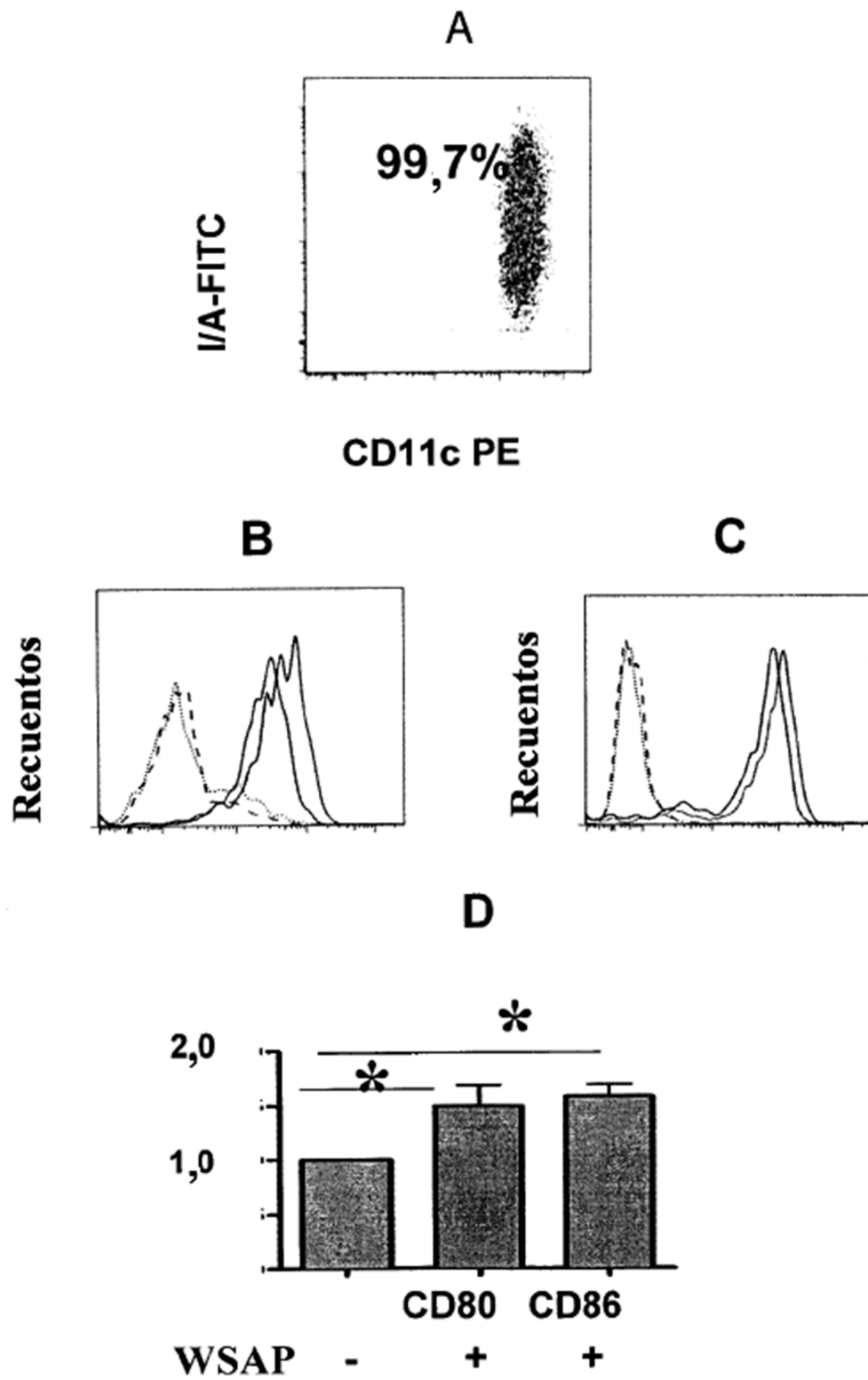


Fig. 4

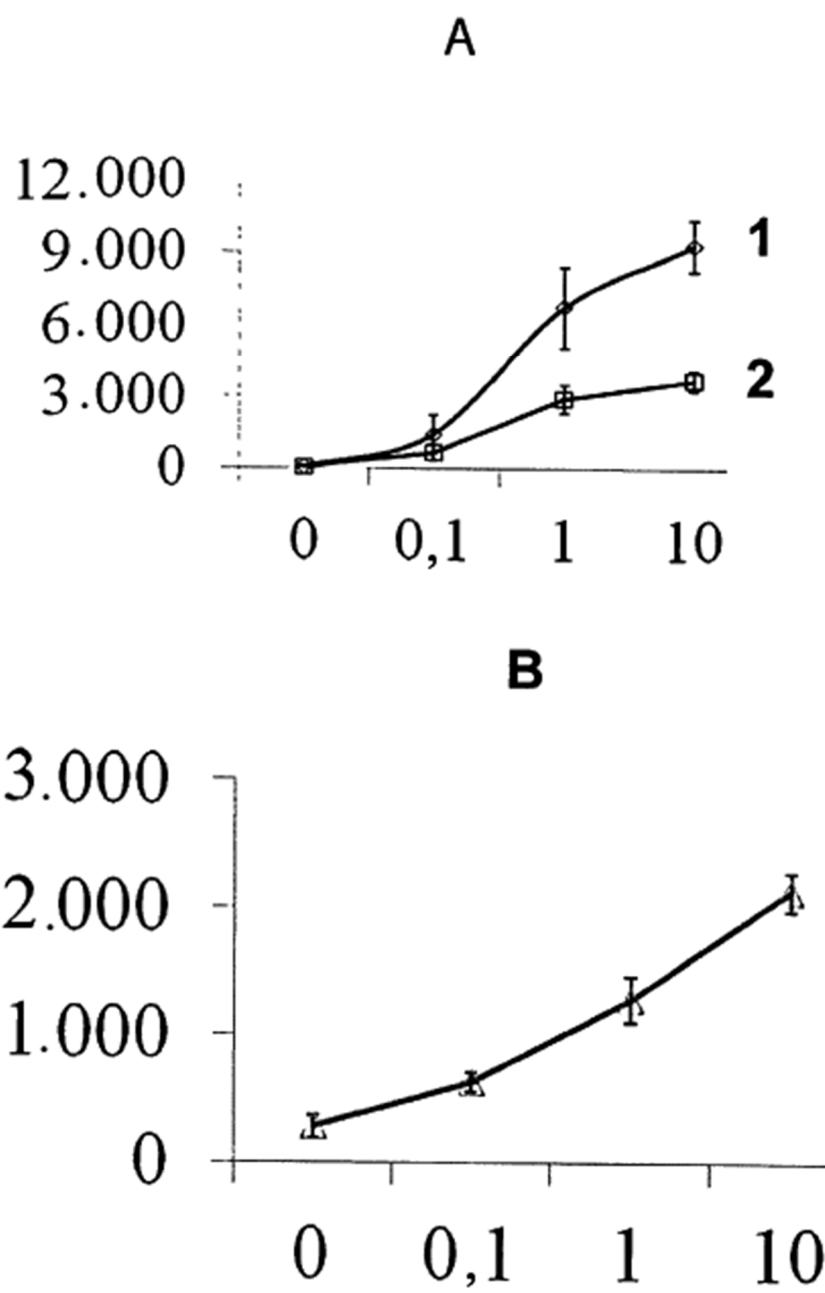


Fig. 5

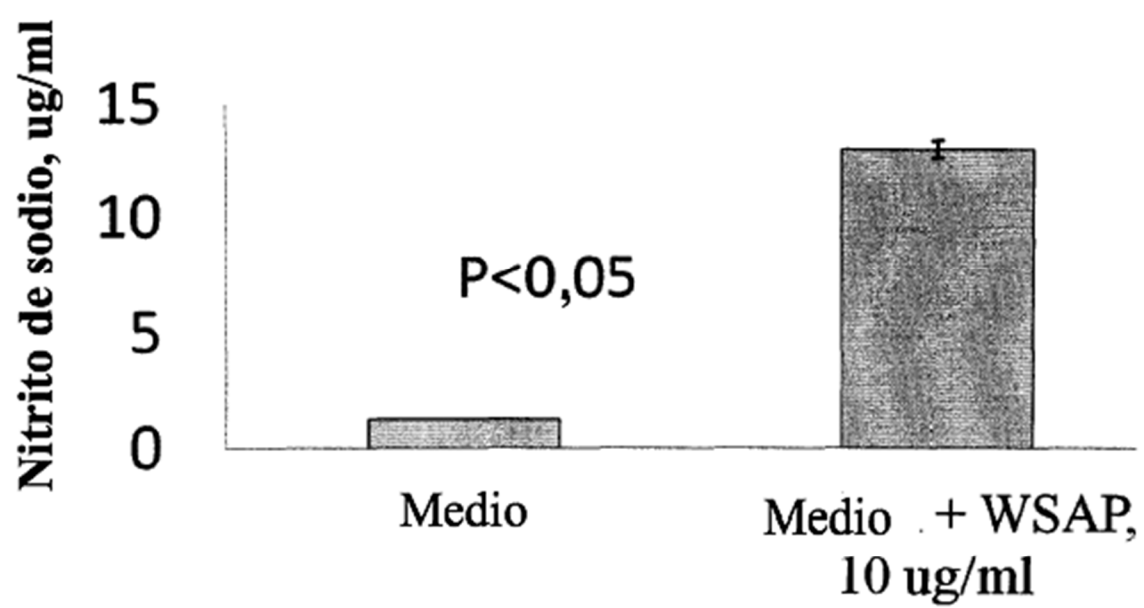


Fig. 6

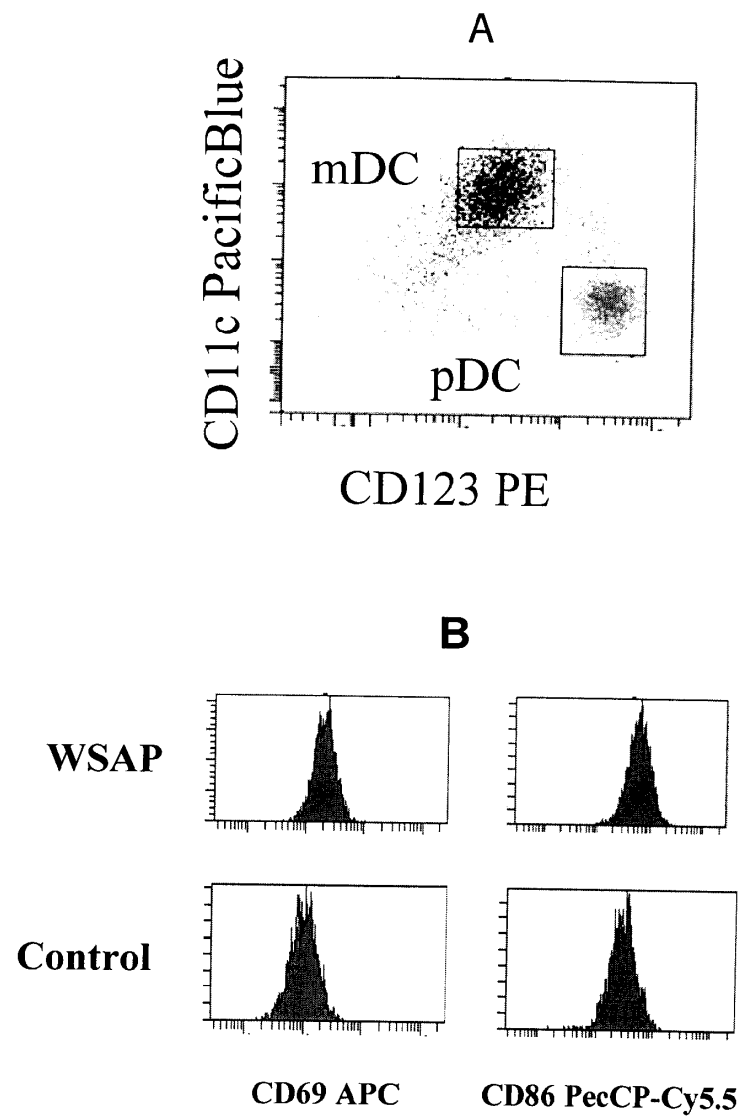


Fig. 7

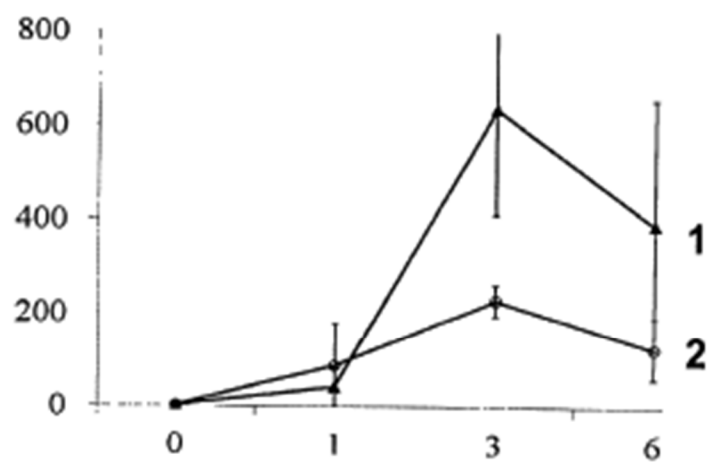


Fig. 8

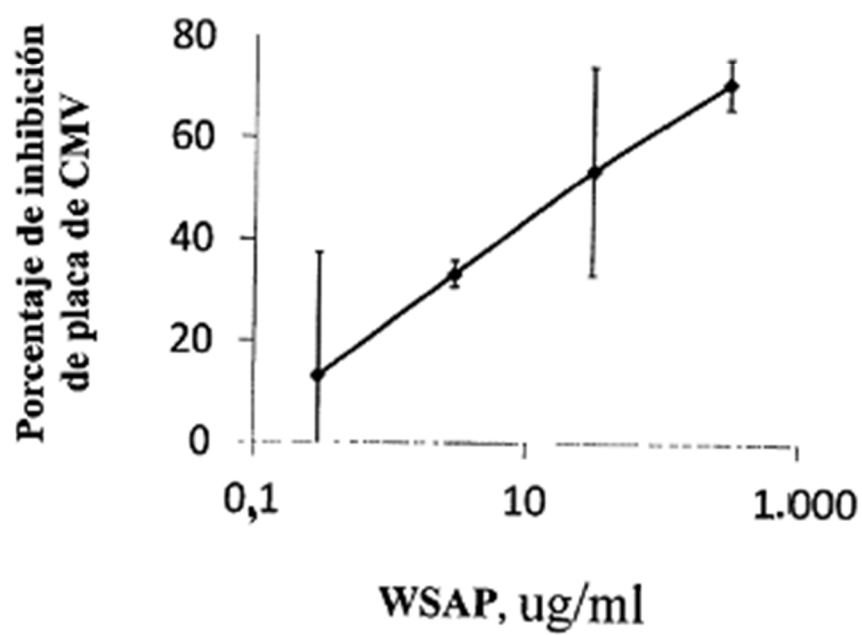


Fig. 9