



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) PI 0713734-6 A2



(22) Data de Depósito: 15/06/2007
(43) Data da Publicação: 06/11/2012
(RPI 2183)

(51) Int.CI.:
A61L 26/00
C12P 19/04
A61K 31/716
C08B 37/00

(54) Título: PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE BETA-GLUCANO SOLÚVEL, E, COMPOSIÇÃO

(30) Prioridade Unionista: 15/06/2006 US 60/813971

(73) Titular(es): Biopolymer Engineering, Inc. DBA Biothera

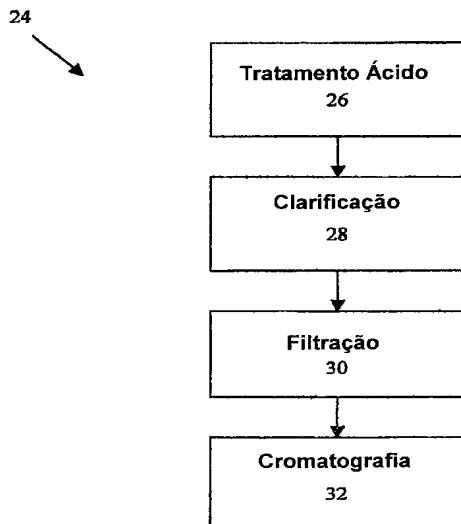
(72) Inventor(es): Andrew Magee, James Rolke, Ren-Der Yang

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT US2007014055 de 15/06/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/146416de 21/12/2007

(57) Resumo: PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE BETA-GLUCANO SOLÚVEL, E, COMPOSIÇÃO. B-glucano em partículas é solubilizado em temperatura e pressão elevadas, de modo a formar B-glucano solúvel. O método é seguro e econômico e produz um produto, que é um agente farmacêutico aperfeiçoado.



“PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE BETA-GLUCANO SOLÚVEL, E,
COMPOSIÇÃO”

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Este pedido reivindica o benefício do U.S. de Nº Serial 60/
5 813. 971, intitulado PREPARAÇÕES DE GLUCANO, depositado em 15 de
Junho de 2006.

A presente invenção refere-se a composições, que incluem β -glucano. De um modo mais particular, a presente invenção refere-se a composições de β -glucano solúveis e a seu uso na mobilização de célula tronco.
10

Os glucanos são geralmente descritos como polímeros de glicose e são derivados de levedura, bactérias, fungos e plantas, tais que a aveia e a cevada. Os glucanos, que contêm uma espinha dorsal glucopiranose ligada por β (1-3) são conhecidos como tendo atividade biológica, eles sendo
15 conhecidos, de um modo geral, como sendo capazes de modular o sistema imune e mais recentemente como induzindo o tronco hematopoiético e a mobilização da célula progenitora (HSPC).

O tratamento de vários cânceres envolve, de um modo crescente, a terapia citorreductora, que inclui quimioterapia ou a radiação em
20 alta dosagem. Estas terapias reduzem as contagens de células sanguíneas brancas do paciente, suprimem a atividade hematopoiética da medula óssea, e aumentam o seu risco de infecção e/ou de hemorragia. Como um resultado, os pacientes, que são submetidos à terapia citorreductora, precisam também receber terapia para reconstituir a função da medula óssea (hematopoiese).
25

A despeito de avanços em técnicas e na mobilização da célula tronco, até 20-25% dos pacientes exibem uma fraca mobilização e não são capazes de prosseguir com o auto – transplante. O β - glucano PGG é um polissacarídeo derivado de levedura solúvel e foi verificado previamente como capaz de induzir a mobilização da célula progenitora da célula tronco

hematopoiética.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Na presente invenção, a levedura é cultivada, colhida e purificada, de modo a fornecer β -glucano em partículas essencialmente livre de compostos orgânicos voláteis (VOCs). O β -glucano em partículas é preparado submetendo-se as células de levedura, ou fragmentos das mesmas, a uma série de extrações alcalinas de tensoativo e ácidas, que removem as impurezas da célula hospedeira.

O β -glucano em partículas, produzido através do processo acima ou através de métodos da arte antecedente, é solubilizado em uma solução ácida, em temperatura e pressão elevadas. O β -glucano solúvel resultante é então clarificado e purificado usando a cromatografia de interação hidrofóbica (HIC), seguida por cromatografia de permeação em gel (GPC). Como um agente farmacêutico, o β -glucano pode ser administrado em doses mais altas, sem aumentar, ou de fato diminuir, os efeitos colaterais ou os eventos adversos observados.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 é uma representação esquemática de um processo para a produção de β -glucano em partículas.

A Figura 2 é uma representação esquemática de um processo para a produção de β -glucano solúvel.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

β -glucano em partículas

A Figura 1 é uma revisão do método 10, que inclui os estágios 12-22, para a produção de β -glucano insolúvel, ou em forma de partículas, a partir de levedura. No estágio 12, é desenvolvida uma cultura de levedura, de um modo típico em um frasco agitado ou em um fermentador. A cepa de levedura utilizada para a presente invenção pode ser qualquer cepa, exemplos das quais incluem *Saccharomyces (S.) cerevisiae*, *S. delbrueckii*, *S. rosei*, *S.*

microellipspodes, S. carlsbergensis, S. bisporus, S. fermentati, S. rouxii, Schizosaccharomyces pombe, Kluyveromyces (K.)lactis, K. fragilis, K. polysporus, Candida (C.) albicans, C. cloacae, C. tropicalis, C. utilis, Hansenula (H.) wingei, H. arni, H. henricii, H. americana, H. canadiensis, H. capsulata, H. polymorpha, Pichia (P.) kluyveri, P. pastoris, P. polymorpha, P. rhodanensis, P. ohmeri, Torulopsis (T.) bovina e T. glabrata.

Em uma modalidade de produção em massa, uma cultura de levedura é iniciada e expandida, de um modo gradual, através de uma cultura em frasco agitado em um fermentador de produção em escala de 250 l. As 10 leveduras são desenvolvidas em um meio de sulfato de amônio –glicose enriquecido com vitaminas, tais que o ácido fólico, inositol, ácido nicotínico, ácido pantotênico (sal de cálcio e de sódio), piridoxina HCl e timina HCl e metais traço de compostos, tais que cloreto férrico, hexaídrato; cloreto de zinco; cloreto de cálcio, diidrato; ácido molibídico; sulfato cúprico, 15 pentaídrato e ácido bórico. Um agente de supressão de espuma, tal que o Antifoam 204 pode ser também adicionado, em uma concentração de cerca de 0,02 %.

A cultura de produção é mantida sob limitação de glicose em um modo de batelada alimentado. Durante a fermentação da semente, as 20 amostras são tomadas periodicamente, de um modo a medir a densidade óptica da cultura antes da inoculação do agente de fermentação da produção. Durante a fermentação da produção, as amostras são também tomadas, de um modo periódico, de modo a medir a densidade óptica da cultura. No final da fermentação, as amostras são tomadas para que seja medida a densidade 25 óptica, o peso seco e a pureza microbiana.

Se desejado, a fermentação pode ser terminada pela elevação do pH da cultura a pelo menos 11, 5 ou pela centrifugação da cultura, de modo a separar as células a partir do meio de crescimento. Em adição, dependendo do tamanho e da forma do β-glucano purificado que for desejada,

estágios para a ruptura ou a fragmentação das células de levedura podem ser executados. Quaisquer métodos químicos, enzimáticos ou mecânicos conhecidos, ou combinação dos mesmos, pode ser usado para a ruptura ou a fragmentação das células de levedura.

5 No estágio 14, são colhidas as células de levedura, que contêm o β -glucano. Quando da produção do β -glucano em massa, as células de levedura são colhidas, de um modo típico, usando a centrifugação em fluxo contínuo.

O estágio 16 representa a extração inicial das células de
10 levedura utilizando um ou mais de uma solução alcalina, um tensoativo, ou uma combinação dos mesmos. Uma solução alcalina adequada é, por exemplo, NaOH), 1 M – 5 M. Os tensoativos adequados incluem, por exemplo, octiltioglicosídeo, Lubrol PX, Triton X-100, lauril sulfato de sódio (SDS), Nonidet P- 40, Tween 20 e os similares. Tensoativos iônicos
15 (aniônico, catiônico, anfotérico), (por exemplo, sulfonatos de alquila, cloretos de benzalcônio, e os similares) e tensoativos não-iônicos (por exemplo, óleos de rícino hidrogenados com polioxietileno, ésteres de ácido graxo de polioxietileno sorbitol, ésteres de ácido graxo de polioxietileno sorbitano, ésteres de ácido graxo de polioxietileno glicerol, ésteres de ácido graxo de
20 polietileno glicol, éteres alquil fenílicos de polioxietileno, e os similares) podem ser também usados. A concentração de tensoativo irá variar, em parte, dependendo de que tensoativo é usado. O material de célula de levedura pode ser extraído uma ou mais vezes.

As extrações são executadas, de um modo usual, em
25 temperaturas de entre cerca de 70°C e cerca de 90°C. Dependendo da temperatura, dos reagentes usados e de suas concentrações, a duração de uma tal extração está entre cerca de 30 minutos e cerca de 3 horas.

Após cada extração, a fase sólida contendo o β -glucano é coletada usando centrifugação ou centrifugação de fluxo contínuo, e

novamente suspensa para o estágio subsequente. As substâncias contaminantes solubilizadas são removidas na fase líquida durante as centrifugações, enquanto que o β - glucano permanece insolúvel no material da parede celular.

5 Em uma modalidade, são executadas quatro extrações. Na primeira extração, as células de levedura colhidas são misturadas com NaOH 1,0 M e aquecida a 90°C, durante aproximadamente 60 minutos. A segunda extração é uma extração de tensoativo /alcalina, pelo que o material insolúvel é novamente suspenso em NaOH 0,1 M e cerca de 0,5% a 0,6% de Triton X-
10 100 e aquecido a 90°C durante aproximadamente 120 minutos. A terceira extração é similar à segunda extração, exceto pelo fato de que a concentração de Triton X- 100 é de cerca de 0,05 %, e a duração é encurtada para cerca de 60 minutos. Na quarta extração, o material insolúvel é novamente suspenso em cerca de 0,5% de Triton - X 100 e é aquecido a 75°C durante
15 aproximadamente 60 minutos.

As extrações de tensoativo e/ ou alcalino solubilizam e removem alguns dos materiais da célula de levedura estranhos. A solução alcalina hidrolisa proteínas, ácidos nucléicos, mananos, e lipídeos. O tensoativo melhora a remoção de lipídeos e de outras impurezas hidrofóbicas,
20 o que proporciona uma vantagem adicional, fornecendo um produto β -glucano aperfeiçoado.

Os procedimentos de purificação prévios resultaram em um β -glucano contendo quantidades diminutas de compostos orgânicos voláteis (VOCs). Estudos prévios demonstraram que os VOCs são produzidos através
25 da liberação da gordura como um ácido graxo, que é rapidamente decomposto em vários VOCs. Na maioria dos casos, as quantidades detectadas não são suficientes para causar dano, no entanto, é um benefício óbvio que exista um produto, que é administrado a seres humanos ou a outros animais, que esteja essencialmente isento de quaisquer VOCs.

O conteúdo de gordura da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, produzida pelo crescimento aeróbico e anaeróbico, está em uma faixa de cerca de 3 % a cerca de 8%. O conteúdo de gordura varia dependendo das condições de crescimento da levedura. A Tabela 1 fornece uma revisão da composição de gordura típica da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Os dados são originados a partir das referências que se seguem:

- Blagovic, B., J. Rrpcuc, M. Meraric, K. Georgia e V. Maric, 2001. Lipid composition of brewer's yeast. Food Technol. Biotechnol. 39: 175 –181.
- 10 • Schulze, 1995. Anaerobic physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. Ph. D Thesis, Technical University of Denmark.
- Van Der Rest, M. E., A. H. Kamming, A. Nakano, Y. Anrak, B. Poolman, and W. N. Koning, 1005. The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function and biogeneis. Microbiol. Ver. 15 59: 304 – 322.

TABELA 1

Ácido Graxo	Schulze (1995)	Blagovic et al. (2001) (crescimento anaeróbico)	Van Der Rest et al. (1995)
10:0 Ácido cáprico	1,1%		
12:0 e 12:1 Ácido láurico	4,8%	7,3%	
14:0 e 14:1 Ácido Mirístico	8,8%	5,1%	7,04%
16:0 Ácido Palmítico	26,8%	44,2%	12,8%
16:1 Ácido Palmitoléico	16,6%	16,9%	32,3%
18:0 Ácido Esteárico	6,1%	13,9%	8,0%
18:1 Ácido Oléico	25,7%	7,3%	28,0%
18:2 e superiores Ácido Linolênico, Ácido Araquidônico e outros	10,1%	5,3%	9,4%

inclui lipídeos a 10:0 a 14:1

O material de parede celular de levedura contém, de um modo típico, de 10-25% de gordura, dependendo do tipo de levedura e das

condições de crescimento. Presentemente, durante o processamento do material da parede celular de levedura em β - glucano, alguma, mas não toda a gordura é removida através de estágios de centrifugação e lavagem. Deste modo, uma preparação típica pode fornecer um conteúdo de gordura de 3-7%.

5 O processo de manufatura envolve, de um modo típico, estágios para a remoção de manoproteínas, lipídeos e outros componentes indesejáveis da parede celular da levedura. Alguns estágios chave, comuns a este processamento, são vários estágios de lavagem, que empregam ácido e álcali em estágios de lavagem separados, de modo a liberar certos
10 componentes da parede celular. Vários dos estágios utilizam um processo de lavagem alcalino, em que um álcali, usualmente hidróxido de sódio, é adicionado à suspensão de parede celular líquida. Um dos propósitos do álcali é o de remover o lipídeo através da formação de ácidos graxos livres no lipídeo. O resultado é uma redução do conteúdo de gordura no β -glucano.

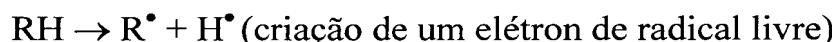
15 Os estágios de lavagem alcalinos usualmente empregados na produção de β - glucano deixam para trás ácidos graxos residuais e triglicerídeos de gordura parcialmente degradados, que possuem uma reatividade aumentada. O resultado direto do processo de lavagem alcalino é a liberação dos ácidos graxos livres reativos, que se decompõem rapidamente a
20 vários produtos oxidativos da decomposição de gordura.

Numerosos pesquisadores detalharam o fato de que as gorduras poliinsaturadas se decompõem durante o armazenamento. Embora um triglycerídeo possa ser autoxidado na presença de oxigênio, é mais comum que os ácidos graxos livres sejam submetidos a uma decomposição oxidativa. O estágio normal na decomposição de um lipídeo, também conhecido como um triglycerídeo, é a liberação do ácido graxo livre a partir do triglycerídeo. Os ácidos graxos livres são virtualmente não existentes nos tecidos de organismos vivos, mas a decomposição é comum quando o organismo morre ou é colhido para o processamento adicional, tal como

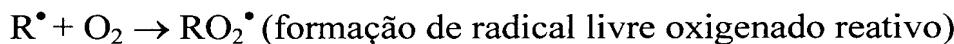
ocorre com sementes oleosas e no fornecimento de gordura animal. (Nawar, W. W. Capítulo 4. Lipids In: Food Chemistry. © 1985. Editor: Owen R. Fennema. Marcel Dekker, Inc.; DePan, J. M. Capítulo 2. Lipids In: Principles of Food Chemistry © 1985. AVI Publishing Co., Inc.). Em muitos triglicerídeos, a posição 2 da molécula de glicerídeo é ocupada por uma gordura insaturada. No caso do tratamento alcalino de β - glucano, este é o processo de saponificação bem conhecido, que consiste na liberação de ácidos graxos insaturados, que são decompostos com abaixo descrito.

O processo de oxidação de gordura possui vários mecanismos.

10 O mecanismo mais comum é a autoxidação. O processo é iniciado através da remoção de hidrogênio a partir de um composto olefinico, de modo a criar um radical livre. A remoção do hidrogênio ocorre nos átomos de carbono próximos à ligação dupla na gordura. A reação é iniciada através de vários fatores, que geram radical livre, tais que a luz UV, metais, oxigênio singlet, 15 etc.

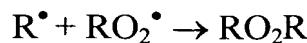


O segundo estágio consiste na adição de oxigênio, de modo a causar a formação de um radical livre de peróxi, que propaga a reação em cadeia através da extração de hidrogênio e partir de um outro ácido graxo 20 insaturado.



$RO_2^\bullet + RH \rightarrow ROOH + R^\bullet$ (ROOH é o hidroperóxido reativo que decompõe os produtos de reação secundários, tais que VOCs).

A reação em cadeia continua até que seja terminada pelos 25 radicais livres, que são combinados consigo mesmos de modo a fornecer produtos não reativos.



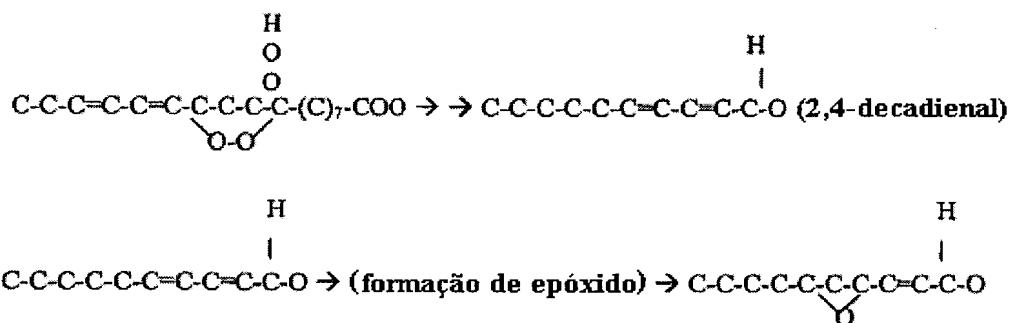
As que se seguem são reações químicas, que ocorrem de modo

a formar os VOCs. O ácido linoléico é usado como um modelo para a química, mas existem outros ácidos graxos insaturados presentes na parede celular da levedura e nas preparações de β - glucano de levedura, que produzem os mesmos produtos finais.

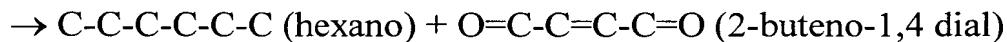


$\text{RO}^\bullet \rightarrow$ as reações de clivagem foram aldeídos, radicais alquila (que formam hidrocarbonetos e álcoois), ésteres, álcoois, e hidrocarbonetos.

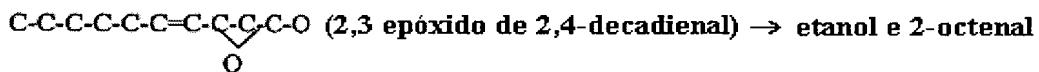
Exemplo:



A decomposição do epóxido produz vários produtos,
10 incluindo:



De um modo similar, se o epóxido for formado entre as ligações de carbono 2 e 3, as química conduz a:



De um modo similar, a formação de quaisquer VOCs
15 identificados nas preparações em β - glucano pode ser considerada através de reações de autoxidação, que ocorrem com a decomposição da espécie reativa de peróxidos formados durante a oxidação de ácido graxo. Portanto, a remoção de tanta gordura quanto possível a partir de preparações de β -glucano, cria um produto que é mais puro não apenas em termos de gordura,
20 mas também em termos de contaminação de VOC.

Com referência de novo à Figura 1, o próximo estágio no

processo de purificação é uma extração ácida apresentada no estágio 18, que remove glicogênio. Uma ou mais extrações ácidas são efetuadas através do ajuste do pH do material extraído de substância alcalina / tensoativo a entre cerca de 5 e 9, e mistura do material em cerca de 0,05 M a cerca de 1,0 M, em 5 ácido acético, em uma temperatura de entre de cerca de 70°C e 100°C, durante de aproximadamente 30 minutos acerca de 12 horas.

Em uma modalidade, material insolúvel remanescente após a centrifugação da extração de substância alcalina/ tensoativo é novamente suspensa em água, e o pH da solução é ajustado para cerca de 7, com HCl 10 concentrado. O material é misturado com ácido acético glacial suficiente, de modo a produzir uma solução de ácido acético 0,1 M, que é aquecida a 90°C durante aproximadamente 5 horas.

No estágio 20, o material insolúvel é lavado. Em um estágio de lavagem típico, o material é misturado em água purificada, a cerca da 15 temperatura ambiente, durante um mínimo de cerca de 20 minutos. A lavagem com água é executada em dois períodos. O produto β -glucano purificado é então coletado, conforme mostrado pelo estágio 22. De novo, a coleta é executada, de um modo típico, através de centrifugação ou de centrifugação em fluxo contínuo.

20 Neste ponto, é formado um produto β - glucano em partículas, purificado. O produto pode estar sob a forma de partículas de glucano inteiras ou qualquer porção das mesmas, dependendo do material de partida. De um modo adicional, partículas de tamanho maior podem ser rompidas a partículas de tamanho menor. A faixa de produto inclui partículas de β - glucano, que 25 foram retidas, de um modo substancial em morfologia *in vivo* (partículas de glucano inteiras) a até partículas de tamanho submicrônico.

Como é bem conhecido na arte, o β -glucano em partículas é útil em muitas aplicações alimentares, suplementares e farmacêuticas. De um modo alternativo, o β -glucano em partículas pode ser adicionalmente

processado, de modo a formar um β -glucano solúvel, aquoso.

β -glucano solúvel

A Figura 2 consiste em uma revisão do método 24, que inclui os estágios 26-32, para a produção do β -glucano solúvel, aquoso. O material de partida usado no método 24 é β -glucano em partículas, que pode ser produzido através do método 10 ou produzido através de qualquer um de um número de métodos previamente usados. O material de partida β -glucano em partículas pode estar situado em uma faixa de tamanho a partir de partículas de glucano inteiras a até partículas de tamanho submicrônico.

No estágio 26, o β -glucano em partículas é submetido a um tratamento ácido sob pressão e em temperatura elevada, de modo a produzir o β -glucano solúvel. O β -glucano em forma de partículas, transformado em pelotas, é novamente suspenso e misturado em um vaso de reação que pode ser vedado, em uma solução de tampão e levado a um pH de 3,6. Os reagentes de tampão são adicionados de tal modo que cada litro, o volume total, da suspensão final da mistura contenha cerca de 0,61 g de acetato de sódio, 5,24 ml de ácido acético glacial e 430 g de β -glucano em partículas, transformado em pelotas. O vaso é purgado com nitrogênio, de modo a remover o oxigênio e aumentar a pressão no interior do vaso de reação.

Em uma modalidade particular, a pressão no interior do vaso é conduzida a 35 PSI (0,24 MPa), e a suspensão é aquecida a cerca de 135°C, durante entre cerca de 4,5 e 5,5 horas. Foi verificado que, sob estas condições, o β -glucano será solubilizado. À medida em que a temperatura decresce a abaixo de 135°C, a quantidade de solubilização também diminui.

Deve ser notado que esta temperatura e pressão são requeridas na modalidade justo descrita. A otimização de temperaturas e pressões pode ser requerida, se qualquer das condições de reação e/ ou reagentes for alterada.

A pressão e a temperatura aumentadas conferem vantagens em

relação aos processos da arte anterior para a solubilização de β -glucano, virtualmente eliminando o uso de substâncias químicas perigosas a partir do processo. As substâncias químicas perigosas, que eram previamente usadas, incluem, por exemplo, os VOCs inflamáveis, tais que o éter e o etanol, ácidos muito fortes, tais que o ácido fórmico e o ácido sulfúrico e as soluções cáusticas de pH muito elevado. O presente processo não apenas é mais seguro, mas através da redução do número de diferentes substâncias químicas usadas e do número de estágios envolvidos, é mais econômico.

A duração exata do tratamento térmico é determinada, de um modo típico, experimentalmente, através da amostragem do conteúdo do reator e da execução de análises de cromatografia de permeação em gel (GPC). O objetivo é o de maximizar o rendimento do material solúvel, que satisfaz às especificações quanto ao perfil de alta resolução – GPC (HR-GPC) e de níveis de impureza, que são discutidos abaixo. Uma vez que o β -glucano seja solubilizado, a mistura é resfriada, de um modo a interromper a reação.

O β -glucano solubilizado, bruto, pode ser lavado e utilizado em algumas aplicações neste ponto, no entanto, para aplicações farmacêuticas, a purificação adicional deve ser executada. Qualquer combinação de um ou mais dos estágios que se seguem pode ser usada, de modo a purificar o β -glucano solúvel. Outros meios conhecidos na arte podem ser também usados, se desejado. No estágio 28, o β -glucano é clarificado. Meios de clarificação adequados incluem, por exemplo, a centrifugação ou a centrifugação em fluxo contínuo.

A seguir, o β -glucano solúvel pode ser filtrado, tal como mostrado pelo estágio 30. Em uma modalidade, o material é filtrado, por exemplo, através de um filtro profundo, seguido por um filtro de 0,2 μm .

O estágio 32 utiliza a cromatografia para a purificação adicional. O β -glucano solúvel pode ser condicionado em algum ponto

durante o estágio 28 ou o estágio 30, na preparação para a cromatografia. Por exemplo, se um estágio cromatográfico incluir a cromatografia de interação hidrofóbica (HIC), o β -glucano solúvel pode ser condicionado à condutividade e ao pH apropriados, com uma solução e sulfato de amônio e acetato de sódio. Uma solução adequada é sulfato de sódio 3,0 M, acetato de sódio 0,1 M, que é usado para ajustar o pH para 5,5.

Em um exemplo de HIC, uma coluna é compactada com uma resina Tosah Toyopearl Butyl 650 M (ou equivalente). A coluna é compactada e qualificada de acordo com as recomendações do fabricante.

Antes do carregamento, é efetuada uma coleta do fluxo de passagem de equilíbrio da coluna, para análises de pH, condutividade e endotoxina. O β -glucano solúvel, condicionado na concentração mais elevada da solução de sulfato de amônio, é carregado e então lavado. A natureza do β -glucano solúvel é tal, que a maior parte do produto será ligada à coluna HIC. Produtos de baixo peso molecular, assim como alguns produtos de peso molecular alto, são lavados até o fim. O β -glucano solúvel remanescente na coluna é eluído com um tampão, tal que sulfato de amônio 0,2 M, acetato de sódio 0,1 M, pH 5,5. Ciclos múltiplos podem ser necessários, de modo a assegurar que a carga de hexose não exceda a capacidade da resina. As frações são coletadas e analisadas quando ao produto β -glucano solúvel.

Um outro estágio cromatográfico, que pode ser utilizado, é a cromatografia de permeação em gel (GPC). Em um exemplo de GPC, uma resina Tosah Toyopearl HW55F, ou equivalente, é utilizada e compactada e qualificada, conforme recomendado pelo fabricante. A coluna é equilibrada e eluída através do uso de solução salina tamponada com citrato (cloreto de sódio 0,14 M, citrato de sódio 0,011 M< pH 6,3). Antes do carregamento, amostras da lavagem da coluna são tomadas para análises quanto ao pH, condutividade e endotoxina. De novo, múltiplos ciclos de cromatografia podem ser requeridos, de modo a assegurar com que a carga não exceda a

capacidade da coluna.

O eluído é coletado em frações, e várias combinações de amostras a partir das frações são analisadas, de modo a determinar a combinação com o perfil ótimo. Por exemplo, as combinações de amostras 5 podem ser analisadas através de HR- GPC, de modo a fornecer uma combinação tendo um perfil de HR- GPC otimizado. No perfil otimizado, a quantidade de impurezas de alto peso molecular, que é constituída por β -glucanos solúveis acima de 380.000 Da, é inferior a ou igual a 10%. A quantidade de impurezas de baixo peso molecular (LMW), abaixo de 25.000 10 Da, é inferior a, ou igual a 17%. A combinação selecionada de frações é subseqüentemente colocada em reservatórios.

Neste ponto, o β -glucano solúvel e purificado e está pronto para o uso. Filtração adicional pode ser executada, de modo a esterilizar o produto. Se desejado, a concentração de hexose do produto pode ser ajustada 15 a cerca de $1,0 \pm 0,15$ mg/ ml com solução salina tamponada com citrato estéril.

As técnicas de purificação acima descritas resultam em um β -glucano solúvel aperfeiçoadado, que provê vantagens específicas como um agente farmacêutico, que são discutidas abaixo. O β - glucano solúvel possui 20 um peso molecular médio de entre cerca de 120.000 Da e cerca de 205.000 Da e uma distribuição de peso molecular (polidispersividade) de não mais do que 2,5, conforme determinado por HR – GPC, com dispersão luminosa de ângulo múltiplo (HR- GPC /MALS) e detecção de índice refrativo diferencial. A difração de raio X em pó e o RMN de rotação de ângulo mágico 25 determinaram que o produto consiste de cadeias poliméricas associadas em hélices triplas.

O β - glucano solúvel é, de um modo típico, não- carregado, e portanto não possui pK_a . Ele é solúvel em água independentemente do pH, e a viscosidade aumenta à medida em que a concentração aumenta.

A Tabela 2 sumaria os níveis típicos de impurezas em um produto de β -glucano solúvel, utilizando as partículas de glucano inteiras, produzidas pelo método 10.

TABELA 2

Impureza	Especificação	Faixa de Níveis Observados em 3 Bateladas
HMW(> 380 kD)	$\leq 10\%$	4-8%
LMW (< 25 kD)	$\leq 17\%$	8-13%
Açúcar de Redução	0,7 – 1,6% de hexose total	1,0 – 1,1% de hexose total
Glicogênio	$\leq 10\%$ de Hexose total	< 5% de hexose total
Manano (como manose)	$\leq 1\%$ de hexose recuperada	<0,6 a $\leq 0,8\%$ de hexose recuperada
Quitina (como glucosamina)	$\leq 2\%$ de hexose total	0,2-0,5% de hexose total
Proteína	$\leq 0,2\%$ de hexose total	$\leq 0,2\%$ de hexose total
Proteína de Levedura	Caracterização **	< 2 ng/mg de hexose
DNA	Caracterização	< 6,5 a < 50 pg/mg de hexose
Ergosterol	Caracterização	< 10 a < 25 μ /mg de hexose
Triton X-100	Caracterização	< 1 a 5 μ g/mg de hexose
Antifoam 204	Caracterização	< 10 μ g/mg de hexose

5 ** A hexose total é determinada através de um ensaio colorimétrico. Os polímeros de açúcar são hidrolisados em ácido sulfúrico e antrona, de modo a formar furfurais. Os furfurais são conjugados com a antrona, de modo a fornecer um cromóforo, que é medido espectrofotometricamente.

** Os limites não são especificados.

10 As impurezas relacionadas ao produto incluem material com pesos moleculares superiores a 380.000 daltons ou menos do que 25. 000 daltons, porque foi verificado que o β -glucano solúvel recai entre aquelas faixas de peso molecular.

15 Uma medição adicional das impurezas relacionadas ao produto é açúcar de redução. Cada cadeia de polissacarídeo glucano termina na forma aldeído (açúcar de redução) do açúcar. Deste modo, a quantidade de açúcar serve como uma indicação do número de cadeia na preparação. Como uma nova terminação de redução é gerada com cada clivagem de cadeia, o açúcar de redução é um monitor da estabilidade da cadeia. Os açúcares de redução 20 podem ser medidos pelo ensaio do ácido bicinconínico (BCA), que é bem conhecido na arte.

As impurezas do processo potenciais incluem outros constituintes da célula de levedura, tais que o DNA, as proteínas da célula de levedura, lipídeos e outros polissacarídeos, tais que o glicogênio, manano e quitina. Os níveis de DNA podem ser analisados usando o ensaio de hibridização de fenda (MDS PanLabs, Seattle, WA). A proteína residual pode ser determinada através de um ensaio colorimétrico para a proteína ou através de um ensaio imunossorvente ligado por enzima comercial mais sensível, que mede as proteínas celulares de *S. cerevisiae* (Cygnus Technology, Southport, North Carolina). Os lipídeos residuais podem ser monitorados através da avaliação dos níveis de ergosterol usando cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa (RP - HPLC), com detecção a 280 nm.

O glicogênio é um polissacarídeo, que compreende primariamente uma glicose α -1,4- ligada, e a sua presença pode ser determinada através de um ensaio enzimático. O produto é adicionado a uma reação enzimática contendo amiloglicosidase, que libera glicose a partir de glicogênio, gerando os açúcares de redução. Os açúcares de redução são medidos através do ensaio BCA.

Manano é um polímero ramificado de uma manose α -1,6 – ligada com ramificações α -1,2- e α -1,3, que são monitoradas, como manose, pela sua composição de monossacarídeo. O produto é adicionado a uma reação, e a manose é hidrolisada com o ácido trifluoroacético e analisada através de HPLC.

Quitina é um polímero de glicosamina β -1,4-acetil, que é monitorado por um ensaio colorimétrico. O β -glucano solúvel é hidrolisado com o ácido sulfúrico, e a glucosamina resultante forma um complexo com um reagente de Ehrlich, que é medido de um modo colorimétrico. Estes e outros ensaios adequados são conhecidos daqueles versados na arte.

As impurezas não- levedura potenciais, que são originadas a partir de componentes adicionados durante o processo de manufatura incluem

Triton X-100 (tensoativo) e Antifoam 204 (agente de supressão de espuma). O HPLC de fase reversa (RP- HPLC) com detecção em 280 nm pode ser suado para discernir qualquer Triton X- 100- residual. O antifoam 204 é determinado através de um método RP- HPLC, usando monitoração de íon seletiva com um detector de espectroscopia de massa por eletropulverização em modo positivo.

10

Certas especificações do produto são propostas para a utilização do β -glucano solúvel como um agente farmacêutico. Estas especificações estão relacionadas na Tabela 3.

TABELA 3

Categoría	Atributo	Método	Limites Propostos
Geral	Aparência	Visual	Solução clara, incolor
	pH	Medidor de pH	5,0 – 7,5
	Osmolaridade	Osmômetro	260-312 mOsm
Identidade	Perfil de HR- GPC	GPC – MALS	em conformidade com o padrão: razão de volumes de retenção de pico: 0,8 – 1,2
Concentração	Concentração (hexose total)	Ensaio de hexose colorimétrico	0,85 – 1,15 mg/ ml
Impurezas	Material HMW	GPC - MALS	\leq 10%
	Material LMW	GPC- MALS	\leq 17%
	Açúcar de redução	Ensaio MCA	0,7 – 1,6% de hexose total
	Proteína residual	Ensaio de proteína Colorimétrica	\leq 0,2% de hexose total
	Quitina (glicosamina)	Ensaio colorimétrico	\leq 0,2% de hexose total
	Manano (manose)	Composição de monossacarídeo	\leq 1 % de hexose recuperada
	Glicogênio	Enzimático	\leq 10 % de hexose
Segurança	Endotoxina	Ensaio de Fator C recombinante de PiroGene	\leq 0,25 EU* /ml
	Biocarga	Filtração de Membrana	\leq 5 CFU**/ 10 ml

* Unidade de formação de colônia

** Unidade de endotoxina

15

Como acima mencionado, o β -glucano solúvel, produzido pelos métodos 10 e 24, é um produto aperfeiçoado em relação aos materiais de β - glucano solúveis na arte. O aperfeiçoamento é observado em resultados de ensaio clínico, em que o β - glucano solúvel da presente invenção,

fornecido em uma dose máxima muito mais alta, apresentou os mesmos ou eventos adversos mais fracos (Aes), como as doses máximas inferiores do β -glucano solúvel da arte antecedente. Os resultados são apresentados na Tabela 4.

TABELA 4

AE Relacionado (ocorrente em $\geq 5\%$ de participantes totais)	Bfl ¹	β - Glucano ² solúvel aperfeiçoado
Corpo com um todo		
Dor dorsal	7%	--
Febre	16%	--
Dor de Cabeça	30%	8%
Dor	7%	--
Cardiovascular		
Vasodilatação /Descarga	--	6%
Náusea Digestiva	7%	6%
Hémica /limfática		
Equimose	--	--
Leucocitose	--	--
Dispneia Respiratória	--	1%
Atralgia Muscoesquelética	11%	--
Pele/ Apêndices		
Urticária	7%	--
Erupção	--	--
Sentidos Especiais		
Conjuntivite	9%	--

5 ¹ dose única máxima 2,25 mg/ kg

2 ² dose única máxima 6,0 mg/kg

Bf¹ é conhecido pela marca registrada Betafектин™, um produto β - glucano solúvel desenvolvido por Alpha – Beta Technology, Inc. O processo para produzir Betafектин™ utilizou o ácido fórmico, de modo a solubilizar o material β - glucano em partículas. Em adição, Bf¹ não foi submetido a qualquer cromatografia em seu processo de purificação.

Os estudos foram realizados com uma população de voluntários de pacientes saudáveis. Quando comparados a Bf¹, os participantes do estudo, que estavam tomando o β - glucano solúvel relataram menos efeitos adversos, mesmo que a dose máxima fosse maior do que 2,5 vezes aquela de Bf¹. Deste modo, uma dosagem muito mais alta do β - glucano solúvel aperfeiçoado pode ser dada, pelo menos sem o aumento, mas provavelmente até com a diminuição, dos efeitos colaterais. Em adição, o β -

glucano solúvel não induz mediadores bioquímicos, tais que a interleucina- 1 β e o fator - α de necrose tumoral, que causam os efeitos colaterais inflamatórios.

Os processos da presente invenção proporcionam várias vantagens em relação a processos da arte anterior e resultam em produtos β -glucano aperfeiçoados. O β - glucano em partículas está essencialmente livre de VOCs danosos. A solubilização de β - glucano é mais segura e mais econômica. Em adição, a solubilização do β - glucano em partículas, produzida pelo presente processo, resulta em β - glucano solúvel, com qualidades farmacêuticas aperfeiçoadas.

Embora esta invenção tenha sido mostrada e descrita com referências a modalidades particulares, será entendido por aqueles versados na arte que várias alterações, na forma e no detalhe, podem ser introduzidas na mesma, sem que haja afastamento do espírito e do escopo da invenção abrangida pelas reivindicações apensas.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a produção de β -glucano solúvel, tendo propriedades imunoestimulantes, o processo caracterizado pelo fato de que compreende:

5 aplicar cerca de 35 PSI (0,25 MPa) de pressão a uma suspensão de β - glucano em partículas e ácido; e

 aquecer a suspensão a cerca de 135°C, durante um período de tempo suficiente para formar o β - glucano solúvel.

10 2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende ainda:

 clarificar o β - glucano solúvel.

15 3. Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o β - glucano solúvel é clarificado através de centrifugação, filtração ou uma combinação dos mesmos.

20 4. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a suspensão está em um vaso, no qual substancialmente todo o oxigênio é removido.

25 5. Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o oxigênio é removido através da purga do vaso com nitrogênio.

 6. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende ainda:

 separar o β - glucano solúvel em frações baseadas no peso molecular.

25 7. Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o β - glucano é separado através de cromatografia.

 8. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o ácido é o ácido acético.

 9. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende β -

glucano solúvel, não- derivado, tendo propriedades imunoestimuladoras, que pode ser administrado em doses únicas, de até cerca de 6 mg/kg.

10. Composição de acordo com a reivindicação 9,
caracterizada pelo fato de que o β- glucano solúvel, não- derivado, não contém mediadores bioquímicos, que causam efeitos colaterais inflamatórios.

11. Composição de acordo com a reivindicação 10,
caracterizada pelo fato de que os mediadores bioquímicos são a interleucina – 1 β, o fator - α de necrose tumoral, ou ambos.

12. Composição de acordo com a reivindicação 9,
10 caracterizada pelo fato de que o β-glucano solúvel, não-derivado, é derivado a partir de *Saccharomyces cerevisiae*.

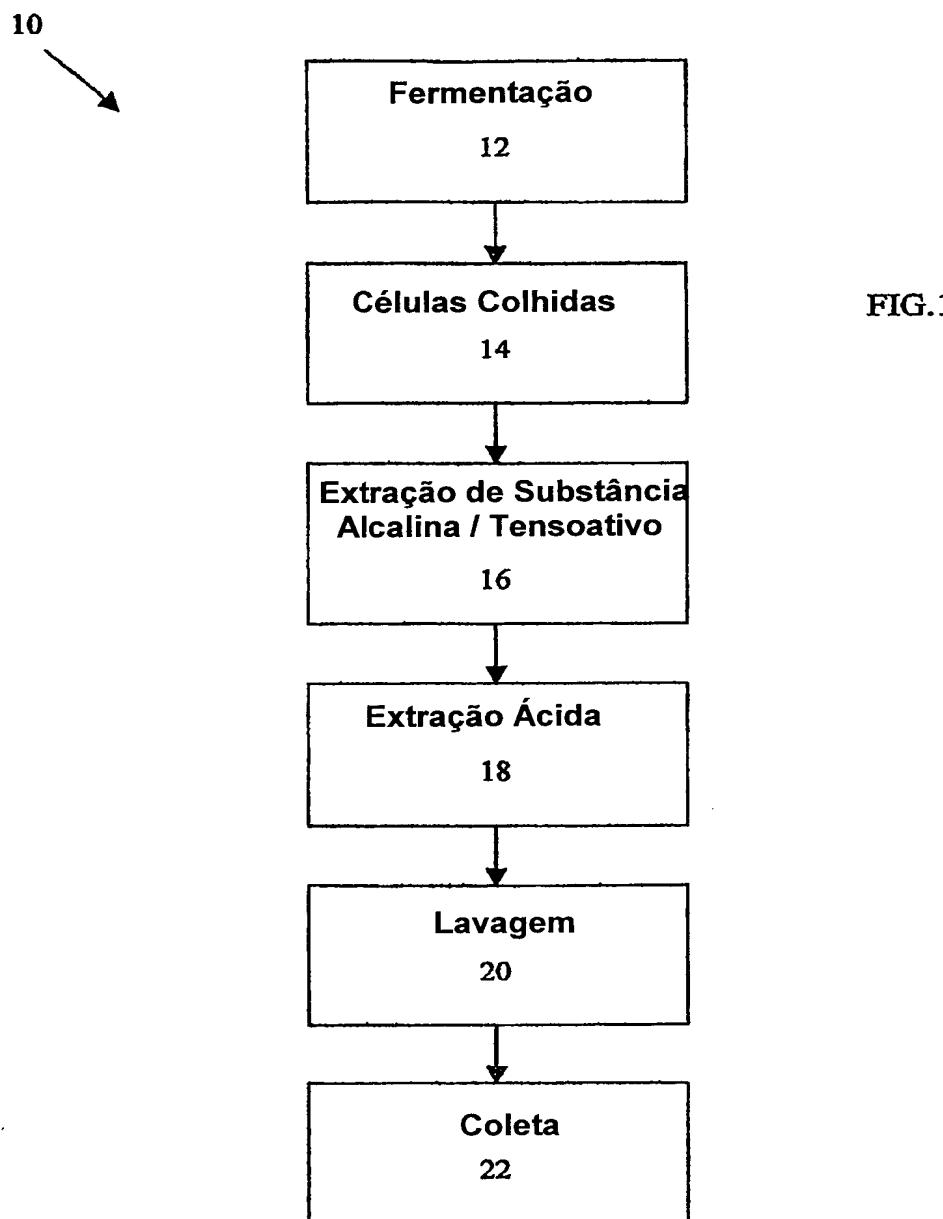
13. Composição de acordo com a reivindicação 9,
caracterizada pelo fato de que o β-glucano solúvel, não- derivado, está entre cerca de 25.000 e cerca de 380.000 Da.

15 14. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende β- glucano solúvel, não- derivado tendo um peso molecular médio entre cerca de 120.000 Da e cerca de 205.000 Da, a composição capaz de ser administrada a um humano ou animal em uma dose de até cerca de 6 mg/kg.

20 15. Composição de acordo com a reivindicação 14,
caracterizada pelo fato de que o β-glucano solúvel, não- derivado, contém não mais do que cerca de 1,6 % de açúcar de redução de hexose total.

16. Composição de acordo com a reivindicação 14,
caracterizada pelo fato de que o β-glucano solúvel, não- derivado, contém menos do que cerca de 25 µg/mg de hexose.

25 17. Composição de acordo com a reivindicação 14,
caracterizada pelo fato de que não mais do que 8% de humanos administrados, o β-glucano solúvel, não- derivado mostra qualquer um dos eventos adversos.



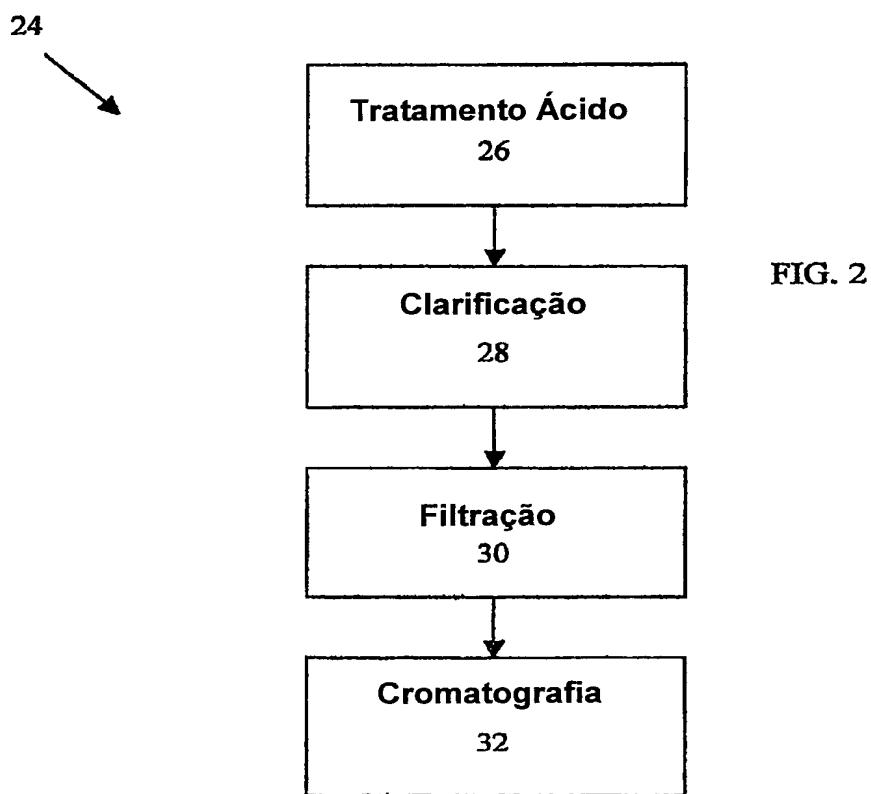


FIG. 2

RESUMO

“PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE BETA-GLUCANO SOLÚVEL, E, COMPOSIÇÃO”

β-glucano em partículas é solubilizado em temperatura e pressão elevadas, de modo a formar β- glucano solúvel. O método é seguro e econômico e produz um produto, que é um agente farmacêutico aperfeiçoado.