

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 941 274**

51 Int. Cl.:

C08B 30/04 (2006.01)

C08B 30/18 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.03.2015 PCT/FR2015/050706**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.09.2015 WO15140477**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.03.2015 E 15717196 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.01.2023 EP 3119813**

54 Título: **Procedimiento optimizado de descontaminación de producción de polímeros de glucosa y de hidrolizados de polímeros de glucosa**

30 Prioridad:

21.03.2014 FR 1452354

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.05.2023

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 941 274 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento optimizado de descontaminación de producción de polímeros de glucosa y de hidrolizados de polímeros de glucosa

La presente invención se refiere a la elaboración de un procedimiento optimizado de descontaminación de los circuitos de producción o de purificación de polímeros de glucosa, más particularmente los destinados a los campos alimentarios (ingredientes saludables ricos en fibras) y médicos (diálisis peritoneal), o de hidrolizados de polímeros de glucosa, más particularmente los destinados a los campos médicos (glucosa apirógena inyectable).

Antecedentes tecnológicos de la invención

La sociedad solicitante ha elegido desarrollar su invención en un campo conocido por la peligrosidad de los contaminantes de origen microbiano propensos a desarrollarse en los circuitos de producción de los polímeros de glucosa o en los de producción de sus hidrolizados, contaminantes que son el origen de posibles:

- intoxicaciones alimentarias,
- reacciones inflamatorias muy perjudiciales para la salud humana.

Por tanto, en el contexto de un proceso de seguridad alimentaria, como en el de un proceso de seguridad sanitaria, es importante garantizar la ausencia de contaminantes de origen microbiano, tanto en forma de células vivas como de residuos celulares, mediante cualquier medio técnico adecuado, concretamente:

- la definición de métodos eficaces de identificación y de dosificación de contaminantes,
- la definición de circuitos de producción seguros, mediante la implementación de dispositivos y de técnicas de purificación adaptadas.

En el caso de la diálisis peritoneal, debe prepararse un determinado número de componentes, en las condiciones de pureza más estrictas.

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

Los dializados más habitualmente usados están compuestos por una disolución tampón (lactato o bicarbonato) a pH ácido (5,2-5,5) o fisiológico (7,4), a la que se le añaden:

- electrolitos (sodio, calcio, magnesio, cloro) y, sobre todo,
- un agente osmótico, principalmente un polímero de glucosa, tal como, por ejemplo, "icodextrina", presente en la disolución para diálisis peritoneal ambulatoria EXTRANEAL®, comercializada por la sociedad BAXTER.

En este campo más particular del uso de los polímeros de la glucosa destinados a la diálisis peritoneal continua y ambulatoria, se ha constatado muy rápidamente que estos hidrolizados de almidón (mezcla de glucosa, de oligómeros y de polímeros de glucosa) no podían usarse por sí mismos.

La solicitud de patente europea EP 207.676 enseña que se prefieren polímeros de glucosa que forman disoluciones límpidas e incoloras al 10 % en agua, que tienen un peso molecular promedio en peso (Mw) de 5.000 a 100.000 Dalton, y un peso molecular promedio en número (Mn) inferior a 8.000 Dalton.

Tales polímeros de glucosa también comprenden, preferiblemente, al menos el 80 % de polímeros de glucosa cuyo peso molecular esté comprendido entre 5.000 y 50.000 Dalton, poco o nada de glucosa, o de polímeros de glucosa con DP inferior o igual a 3 (peso molecular de 504), y poco o nada de polímeros de glucosa con peso molecular superior a 100.000 (DP próximo a 600).

Dicho de otro modo, los polímeros de glucosa preferidos son polímeros de glucosa de bajo índice de polimolecularidad (valor obtenido calculando la razón de Mw/Mn).

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

- o bien en realizar una precipitación fraccionada de una maltodextrina, con la ayuda de un disolvente miscible en agua,

- o bien en realizar una filtración molecular de esta misma maltodextrina, a través de diferentes membranas que posean un umbral de corte o de exclusión adecuado.

5 En los dos casos, estos procedimientos tienen como objetivo eliminar a la vez los polímeros de muy alto peso molecular y los monómeros u oligómeros de bajo peso molecular.

No obstante, estos procedimientos no resultan satisfactorios tanto desde el punto de vista de su puesta en práctica como desde el punto de vista de los rendimientos y de la calidad de los productos que permiten obtener.

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

15 El polímero de glucosa obtenido mediante fraccionamiento cromatográfico contiene, entonces, preferiblemente menos del 3 % de glucosa y de polímeros de glucosa con DP inferior o igual a 3, y menos del 0,5 % de polímeros de glucosa con DP superior a 600.

20 A partir de entonces, los expertos en el campo de la diálisis peritoneal admiten, finalmente, que estos polímeros de glucosa, usados por su poder osmótico, resultan totalmente satisfactorios.

Los riesgos de contaminación

25 No obstante, existen los riesgos de contaminación microbiana de las preparaciones destinadas a la diálisis peritoneal.

En efecto, se sabe que los circuitos de producción de los polímeros de glucosa pueden contaminarse por microorganismos o por sustancias proinflamatorias contenidas en dichos microorganismos.

30 Por ejemplo, en almidonería se describe la contaminación de los almidones de maíz o de trigo, mediante microorganismos de tipo levaduras, mohos y bacterias, y, más particularmente, mediante bacterias acidotermófilas de tipo *Alicyclobacillus acidocaldarius* (bacterias extremófilas que se desarrollan en las zonas calientes y ácidas del circuito).

35 Entonces, el principal riesgo para el paciente que recibe estos productos contaminados, es la peritonitis.

Estos episodios de peritonitis están provocados por infecciones bacterianas intraperitoneales, y habitualmente el diagnóstico se establece fácilmente mediante cultivos positivos de dializado.

40 Por su parte, la "peritonitis estéril", descrita como peritonitis aséptica, química o de cultivo negativo, está provocada únicamente por un irritante químico o un cuerpo extraño.

45 Desde la introducción de la icodextrina para la preparación de disoluciones de diálisis peritoneal, se han notificado casos aislados de peritonitis aséptica, que pueden estar asociados a diversas causas y, concretamente, a la inducción mediante sustancias proinflamatorias posiblemente presentes.

Por tanto, los episodios inflamatorios asépticos son complicaciones principales observadas tras inyecciones de disoluciones de diálisis.

50 Aunque una parte de estos episodios inflamatorios está asociada a un problema de tipo químico (inyección accidental de contaminantes químicos o malas dosificaciones de determinados compuestos), la mayor parte de los casos está directamente asociada a la presencia de contaminantes de origen microbiano presentes en las disoluciones que sirven para la preparación de las disoluciones de diálisis.

55 Los lipopolisacáridos (LPS) y los peptidoglicanos (PGN), son los principales contaminantes de origen microbiano que presentan un alto riesgo de desencadenar una inflamación, aunque estén presentes a nivel de trazas.

60 Por otro lado, supone un mérito de la sociedad solicitante haber tenido también en cuenta la presencia de moléculas propensas a agravar la respuesta inflamatoria inducida por estos contaminantes, tales como los productos de despolimerización de los PGN, cuya estructura mínima todavía bioactiva es el muramil-dipéptido (MDP).

Además de los productos de despolimerización de los PGN, los péptidos microbianos formilados, cuyo prototipo es el f-MLP (tripéptido formil-Met-Leu-Phe), también tienen una actividad sinérgica importante. Inicialmente, estos péptidos se identificaron por su actividad quimioatrayente sobre los leucocitos, mientras que son incapaces de inducir una respuesta citocínica en sí mismos.

Por tanto, es importante no despreciar estas “pequeñas moléculas”, ya que pueden informar de manera indirecta sobre los episodios inflamatorios asépticos, agravando los efectos de trazas de PGN y/o de LPS.

Definición de métodos eficaces de identificación y de dosificación de dichos contaminantes

Por tanto, la sociedad solicitante se ha dedicado a desarrollar métodos de detección y de dosificación más eficaces que los accesibles en el estado de la técnica.

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

No obstante, estos modelos *in vitro* están sujetos a una importante variabilidad interindividual, lo cual puede ser responsable de sesgos experimentales.

A la inversa, las líneas celulares de monocitos proporcionan respuestas constantes, lo cual explica por qué las pruebas actualmente en desarrollo usan cada vez más este tipo de células en cultivo. No obstante, estas pruebas presentan el inconveniente de dar una respuesta inflamatoria global a todos los contaminantes presentes en una mezcla en una disolución y, por consiguiente, no permiten caracterizar la naturaleza del contaminante.

También es importante indicar que la respuesta inflamatoria agravada es visible para las citocinas de la fase aguda de la inflamación, tales como:

- TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa),
- IL-1 β (interleucina 1 β), y
- las quimiocinas, tales como CCL5 [ligando 5 de quimiocina (motivo C-C)]/RANTES (regulada tras activación, expresada en células T normales y secretada), pero poco o nada para la IL-6 (interleucina 6).

Por tanto, los métodos basados en la producción de la IL-6 (documentos US-2009/0239819 y US-2007/0184496) no están adaptados para detectar contaminantes en una mezcla en una disolución.

Por tanto, ha supuesto un mérito de la sociedad solicitante haber desarrollado, en su solicitud de patente internacional WO 2012/143647, métodos sensibles y eficaces de detección de los contaminantes microbianos que tienen una acción proinflamatoria, por debajo del umbral de sensibilidad de los procedimientos actualmente usados y/o descritos en la bibliografía, y posteriormente haber identificado la familia, incluso la naturaleza, de las moléculas proinflamatorias presentes en formas de trazas en los lotes procedentes de los circuitos de producción.

Determinación de la eficacia de las etapas unitarias de purificación

La sociedad solicitante ha buscado, a continuación, definir mejor las etapas clave de purificación que deben ponerse en práctica para garantizar una seguridad óptima de las líneas de producción, concretamente, de los polímeros de glucosa.

Para ello, se ha dedicado a validar las etapas clave unitarias de purificación de dichos circuitos, empleando los métodos de detección y dosificaciones basados en las líneas de monocitos, tal como se presentan en la solicitud de patente internacional WO 2012/143647.

Por tanto, en su solicitud de patente internacional WO 2013/178931, la sociedad solicitante ha analizado la eficacia de las siguientes etapas unitarias:

- tratamiento térmico,
- acidificación,
- paso sobre carbón activo,
- paso sobre resinas de adsorción, de ultrafiltración, de filtración,
- hidrólisis química o enzimática.

Para analizar la eficacia de estas diferentes etapas unitarias, entonces se realizaron diferentes etapas de descontaminación sobre diferentes matrices:

- polímeros de glucosa, materias primas de la icodextrina (antes del fraccionamiento cromatográfico, según las enseñanzas de la patente EP 667.356),

- un lote de icodextrina,
- un lote de maltodextrina ramificada, comercializada por la sociedad solicitante, con la marca NUTRIOSE® FB06,
- un lote de monohidrato de dextrosa, preparado para acondicionarse en disolución inyectable, comercializado por la sociedad solicitante, con la marca LYCADEX® PF,
- un lote de polímeros solubles de glucosa altamente ramificados, preparado según las enseñanzas de la solicitud de patente internacional WO 2007/099212, de la que la sociedad solicitante es la titular,
- una maltodextrina comercial.

Aunque estos diferentes trabajos han permitido demostrar la incidencia que podía tener cada una de estas etapas sobre la eliminación de contaminantes dados, para cada una de las matrices, todavía hacía falta definir la mejor combinación adecuada para proteger todas las matrices de todos los posibles contaminantes.

Por tanto, a partir del conjunto de los resultados presentados en la solicitud de patente WO 2013/178931, todavía existía una necesidad no satisfecha de elaborar un procedimiento optimizado de descontaminación de los circuitos de producción o de purificación de polímeros de glucosa, más particularmente, los destinados a los campos alimentarios (ingredientes saludables ricos en fibras) y médicos (diálisis peritoneal), o de hidrolizados de polímeros de glucosa, más particularmente, los destinados a los campos médicos (glucosa apirógena inyectable).

Sumario de la invención

Por tanto, la presente invención propone una combinación de varias etapas de descontaminación cuidadosamente seleccionadas y ordenadas, que resulta ser eficaz para eliminar todas las moléculas inflamatorias susceptibles de estar presentes en los circuitos de producción, concretamente, polímeros de glucosa seleccionados de la icodextrina y la maltodextrina, independientemente de la naturaleza de la contaminación.

Por tanto, el procedimiento de la invención se refiere a la siguiente combinación de etapas, en el siguiente orden:

- tratamiento mediante una preparación enzimática con actividad de mananasa,
- tratamiento mediante un carbón activo con capacidad de adsorción muy alta, con calidad farmacéutica y con porosidad de “microporos”;
- opcionalmente, tratamiento mediante un segundo carbón activo con una porosidad de “mesoporos”,
- paso sobre una resina adsorbente polimérica macroporosa, que presenta una porosidad superior a 100×10^{-10} m, y
- ultrafiltración continua sobre 5 kDa.

En el sentido de la invención, se entiende por:

- “preparación enzimática con actividad de mananasa”, una preparación tal como la Mannaway®, comercializada por la sociedad Novozymes;
- “carbón activo con capacidad de adsorción muy alta, con calidad farmacéutica y con porosidad de “microporos””: un carbón activo con porosidad equivalente al carbón activo Norit C Extra USP;
- “carbón activo con porosidad de “mesoporos””: un carbón activo con porosidad equivalente al carbón activo ENO-PC;
- “resina adsorbente polimérica macroporosa, que presenta una porosidad superior a 100 Angström”: una resina de tipo DOWEX OPTIDORE SD2.

Preferiblemente, el procedimiento comprende las 5 etapas.

Los polímeros de glucosa se seleccionan de la icodextrina y las maltodextrinas, en particular, de las maltodextrinas ramificadas o no, y los hidrolizados de polímeros de glucosa son un producto de hidrólisis total, tal como el monohidrato de dextrosa.

Las etapas seleccionadas permiten seleccionar como diana las diferentes familias de contaminantes y, por tanto, obtener productos libres de reactividad inflamatoria.

Descripción detallada de la invención

El procedimiento de la invención está destinado a sustituir a las vías habitualmente puestas en práctica para purificar los polímeros de glucosa o sus hidrolizados.

El procedimiento de descontaminación de los polímeros de glucosa o sus hidrolizados de sus moléculas proinflamatorias, según la invención, comprende las siguientes etapas:

- a) proporcionar polímeros de glucosa o sus hidrolizados;
- b) opcionalmente, detectar o dosificar las moléculas proinflamatorias en los polímeros de glucosa o sus hidrolizados, proporcionados en la etapa a);
- c) realizar las siguientes etapas de purificación, en el siguiente orden:
 - i. tratamiento mediante una preparación enzimática con actividad de mananasa,
 - ii. tratamiento mediante un carbón activo con capacidad de adsorción muy alta, con calidad farmacéutica, con porosidad de "microporos",
 - iii. opcionalmente, tratamiento mediante un segundo carbón activo con una porosidad de "mesoporos",
 - iv. paso sobre una resina adsorbente polimérica macroporosa, que presenta una porosidad superior a 100×10^{-10} m, y
 - v. ultrafiltración continua sobre 5 kDa,

en las que los polímeros de glucosa se seleccionan de icodextrina y las maltodextrinas.

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

Los polímeros de glucosa, que se prepararán en el contexto de la presente invención, son icodextrina o maltodextrinas (ramificadas o no, tal como se describirá a continuación).

Los hidrolizados de polímeros de glucosa, de los que se trata en este caso, se refieren, concretamente, al producto de hidrólisis total, tal como el monohidrato de dextrosa apirógeno, comercializado con la marca LYCADEX® PF por la sociedad solicitante.

Pueden descontaminarse en uno o varios estadios de su preparación y, concretamente, a nivel de las últimas etapas de su procedimiento de preparación.

Por tanto, los polímeros de glucosa o sus hidrolizados proporcionados en los procedimientos según la presente invención, corresponden al producto que precede al producto final.

Los contaminantes proinflamatorios son sobre todo moléculas de origen bacteriano.

En particular, pueden ser:

- PGN,
- LPS,
- lipopéptidos,
- productos de despolimerización de los PGN, concretamente MDP,
- los péptidos microbianos formilados, tales como el f-MLP,
- β -glucanos,
- etc...

Los métodos de medición de las respuestas inflamatorias *in vitro* que se usan en el contexto de la presente invención para realizar un seguimiento de la eficacia de las etapas de descontaminación de los procedimientos de preparación

de polímeros de glucosa de uso terapéutico en el ser humano (por ejemplo, disoluciones de diálisis peritoneal), se basan en pruebas celulares ("bio-assays") que usan líneas de tipo monocitos/macrófagos (THP-1 y/o Raw-Blue™) y líneas transfectadas que expresan un receptor específico de la inmunidad natural (HEK-Blue™), pruebas celulares desarrolladas por la sociedad solicitante y detalladas en sus solicitudes de patente anteriores.

Preferiblemente, se usan cinco líneas:

- línea Raw-Blue™: esta línea procedente de macrófagos murinos responde a la mayoría de los contaminantes proinflamatorios susceptibles de estar presentes en las matrices y derivados de polímeros de glucosa (PGN, lipopéptidos, LPS, zimosano, LTA). Por tanto, su uso permite estimar la carga global en moléculas proinflamatorias presentes en las muestras.
- línea HEK-Blue™ hTLR2: esta línea que expresa el receptor hTLR2 responde específicamente a los agonistas del TLR2 (principalmente PGN y lipopéptidos). Por tanto, su uso permite conocer la tasa de estos contaminantes en el desencadenamiento de las respuestas inflamatorias,
- línea HEK-Blue™ hTLR4: esta línea que expresa el receptor hTLR4 responde específicamente a los LPS. Por tanto, su uso permite conocer la tasa de estos contaminantes en el desencadenamiento de las respuestas inflamatorias,
- línea HEK-Blue™ hNOD2: esta línea que expresa el receptor hNOD2 responde específicamente a los agonistas de NOD2. Por tanto, su uso permite conocer la tasa de MDP y moléculas relacionadas en el desencadenamiento de las respuestas inflamatorias,
- línea HEK-Blue™ Null2: se trata de una línea de control, no transfectada por un receptor de la inmunidad. Su uso es necesario para verificar que las disoluciones de polímeros de glucosa o de sus hidrolizados no induzcan la producción de la SEAP mediante un mecanismo de toxicidad.

No obstante, debe observarse que el experto en la técnica también puede usar otras líneas comerciales (IMGENEX), o puede prepararlas.

En una realización preferida, las líneas celulares se ponen en práctica a una densidad comprendida entre 0,5 y 1 × 10⁶ células/ml de medio de cultivo, y la puesta en contacto de la preparación de polímeros de glucosa o sus hidrolizados con las células dura aproximadamente de 16 a 24 h.

Puede realizarse una cuantificación de los contaminantes con la ayuda de una curva de dosis-respuesta. Esta curva de dosis-respuesta puede realizarse, concretamente, con las mismas células, en las mismas condiciones, con dosis crecientes de contaminantes. Las curvas de dosis-respuestas se realizan, en particular, con patrones de LPS, PGN, lipopéptido y MDP.

Preferiblemente, una curva de dosis-respuesta de este tipo puede realizarse para las células que expresan TLR4 (por ejemplo, THP-1, HEK-Blue™ hTLR4 y Raw-Blue™) con dosis crecientes de LPS, para las células que expresan TLR2 (por ejemplo, THP-1, HEK-Blue™ hTLR2 y Raw-Blue™) con dosis crecientes de PGN, y para las células reactivas mediante NOD2 (por ejemplo, HEK-Blue™ hNOD2) con dosis crecientes de MDP.

Las pruebas celulares pueden realizarse tal como se describe en las solicitudes de patente del solicitante: WO2012/143647 y WO2013/178931.

La primera etapa de descontaminación del procedimiento según la invención, consiste en un tratamiento mediante una preparación enzimática con actividad de mananasa, tal como la preparación enzimática Mannaway®, comercializada por la sociedad Novozymes, que resulta ser eficaz para disociar los macrocomplejos, tales como los residuos bacterianos y los PGN de alto peso molecular.

Su actividad es óptima cuando se usa a una concentración final del 0,4 % (vol/vol) en la disolución de polímeros de glucosa al 32 % (peso/vol), ajustada a pH 10 con NaOH, durante un tiempo de tratamiento de 24 h a 50 °C.

Tras el tratamiento, se neutraliza la disolución mediante HCl, y se inactiva la enzima mediante calentamiento a 85 °C durante 10 min.

La segunda etapa consiste en un tratamiento mediante un carbón activo con capacidad de adsorción muy alta, con calidad farmacéutica, con porosidad de "microporos".

La sociedad solicitante recomienda usar un carbón activo de tipo Norit C Extra USP. En efecto, se muestra que el carbón C-extra-USP es eficaz para eliminar los PGN y sus productos de degradación.

Su acción es máxima cuando se añade a la concentración final del 0,5 % (peso/volumen) en la disolución de polímeros de glucosa al 32 % (peso/vol), ajustada a pH 4,5 con HCl. El tratamiento se realiza con agitación durante 1 h a 80 °C. Después del tratamiento, se neutraliza la disolución mediante NaOH, y después se filtra sobre 0,22 µm.

- 5 La tercera etapa consiste en un tratamiento mediante un segundo carbón activo con una porosidad de “mesoporos”. Esta etapa es opcional.

10 En este caso, se prefiere carbón activo de tipo ENO-PC. Esta calidad de carbón activo tiene un espectro de acción grande y permite eliminar, preferiblemente, las moléculas con peso molecular < 100 kDa (por ejemplo, LPS y productos de degradación de los PGN).

En este caso, también se usa a un contenido del 0,5 % a pH 4,5, durante 1 h a una temperatura de 80 °C.

- 15 La cuarta etapa consiste en un tratamiento sobre una resina adsorbente polimérica macroporosa, que presenta una porosidad superior a 100×10^{-10} m.

Se elige la resina Dowex SD2, que presenta un espectro más grande de eliminación de las moléculas contaminantes (distintas de los PGN) que otras resinas de la misma familia.

- 20 Las disoluciones de polímeros de glucosa al 32 % (250 ml) se eluyen sobre una columna que contiene 20 ml de esta resina.

25 La última etapa consiste en una filtración sobre una membrana de ultrafiltración, que presenta un umbral de corte de 5 kDa.

- El tratamiento mediante ultrafiltración tiene como objetivo eliminar las moléculas de pequeño tamaño todavía presentes en las disoluciones de polímeros de glucosa. La sociedad solicitante recomienda usar este tratamiento al final del procedimiento, ya que este tratamiento también tiene un efecto de diálisis que permite eliminar las trazas de sales acumuladas a lo largo de los tratamientos anteriores.

- 30 Se elige inyectar de manera continua la disolución de polímeros de glucosa, sobre un filtro de 5 kDa, a un caudal de 25 ml/min, durante 3 h a temperatura ambiente. Para compensar la pérdida del filtrado, se inyecta el retenido en la disolución de partida, y se ajusta de manera continua al volumen inicial (100 ml) mediante adición de tampón de PBS estéril. Después de 3 h, el volumen de filtrado está comprendido entre 150 y 200 ml, lo cual es superior al volumen inicial de la disolución de polímero de glucosa.

- 40 Tal como se mostrará a modo de ejemplo a continuación, esta combinación de etapas es por sí sola adecuada para proporcionar una protección máxima de los circuitos de producción de polímeros y de glucosa y sus derivados, frente a los contaminantes de origen bacteriano.

- La invención se comprenderá mejor con la ayuda de los siguientes ejemplos, que son meramente ilustrativos y no limitativos.

45 Ejemplos

Ejemplo 1: Establecimiento de las curvas de dosis-respuestas

- 50 Las curvas de dosis-respuestas se realizan con moléculas agonistas convencionales: LPS, PGN, PAM3(cys) (para triclóridrato de PAM₃Cys-Ser-(Lys)₄, un lipopéptido sintético), LTA, zimosano y MDP. Se incuban las líneas Raw-Blue™ y HEK-Blue™ hTLR2, hTLR4, hNOD2 y Null, con concentraciones crecientes de agonistas, y se mide la respuesta celular mediante cuantificación de la actividad de SEAP. Se usa el TNF-α como control positivo de activación de las células:

- 55 - línea Raw-Blue™ (Figura 1): las células responden a las moléculas inflamatorias principales susceptibles de estar presentes en las matrices y derivadas de polímeros de glucosa (PGN, lipopéptidos, LPS, zimosano, LTA); tienen concretamente una fuerte reactividad frente a los PGN, pero no responden a sus productos de despolimerización,
- 60 - línea HEK-Blue™ hTLR2 (Figura 2): fuerte reactividad frente a los PGN y al lipopéptido PAM3(cys); las células responden más débilmente a los otros ligandos de TLR2 (LTA, zimosano) y no muestran ninguna reactividad frente a los LPS y al MDP,
- línea HEK-Blue™ hTLR4 (Figura 3): fuerte reactividad frente a los LPS; las células responden muy débilmente al zimosano y no muestran ninguna reactividad frente a los PGN, lipopéptido, LTA y MDP,
- 65 - línea HEK-Blue™ hNOD2 (Figura 4): fuerte reactividad frente al MDP,

- línea HEK-Blue™ Null2 (Figura 5): control de ausencia de toxicidad celular.

Ejemplo 2: Preparación de las diferentes matrices de polímeros de glucosa

5 Tal como se indicó anteriormente, las matrices son las siguientes:

- 4 polímeros de glucosa, materias primas de la icodextrina (antes del fraccionamiento cromatográfico, según las enseñanzas de la patente EP 667.356), denominados, en este caso, E1565, E3063, E1242 y E5248

10 La preparación de estos polímeros se realiza según las enseñanzas de la solicitud de patente WO 2012/059685.

- un lote de icodextrina contaminada (denominado, en este caso, E209J), y un lote de icodextrina de “control negativo”, es decir, control de ausencia de contaminación en las pruebas celulares (denominado, en este caso, P-11.11). Estos lotes se preparan según las enseñanzas de la patente EP 667.356, detallada en el Ejemplo 1 de la

15 solicitud de patente WO 2010/125315.

Ejemplo 3: Análisis de las respuestas celulares inducidas por las muestras no tratadas

20 El objetivo de estos ensayos es determinar la reactividad proinflamatoria y la naturaleza de los contaminantes presentes en las diferentes matrices.

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

25 Las dosificaciones de las tasas de LPS y de PGN se realizan previamente a las pruebas celulares, usando las dosificaciones de SLP-HS y LAL (datos presentados a continuación):

	P11-11	E1242	E1565	E3063	E5248	E209J
PGN (ng/g) SLP-HS	< 3	21	2320	16185	116	393
30 LPS (UE/g) LAL	< 0,3	2,4	38,4	2,4	9,6	0,6
LPS (UE/g) LAL modificado	< 0,3	1,2	4,8	1,2	0,3	< 0,3

35 Se analizó la presencia de biocontaminantes en las diferentes matrices, con la ayuda de los cinco tipos de células, de manera que se dispone de un resumen de las respuestas inflamatorias frente a determinados contaminantes (Figura 6).

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

40 Los análisis se realizan con:

- línea Raw-Blue™: todos los contaminantes con alta reactividad para los PGN,
- línea HEK-Blue™hTLR2: alta reactividad para los PGN y los lipopéptidos,
- 45 - línea HEK-Blue™hTLR4: alta reactividad para los LPS,
- línea HEK-Blue™hNOD2: MDP y productos de despolimerización de los PGN,
- 50 - línea HEK-Blue™Null2: control de ausencia de toxicidad celular.

Resultado por cada muestra

- 55 - E1242: respuesta inflamatoria de intensidad alta en las células HEK-TLR2, y baja en las células HEK-NOD2, control de una fuerte contaminación con PGN poco degradado.
- E1565: respuesta inflamatoria de intensidad alta en las células HEK-TLR2, media en las células HEK-TLR4, y fuerte en las células HEK-NOD2, control de una fuerte contaminación con PGN degradado y con LPS.
- 60 - E3063: respuesta inflamatoria saturada en las células HEK-TLR2, de intensidad media en las células HEK-TLR4, y de intensidad baja en las células HEK-NOD2, control de una contaminación muy fuerte con PGN poco degradado y de trazas de LPS.
- 65 - E5248: respuesta inflamatoria de intensidad baja en las diferentes líneas, control de una baja contaminación con PGN y con LPS.

- E209J: respuesta inflamatoria de intensidad alta en las células HEK-TLR2, y baja en las células HEK-NOD2, control de una fuerte contaminación con PGN poco degradado.

Ninguna matriz de polímeros de glucosa proporciona respuesta en presencia de las células HEK-Null, lo cual confirma la ausencia de citotoxicidad.

Ejemplo 4: Análisis del efecto de los procedimientos de descontaminación sobre las respuestas celulares inducidas por las muestras

En su solicitud de patente internacional WO 2013/178931, la sociedad solicitante permitió la identificación de los tratamientos más adaptados para cada tipo de contaminantes presentes en las muestras, y la determinación de las condiciones experimentales para su aplicación en matrices de polímeros de glucosa.

Basándose en este estudio anterior, numerosos tratamientos unitarios propuestos son:

- tratamiento sobre carbonos activos,
- ultrafiltración sobre una membrana con un umbral de filtración de 5 kDa,
- paso sobre resinas de adsorción,
- tratamiento mediante preparaciones enzimáticas.

En los experimentos de combinaciones descritos a continuación, la elección y disposición de las etapas se determinó en función:

- o de las condiciones experimentales de tratamiento,
- o de los niveles de contaminación en las muestras y
- o de la naturaleza de las moléculas proinflamatorias.

Uso de Mannaway®

Las enseñanzas de la solicitud de patente internacional WO 2013/178931, mostraron que la preparación enzimática está ligeramente contaminada por trazas de LPS. Además, pueden persistir trazas de enzima después del tratamiento en la disolución de polímeros de glucosa. Por tanto, para eliminar estas contaminaciones exógenas, la sociedad solicitante recomienda poner la etapa de tratamiento enzimático al comienzo del procedimiento en los ensayos de combinaciones.

Uso de los carbonos activos

Los carbonos activos conservados para el presente estudio, son:

- o C-extra-USP, por su eficacia para eliminar los PGN y sus productos de degradación;
- o ENO-PC, por su acción preferible sobre los contaminantes con peso molecular < 100 kDa (por ejemplo, LPS y productos de degradación de los PGN);
- o A-Supra-Eur, por su eficacia para eliminar los complejos de alto peso molecular.

La sociedad solicitante ha elegido usar los carbonos activos solos, o asociados por parejas, en las diferentes combinaciones y, teniendo en cuenta que los tratamientos mediante carbonos se realizan en *lote*, y necesitan etapas de calentamiento, neutralización y filtración, se realizan justo después del tratamiento enzimático, pero antes de los otros tratamientos.

Uso de las resinas

Las resinas conservadas son:

- o Macronet MN-150, por su eficacia para retener las moléculas de bajo peso molecular (por ejemplo, MDP y productos de degradación de los PGN);
- o Dowex SD2, por su gran espectro de eliminación de los contaminantes, con la excepción de los PGN.

Uso de la separación membranaria

El tratamiento mediante ultrafiltración de 5 kDa tiene como objetivo eliminar las moléculas de pequeño tamaño todavía presentes en las disoluciones de polímeros de glucosa. Además, este procedimiento tiene un efecto de diálisis y permite eliminar las trazas de sales acumuladas a lo largo de los tratamientos anteriores.

Por tanto, esta etapa se pone sistemáticamente al final del procedimiento.

Después de cada etapa, se realizan extracciones en condición estéril y se usan en las pruebas celulares, con el fin de dosificar la carga inflamatoria global (respuesta de las células Raw-Blue™) y las cantidades de biocontaminantes (respuestas de HEK-Blue™). Las respuestas celulares obtenidas después de cada etapa, se comparan con la respuesta inducida por la matriz de partida, de manera que se estima la eficacia de los procedimientos de descontaminación. Se expresan los resultados como actividad con respecto a la respuesta máxima de las células. En todos los ensayos, se realiza un control de ausencia de contaminación, con una disolución de icodextrina P-11.11.

Ejemplo 5: Análisis comparativo de diferentes combinaciones de las etapas unitarias de tratamiento

Un gran número de combinaciones posibles pueden deducirse de manera implícita, a partir de las enseñanzas de la solicitud de patente WO 2013/178931.

Los resultados obtenidos con 3 de los procedimientos que pueden concebirse, son los siguientes:

- Procedimiento 1: matriz E1242; tratamiento mediante carbonos activos C-Extra USP + ENO-PC; paso sobre resina Macronet MN-15; ultrafiltración sobre 5 kDa

Los resultados de las pruebas celulares se presentan en la Figura 7.

La matriz E1242 induce una respuesta inflamatoria media en las células Raw-Blue, que está principalmente asociada a una fuerte contaminación con PGN (respuesta TLR2).

También contiene trazas de LPS y de productos de degradación de los PGN, teniendo en cuenta que las respuestas de TLR4 y NOD2 están próximas al ruido de fondo.

El procedimiento de descontaminación reduce eficazmente las respuestas inflamatorias.

No obstante, la respuesta de las células Raw-Blue sigue siendo ligeramente superior al control de ausencia de contaminación (P-11.11), lo que indica que todavía están presentes trazas de contaminantes.

Este resultado se debe a la presencia de PGN residuales después de la descontaminación. En efecto, la respuesta TLR2 se reduce fuertemente después del tratamiento mediante los carbonos, pero sigue siendo superior al control negativo.

Las demás etapas no tienen ningún efecto sobre la respuesta de TLR2, que ya no vuelve a evolucionar hasta el final del procedimiento. Por el contrario, la respuesta de TLR4 ya no puede detectarse a partir de la 1ª etapa de tratamiento, prueba de que se han eliminado los LPS. En cuanto a la respuesta de NOD2, se suprime después de la etapa de ultrafiltración.

Conclusión

Aunque la carga de compuestos inflamatorios se reduce de manera eficaz, el Procedimiento 1 no es suficiente para garantizar una descontaminación completa de una matriz fuertemente cargada con PGN.

- Procedimiento 2: matriz E209J; tratamiento mediante carbonos activos C-Extra USP + ENO-PC; paso sobre resina Dowex SD2; ultrafiltración sobre 5 kDa

Los resultados de las pruebas celulares se presentan en la Figura 8.

Para este procedimiento, se sustituyó la resina por la Dowex SD2, que presenta un espectro de retención más grande. Los ensayos se realizaron con la matriz E209J, que presenta un perfil de contaminación similar a E1242.

En este caso, la respuesta de las células Raw-Blue es idéntica al control negativo, prueba de que la descontaminación ha sido eficaz.

No obstante, la respuesta de TLR2 todavía es superior al control de ausencia de contaminación, lo cual indica que todavía están presentes trazas de PGN.

La diferencia de respuestas está ciertamente asociada al hecho de que las células HEK-TLR2 tienen un umbral de detección más bajo que las células Raws-Blue para los PGN.

La respuesta de NOD2 se reduce después del paso sobre SD2, y se suprime después de la ultrafiltración, lo cual sugiere que esta resina tiene al menos una acción complementaria para eliminar los productos de degradaciones de los PGN.

Conclusión

Estos datos indican que el cambio de resina no ha mejorado la eficacia del procedimiento para eliminar todos los PGN.

- Procedimiento 3: matriz E5248; tratamiento mediante Mannaway® y después mediante carbonos C-Extra USP + A-Supra-Eur; paso sobre resina Dowex SD2; ultrafiltración sobre 5 kDa

Los resultados de las pruebas celulares se presentan en la Figura 9.

En esta última combinación, se asoció el carbón A-Supra-Eur al C-Extra USP, como sustitución del ENO-PC.

A diferencia de este último, el carbón A-Supra-Eur elimina, preferiblemente, las moléculas de alto peso molecular.

Esta combinación debería ser eficaz para descontaminar muestras cargadas con macrocomplejos agregados de tipo PGN o β -glucanos.

Los ensayos se realizaron con la matriz E5248, que induce una respuesta inflamatoria de baja intensidad en las diferentes líneas, mientras que las dosificaciones SLP-HS y LAL sugieren la presencia de una fuerte contaminación con PGN y/o con β -glucanos.

Esta diferencia puede explicarse por la alta masa de las moléculas inflamatorias, lo cual disminuirá su solubilidad y, por consiguiente, su accesibilidad para inducir una respuesta en las pruebas celulares.

Después de la 1ª etapa del procedimiento, se observa un fuerte aumento de las respuestas celulares en las diferentes líneas.

Este resultado confirma que el tratamiento enzimático mediante Mannaway® es eficaz para desagregar complejos o residuos bacterianos, liberando, de ese modo, moléculas agonistas de TLR2, TLR4 y NOD2.

Después del tratamiento con carbonos, se reducen netamente las respuestas de las células Raws y HEK-TLR2, pero permanecen por encima del control negativo.

Asimismo, las respuestas de TLR4 y NOD2 siguen siendo consecuentes, y hace falta esperar al paso sobre la resina y a la etapa final de ultrafiltración, para obtener una señal idéntica al control de ausencia de contaminación en los diferentes tipos de células.

Conclusión

Estos resultados indican que el carbón A-Supra-Eur no ha aportado ningún beneficio notable en el procedimiento de descontaminación.

Conclusión final

Aunque totalmente concebibles, ninguno de estos procedimientos de descontaminación proporciona un resultado completamente satisfactorio.

Ejemplo 6: Presentación del procedimiento optimizado

Se elige realizar en la matriz E3063 la sucesión de las siguientes etapas:

- tratamiento mediante Mannaway®, después
- mediante carbonos activos C-Extra USP + ENO-PC, después
- paso sobre resina Dowex SD2, y finalmente
- ultrafiltración sobre 5 kDa.

Los resultados de las pruebas celulares se presentan en la Figura 10.

Para aumentar la eficacia del procedimiento dirigido a eliminar los PGN, se introduce una etapa de tratamiento enzimático mediante Mannaway®, aguas arriba de las otras etapas.

5 Para estos ensayos, se usó la matriz E3063, que está muy fuertemente cargada con PGN.

Tras las diferentes etapas del procedimiento, la respuesta de las células Raw-Blue es idéntica al control negativo, prueba de que la descontaminación ha sido eficaz.

10 Además, la asociación de los tratamientos con enzima + carbonos está particularmente adaptada para la eliminación de los PGN, ya que la respuesta de TLR2 pasa de una señal saturada antes del tratamiento, a una señal idéntica al control de ausencia de contaminación.

15 Finalmente, las demás etapas son eficaces para eliminar las trazas de LPS (respuesta de TLR4) y de agonistas de NOD2.

Con el fin de demostrar que esta combinación es muy eficaz, se retiró el carbón ENO-PC para verificar si su uso aporta realmente un beneficio al procedimiento de descontaminación.

20 Los resultados de las pruebas celulares se presentan en la Figura 11.

Los ensayos se realizaron sobre otra matriz, la matriz E1565, que está contaminada mediante diferentes agonistas de TLR2, TLR4 y NOD2.

25 Al final del procedimiento, la respuesta de las células Raw-Blue se reduce netamente, pero sigue siendo ligeramente superior al control de ausencia de contaminación. Esta respuesta muy baja no está asociada a la presencia de PGN residual, sino más bien a trazas de LPS y de agonistas de NOD2, y a un posible efecto sinérgico entre las dos familias de moléculas.

30 El carbón ENO-PC posee un gran espectro de retención para moléculas con peso molecular < 100 kDa (LPS y productos de degradación de los PGN).

Conclusión

35 Se constata que su ausencia redujo la eficacia del procedimiento de descontaminación, concretamente si la matriz está fuertemente contaminada mediante estas dos familias de moléculas inflamatorias.

40 En conjunto, los resultados obtenidos en este estudio muestran que la combinación de varias etapas de descontaminación cuidadosamente seleccionadas y ordenadas, resulta ser eficaz para eliminar las moléculas inflamatorias susceptibles de estar presentes en disoluciones de polímeros de glucosa.

La combinación comprende las siguientes etapas:

- 45 - tratamiento mediante una preparación enzimática con propiedades detergentes y de clarificación, por ejemplo, Mannaway®,
- tratamiento mediante un carbón activo con porosidad equivalente a C-Extra-USP,
- 50 - opcionalmente, tratamiento mediante un segundo carbón activo con porosidad equivalente a ENO-PC, para las matrices cargadas con LPS y/o PGN degradados,
- paso sobre una resina de adsorción de tipo Dowex-SD2,
- 55 - ultrafiltración continua sobre 5 kDa.

Las etapas seleccionadas permiten seleccionar como diana las diferentes familias de contaminantes, y proponer productos libres de reactividad inflamatoria.

Figuras

60 **Figura 1:** Respuestas de las células Raw-Blue™ frente a los agonistas convencionales.

Figura 2: Respuestas de las células HEK-Blue™TLR2 frente a los agonistas convencionales.

65 **Figura 3:** Respuestas de las células HEK-Blue™TLR4 frente a los agonistas convencionales.

Figura 4: Respuestas de las células HEK-Blue™NOD2 frente a los agonistas convencionales.

Figura 5: Respuestas de las células HEK-Blue™Null frente a los agonistas convencionales.

5 **Figura 6:** Respuestas celulares inducidas por las matrices de polímeros de glucosa.

Figura 7: Respuestas celulares inducidas por la matriz E1242, después de la descontaminación según el Procedimiento 1.

10 **Figura 8:** Respuestas celulares inducidas por la matriz E209J, después de la descontaminación según el Procedimiento 2.

Figura 9: Respuestas celulares inducidas por la matriz E5248, después de la descontaminación según el Procedimiento 5.

15 **Figura 10:** Respuestas celulares inducidas por la matriz E3063, después de la descontaminación según el Procedimiento 3.

20 **Figura 11:** Respuestas celulares inducidas por la matriz E1565, después de la descontaminación según el Procedimiento 4.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de descontaminación de polímeros de glucosa o sus hidrolizados de sus moléculas proinflamatorias, **caracterizado por que** comprende las siguientes etapas:
5
a) proporcionar polímeros de glucosa o sus hidrolizados;
b) opcionalmente, detectar o dosificar las moléculas proinflamatorias en los polímeros de glucosa o sus hidrolizados, proporcionados en la etapa a);
10 c) realizar las siguientes etapas de purificación, en el siguiente orden:
i. tratamiento mediante una preparación enzimática con actividad de mananasa,
ii. tratamiento mediante un carbón activo con capacidad de adsorción muy alta, con calidad farmacéutica, con porosidad de “microporos”,
15 iii. opcionalmente, tratamiento mediante un segundo carbón activo con una porosidad de “mesoporos”,
iv. paso sobre una resina adsorbente polimérica macroporosa, que presenta una porosidad superior a 100×10^{-10} m, y
v. ultrafiltración continua sobre 5 kDa,
20 en donde los polímeros de glucosa se seleccionan de icodextrina y las maltodextrinas.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado por que** el procedimiento comprende las 5 etapas i a v.
3. Procedimiento según las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado por que** las maltodextrinas son maltodextrinas ramificadas o no, y los hidrolizados de polímeros de glucosa son un producto de hidrólisis total, tal como el monohidrato de dextrosa.
25

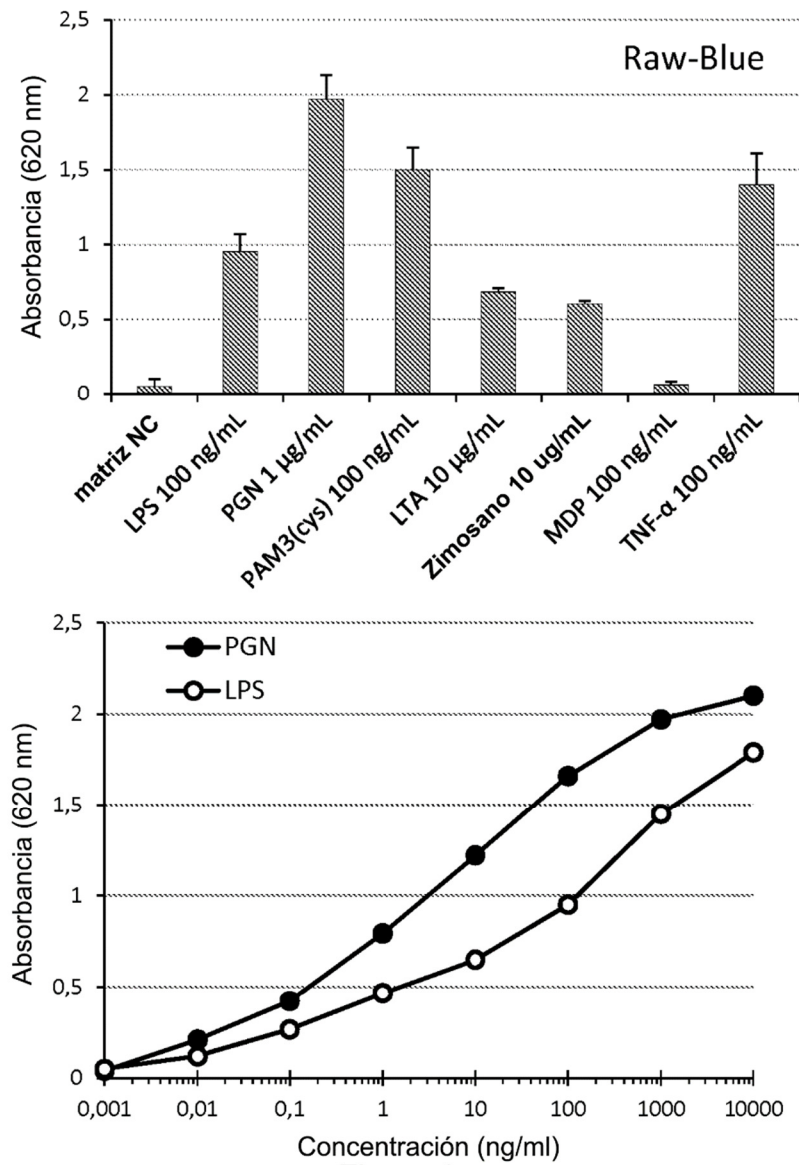


Figura 1

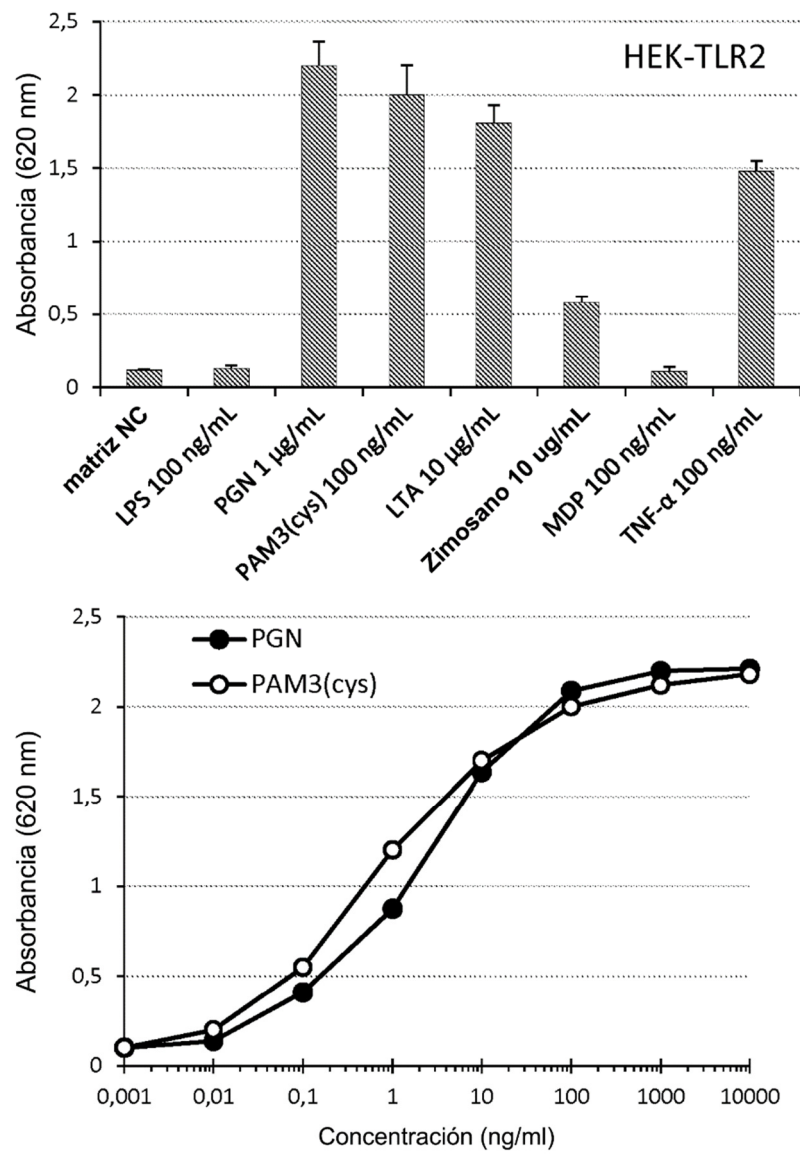


Figura 2

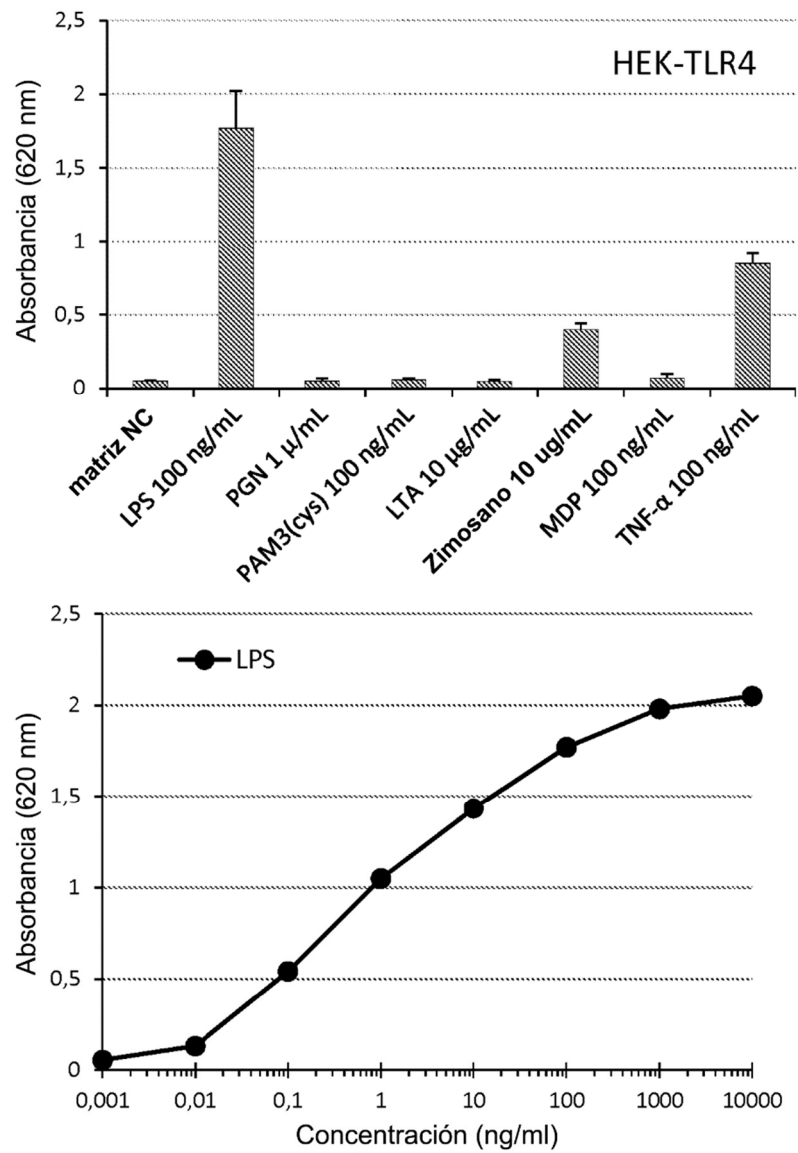


Figura 3

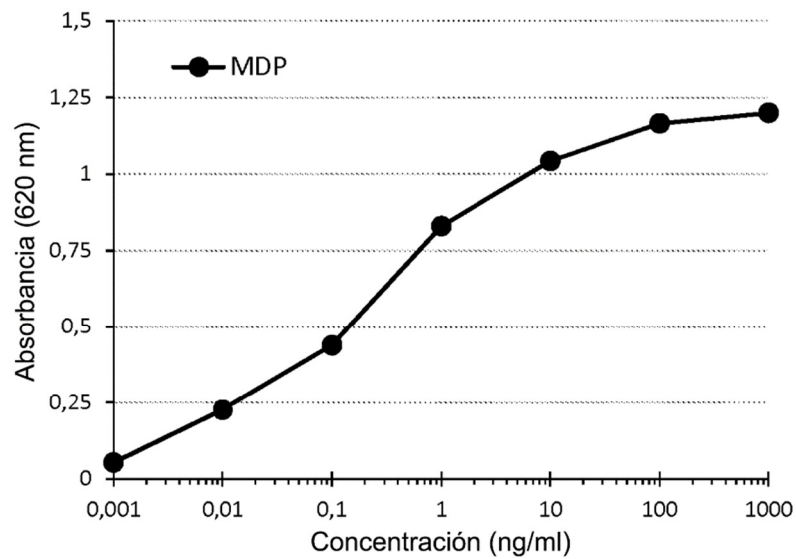
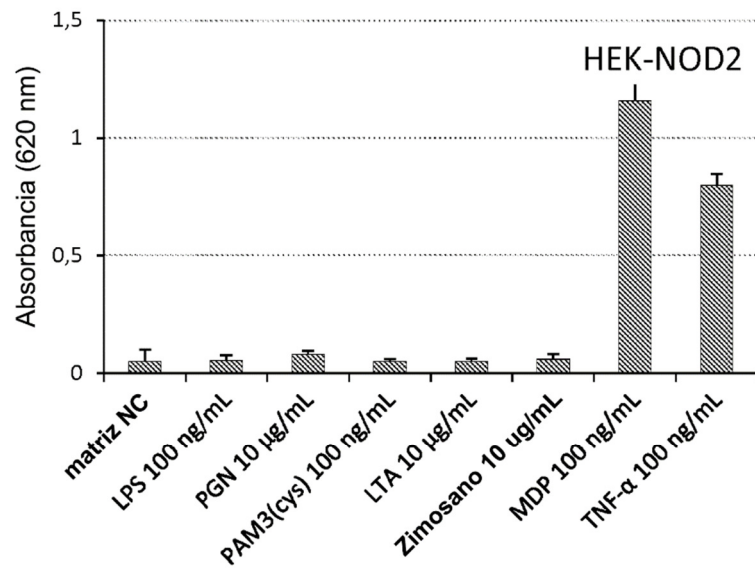


Figura 4

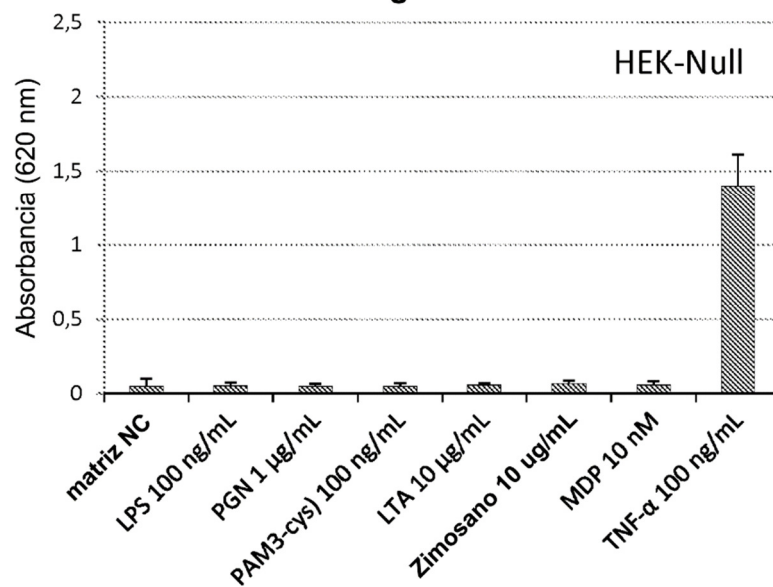


Figura 5

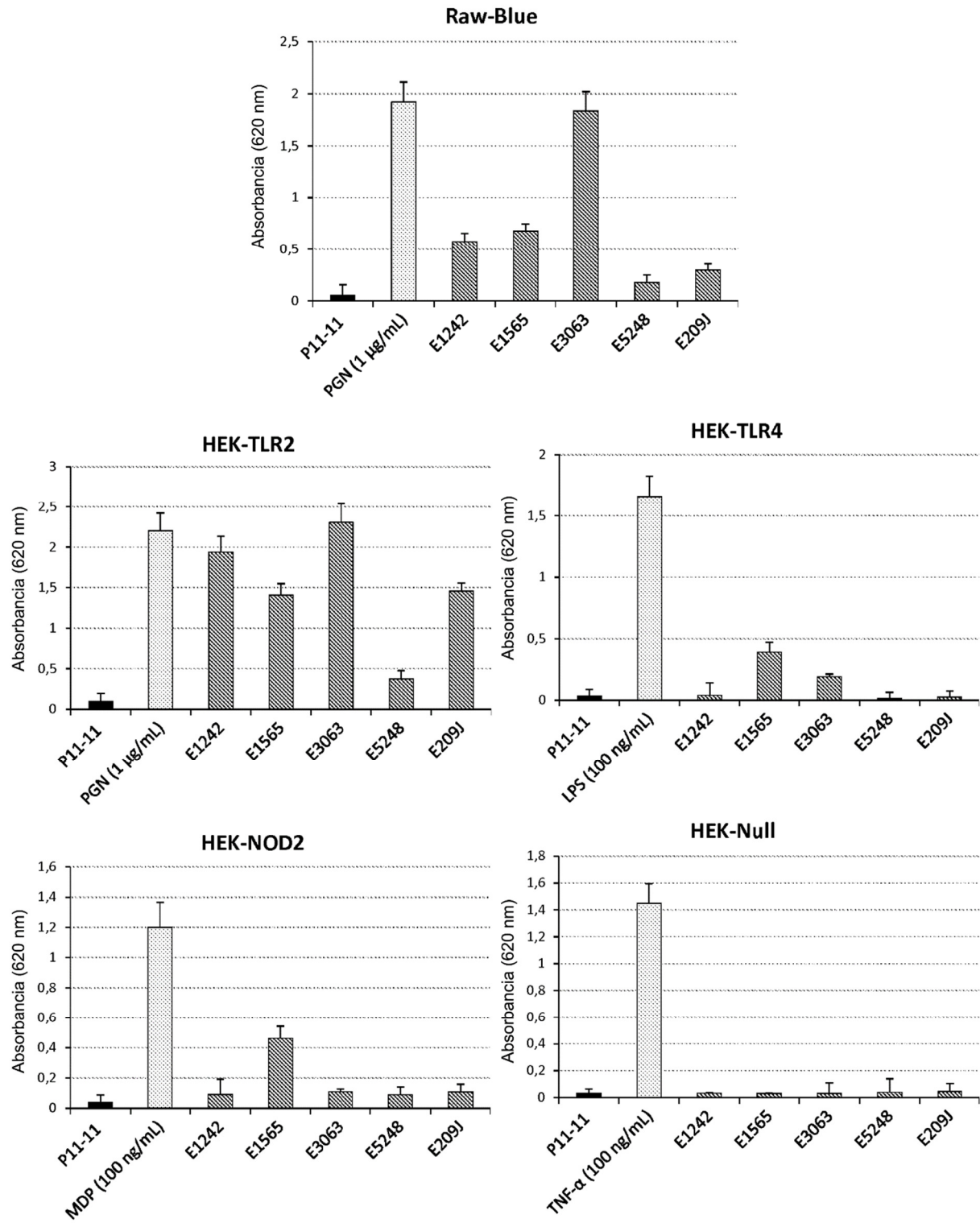
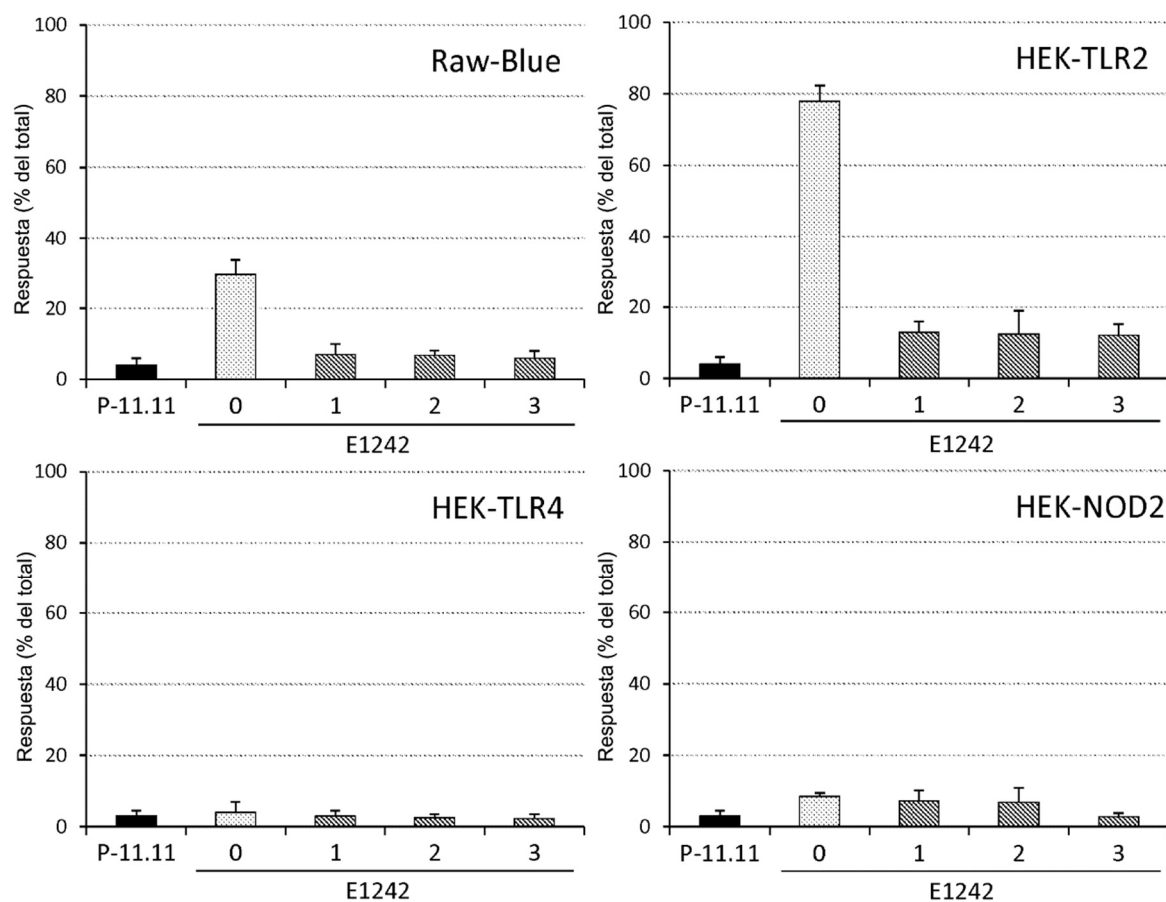


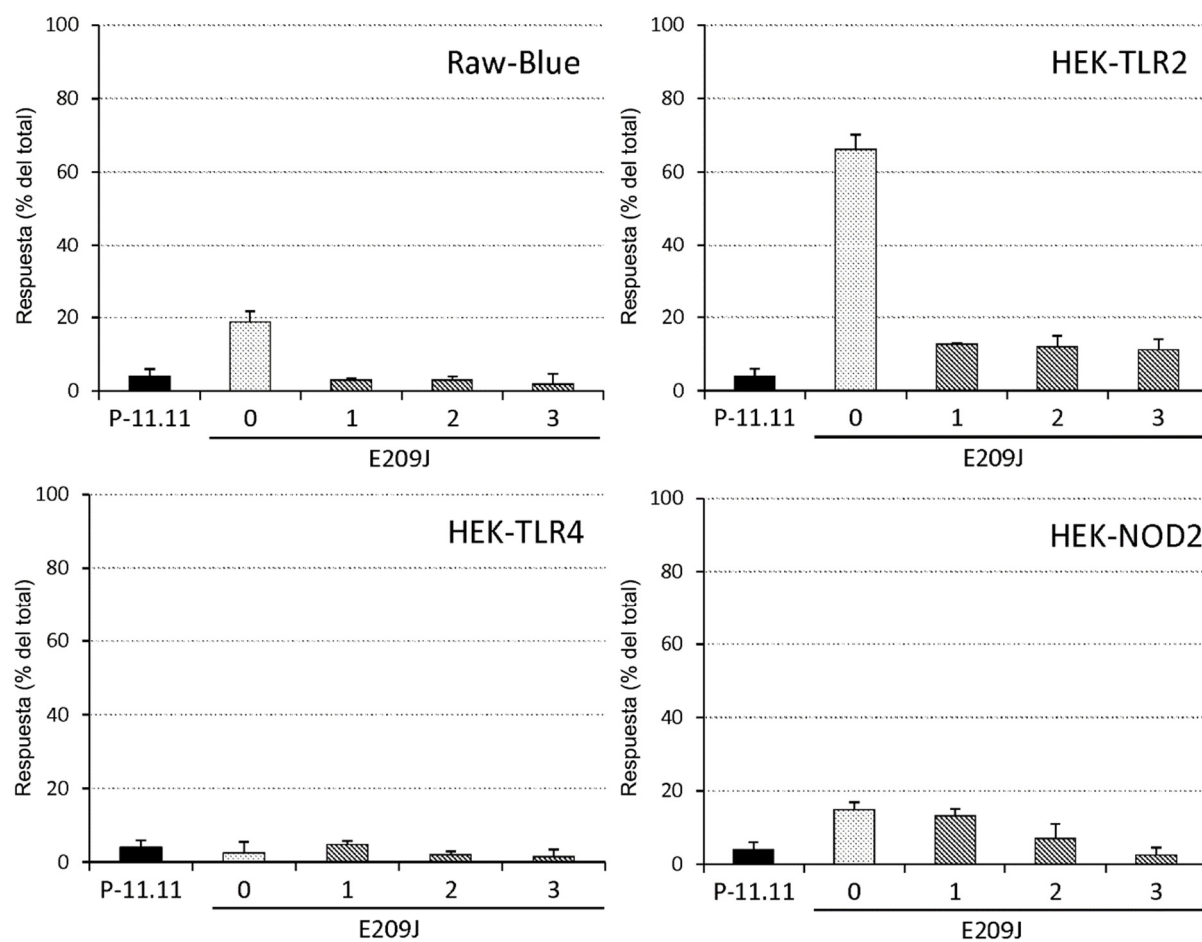
Figura 6



Tratamientos:

- 0: no tratado
- 1: carbonos C-Extra USP + ENO-PC: al 0,5 % (peso/vol), pH 4,5; 1 h a 80 °C
- 2: 1 + resina Macronet MN-150.
- 3: 1 + 2 + ultrafiltración a 5 kDa: circuito cerrado durante 3 h.

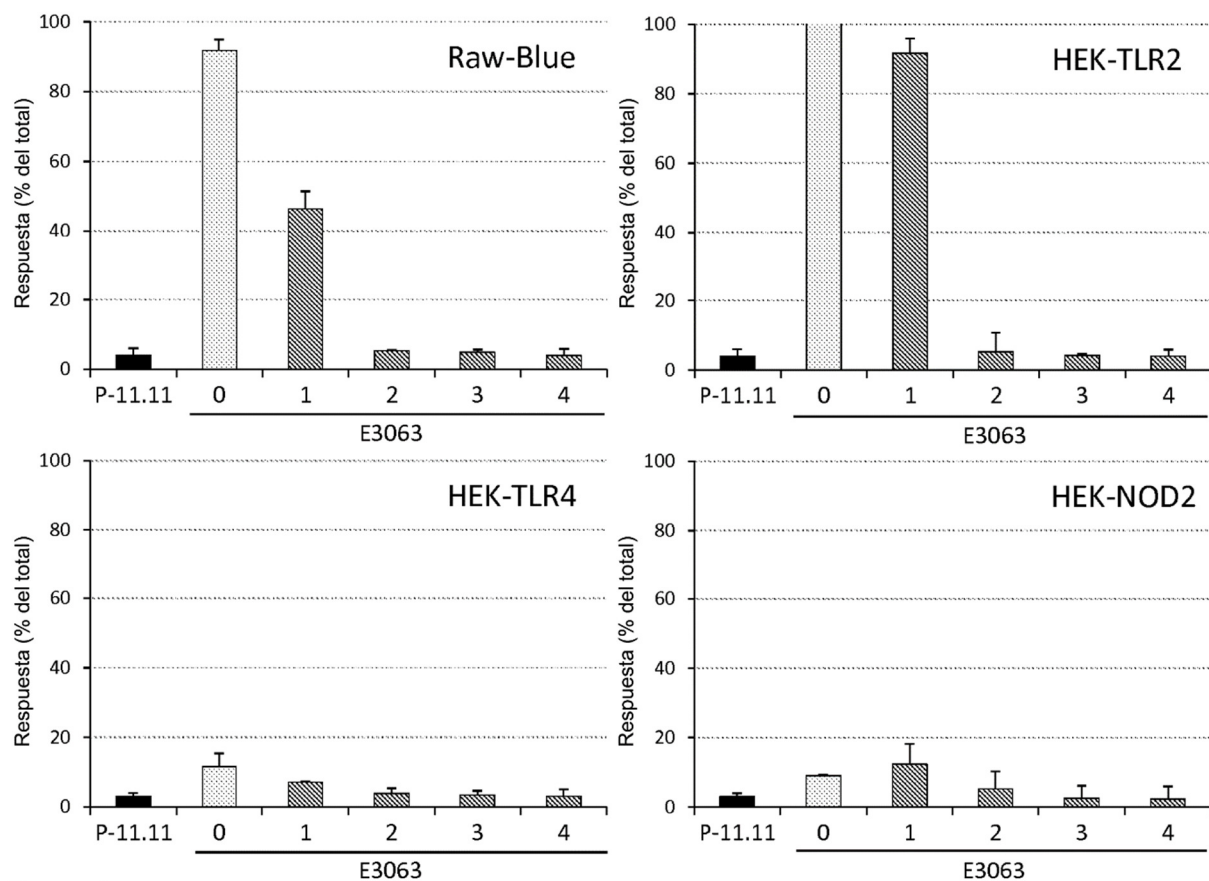
Figura 7



Tratamientos:

- 0: no tratado
- 1: carbonos C-Extra USP + ENO-PC: al 0,5 % (peso/vol), pH 4,5; 1 h a 80 °C
- 2: 1 + resina Dowex SD2: paso 11
- 3: 1 + 2 + ultrafiltración a 5 kDa: circuito cerrado durante 3 h.

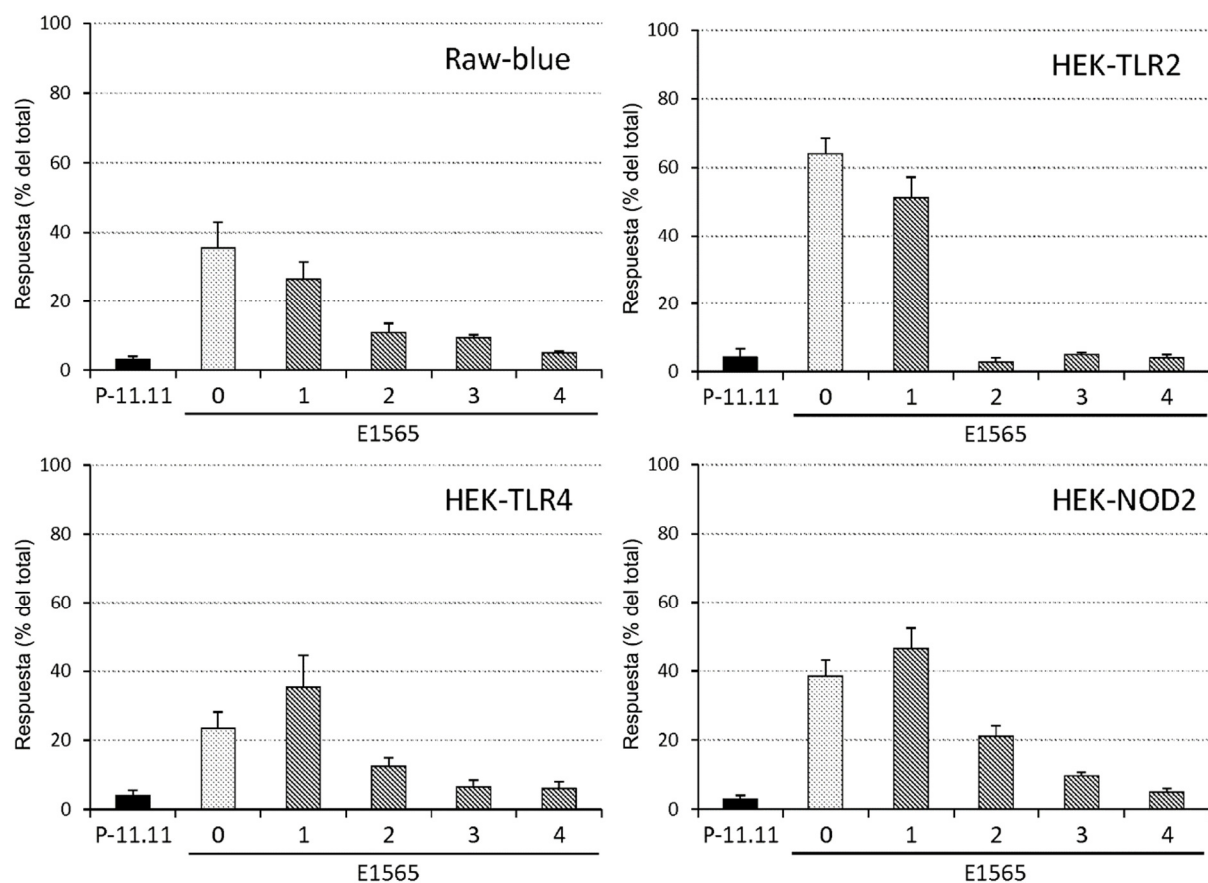
Figura 8



Tratamientos:

- 0: no tratado
- 1: enzima Mannaway(R): al 0,4 % (vol/vol); pH 10; 24 h a 50 °C
- 2: carbonos C-Extra USP + ENO-PC: al 0,5 % (peso/vol), pH 4,5; 1 h a 80 °C.
- 3: 1 + 2 + resina Dowex SC2: paso 11
- 4: 1 + 2 + ultrafiltración a 5 kDa: circuito cerrado durante 3 h.

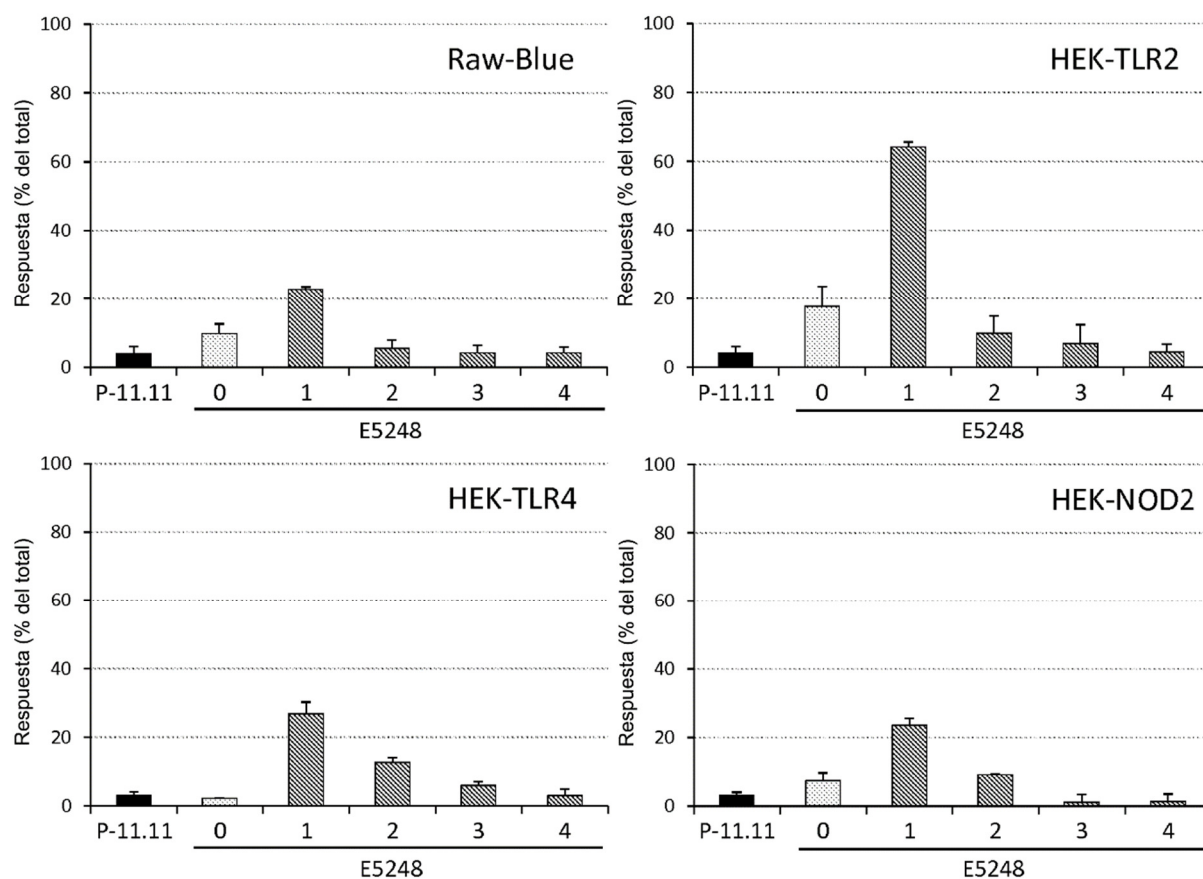
Figura 9



Tratamientos:

- 0: no tratado
- 1: enzima Mannaway(R): al 0,4 % (vol/vol); pH 10; 24 h a 50 °C
- 2: carbonos C-Extra USP + ENO-PC: al 0,5 % (peso/vol), pH 4,5; 1 h a 80 °C.
- 3: 1 + 2 + resina Dowex SC2: paso 11
- 4: 1 + 2 + ultrafiltración a 5 kDa: circuito cerrado durante 3 h.

Figura 10



Tratamientos:

- 0: no tratado
- 1: enzima Mannaway(R): al 0,4 % (vol/vol); pH 10; 24 h a 50 °C.
- 2: carbonos C-Extra USP + ENO-PC: al 0,5 % (peso/vol), pH 4,5; 1 h a 80 °C.
- 3: 1 + 2 + resina Dowex SC2: paso 11
- 4: 1 + 2 + ultrafiltración a 5 kDa: circuito cerrado durante 3 h.

Figura 11