



(51) МПК

C08B 37/00 (2006.01)*C12P 19/00* (2006.01)*C07H 5/06* (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ(21)(22) Заявка: **2009101051/10**, **15.06.2007**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
15.06.2007

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
15.06.2006 US 60/813,971(43) Дата публикации заявки: **20.07.2010** Бюл. № 20(45) Опубликовано: **20.08.2013** Бюл. № 23

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **HUNTER K.V. ET AL. Preparation of microparticulate beta-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* for use in immune potentiation. Lett Appl Microbiol. 2002, v.35, №4, p.267-271. US 2004082539 A1, 28.04.2004. US 6143883 A, 07.11.2000. BACON J.S. ET AL. The glucan components of the cell wall of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) considered in (см. прод.)**

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: **15.01.2009**(86) Заявка РСТ:
US 2007/014055 (15.06.2007)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2007/146416 (21.12.2007)

Адрес для переписки:

**129010, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной, рег. № 517**

(72) Автор(ы):

**МЭДЖИ Эндрю (US),
РОЛКЕ Джеймс (US),
ЯНГ Рендер (US)**

(73) Патентообладатель(и):

БАЙОТЕРА, ИНК. (US)**(54) КОМПОЗИЦИИ ГЛЮКАНА**

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к области биохимии. Предложена композиция, обладающая иммуностимулирующими свойствами, включающая немодифицированный, растворимый β -глюкан со средним молекулярным весом от приблизительно 120000 Да до

приблизительно 205000 Да. Композиция также содержит растворимый β -глюкан с молекулярным весом более чем 380000 Да в количестве менее чем или равным 10% и β -глюкан с молекулярным весом менее чем 25000 Да в количестве менее чем или равным 17%. При этом немодифицированный растворимый β -глюкан может применяться в единственных

дозах до приблизительно 6 мг/кг. Также предложен способ получения растворимого (3-глюкана. Способ включает приложение давления 35 фунт/кв. дюйм (24607,4 кг/м²) к суспензии порошкового β-глюкана и кислоты. Затем суспензию нагревают до 135°C в течение времени, которое достаточно для образования растворимого β-глюкана. Далее предложены композиции (варианты), обладающие

иммуностимулирующими свойствами, включающие фармацевтически эффективное количество немодифицированного растворимого β-глюкана, полученного указанным способом. Изобретение позволяет получать улучшенные композиции β-глюкана, который можно вводить в более высокой концентрации, чем максимальная доза при меньшем количестве нежелательных реакций. 5 н. и 23 з.п. ф-лы, 4 табл., 2 ил.

(56) (продолжение):

relation to its ultrastructure// Biochem J. 1969 Sep, v.114, №3, p.557-567. RU 2233599 C2, 10.08.2003.

RU 2 4 9 0 2 7 9 C 2

RU 2 4 9 0 2 7 9 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C08B 37/00 (2006.01)*C12P 19/00* (2006.01)*C07H 5/06* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2009101051/10, 15.06.2007**(24) Effective date for property rights:
15.06.2007

Priority:

(30) Convention priority:
15.06.2006 US 60/813,971(43) Application published: **20.07.2010 Bull. 20**(45) Date of publication: **20.08.2013 Bull. 23**(85) Commencement of national phase: **15.01.2009**(86) PCT application:
US 2007/014055 (15.06.2007)(87) PCT publication:
WO 2007/146416 (21.12.2007)

Mail address:

**129010, Moskva, ul. B.Spaskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. E.E.Nazinoj, reg. № 517**

(72) Inventor(s):

**MEhDZhI Ehndrju (US),
ROLKE Dzhejms (US),
JaNG Render (US)**

(73) Proprietor(s):

BAJOTERA, INK. (US)**(54) GLUCAN COMPOSITIONS**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: group of inventions relates to biochemistry. Disclosed is a composition, having immune-stimulating properties, which contains unmodified, soluble β -glucan with average molecular weight from about 120000 Da to about 205000 Da. The composition also contains soluble β -glucan with molecular weight greater than 380000 Da in amount of less than or equal to 10% and β -glucan with molecular weight of less than 25000 Da in amount of less than or equal to 17%. The unmodified, soluble β -glucan can be used in single doses of up to about 6 mg/kg. Also disclosed is a method of producing

soluble β -glucan. The method involves applying pressure of up to 35 lb/in² (24607.4 kg/m²) to a suspension of powdered β -glucan and an acid. The suspension is then heated to 135°C for a period of time which is sufficient to form soluble β -glucan. Also disclosed are compositions (versions), having immune-stimulating properties, which contain a pharmaceutically effective amount of unmodified, soluble β -glucan obtained using said method.

EFFECT: invention enables to obtain improved β -glucan compositions, which can be administered in a higher concentration than the maximum dose with fewer undesirable reactions.

28 cl, 4 tbl, 2 dwg

Предшествующий уровень техники

Настоящая заявка испрашивает приоритет по заявке США №60/813,971, озаглавленной КОМПОЗИЦИИ ГЛЮКАНА, поданной 15 июня 2006.

Настоящее изобретение относится к композициям, которые содержат β -глюкан. В частности, настоящее изобретение относится к растворимым композициям β -глюкана и их применению в мобилизации стволовых клеток.

Глюканы традиционно описывают как полимеры глюкозы, и они происходят из дрожжей, бактерий, грибов и растений, таких как овес и ячмень. Известно, что глюканы, содержащие $\beta(1-3)$ -глюкопиранозный скелет, обладают биологической активностью, в частности, было показано, что они модулируют иммунную систему и, совсем недавно было показано, что они индуцируют мобилизацию гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников (HSPQ).

Лечение разных опухолей все больше и больше включает циторедуктивную терапию, включая высокие дозы химиотерапии или облучения. Эти методы лечения уменьшают число лейкоцитов у пациента, подавляют гемопоэтическую активность костного мозга и увеличивают риск инфекции и/или кровотечения. В результате пациенты, которые проходят циторедуктивную терапию, должны также получать терапию по восстановлению функции костного мозга (гемопоз).

Несмотря на совершенствования в мобилизации стволовых клеток и методиках, до 20-25% пациентов проявляют недостаточную мобилизацию и не в состоянии возобновить ауотрансплантацию. PGG β -глюкан является растворимым полисахаридом, который получают из дрожжей, и, как было показано ранее, он вызывает мобилизацию гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников (HSPC).

Сущность настоящего изобретения

В настоящем изобретении для получения порошкового β -глюкана, по существу не содержащего загрязняющие летучие органические соединения (VOCs), культивируют дрожжи, собирают их и очищают. Порошковый β -глюкан получают посредством обработки дрожжевых клеток или их фрагментов рядом щелочных, поверхностно-активных веществ и кислых экстрагирующих веществ, которые удаляют примеси из клеток-хозяев.

Порошковый β -глюкан, полученный вышеуказанным способом или способами предшествующего уровня техники, растворяют в кислом растворе при повышенной температуре и давлении. Получаемый растворимый β -глюкан затем обесцвечивают и очищают, используя хроматографию гидрофобного взаимодействия (HIQ), после чего гель-проникающую хроматографию (GPC). В качестве фармацевтического средства, растворимый β -глюкан можно применять в более высоких дозах не увеличивая, или фактически уменьшая, наблюдаемые побочные эффекты или нежелательные осложнения.

Краткое описание чертежей

Фиг.1 является схематическим представлением способа получения порошкового β -глюкана.

Фиг.2 является схематическим представлением способа получения растворимого β -глюкана.

Подробное описание настоящего изобретения

Порошковый β -глюкан

Фиг.1 является кратким обзором способа 10, который включает стадии 12-22, для получения нерастворимого, или порошкового, β -глюкана из дрожжей. На стадии 12,

культуру дрожжей выращивают, как правило, в колбе с перемешиванием или ферментере. Штамм дрожжей, который используют по настоящему изобретению, может быть любым штаммом, примеры которых включают *Saccharomyces* (*S.*) *cerevisiae*, *S. delbrueckii*, *S. rosei*, *S. microellipsoides*, *S. cdrlsbergensis*, *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. ami*, *H. henricii*, *H. americana*, *H. canadiensis*, *H. capsulata*, *H. polymorpha*, *Pichia* (*P.*) *kluyveri*, *P. pastoris*, *P. polymorpha*, *P. rhodanensis*, *P. ohmeri*, *Torulopsis* (*T.*) *bovina* and *T. glabrata*.

В одном варианте осуществления масштабного получения дрожжевую культуру запускают и поэтапно наращивают от культуры во вращающейся колбе до масштабов 250 л ферментера. Дрожжи выращивают в питательной среде с сульфатом аммония и глюкозой, обогащенной витаминами, такими как фолиевая кислота, гексагидрогексаоксibenзол, никотиновая кислота, пантотеновая кислота (соль кальция и натрия), пиридоксин HCl и тимин HCl, и микроэлементы в составе соединений, таких как гексагидрат хлорида железа; хлорид цинка; дигидрат хлорида кальция; молибденовая кислота; сульфат меди, пентагидрат и борная кислота.

Противовспенивающее вещество, такое как Antifoam 204, также может быть добавлено в концентрации приблизительно 0,02%.

Культуру продуцента поддерживали в условиях с ограничением глюкозы в культуре с подпиткой. Во время наращивания периодически забирали образцы для измерения оптической плотности культуры перед инокуляцией в ферментер для продукции. Во время продуцирующей ферментации также периодически забирали образцы для измерения оптической плотности культуры. В конце ферментации образцы забирали для измерения оптической плотности, сухого веса и микробной чистоты.

При желании ферментацию можно остановить путем повышения pH культуры до по меньшей мере 11,5 или путем центрифугирования культуры для отделения клеток от среды для выращивания. Кроме того, в зависимости от размера и формы очищенного требуемого β -глюкана могут быть проведены стадии по разрушению или фрагментированию дрожжевых клеток. Любые известные химические, ферментативные или механические способы или любая их комбинация могут быть использованы для выполнения разрушения или фрагментации дрожжевых клеток.

На стадии 14 получают дрожжевые клетки, содержащие β -глюкан. Получая большое количество β -глюкана, дрожжевые клетки, как правило, собирают, используя непрерывное центрифугирование.

Стадия 16 представляет начальную экстракцию дрожжевых клеток, используя один или несколько из щелочного раствора, поверхностно-активного вещества или их комбинацию. Подходящим щелочным раствором является, например, 0,1M-5M NaOH. Подходящие поверхностно-активные вещества включают, например, октитоглюкозид, Lubrol PX, Triton X-100, лаурилсульфат натрия (SDS), Nonidet P-40, Tween 20 и т.п., ионные (анионный, катионный, двусторонний) поверхностно-активные вещества (например, алкилсульфонаты, хлориды бензалкония, и т.п.) и неионные поверхностно-активные вещества (например, полиоксиэтилен гидрированные касторовые масла, сложные эфиры полиэтиленоксидсорбита и жирной кислоты, сложные эфиры полиэтиленоксидсорбитана и жирной кислоты, сложные эфиры полиэтиленоксидглицерина и жирной кислоты, сложные эфиры полиэтиленгликоля и жирной кислоты, полиэтиленоксидалкилфениловые эфиры, и

т.п.) также могут быть использованы. Концентрация поверхностно-активного вещества будет изменяться и зависеть, частично, в зависимости от того, какое поверхностно-активное вещество используется. Материал дрожжевой клетки может быть экстрагирован один или несколько раз.

Экстракции обычно выполняются при температурах от приблизительно 70°C до приблизительно 90°C. В зависимости от температуры, используемых реактивов и их концентраций, продолжительность каждой экстракции составляет от приблизительно 30 минут до приблизительно 3 часов.

После каждой экстракции отбирают твердую фазу, содержащую β-глюкан, используя центрифугирование или непрерывное центрифугирование и повторно растворяют для последующей стадии. Растворимые загрязняющие примеси удаляются вместе с жидкой фазой во время центрифугирования, в то время как β-глюкан остается в нерастворимом материале клеточной стенки.

В одном варианте осуществления выполняют четыре экстракции. При первой экстракции собранные дрожжевые клетки смешивают с 1,0 М NaOH и нагревают до 90°C в течение приблизительно 60 минут. Второй экстракцией является экстракция щелочью/поверхностно-активным веществом, причем нерастворимый материал повторно суспендируют в 1,0 М NaOH и приблизительно от 0,5% до 0,6% Triton X-100 и нагревают до 90°C в течение приблизительно 120 минут. Третья экстракция подобна второй экстракции за исключением того, что концентрация Triton X-100 составляет приблизительно 0,05%, и продолжительность сокращена до приблизительно 60 минут. При четвертой экстракции нерастворимый материал повторно суспендируют в приблизительно 0,5% Triton X-100 и нагревают до 75°C в течение приблизительно 60 минут.

Щелочные экстракции и/или экстракции поверхностно-активным веществом делают растворимыми и удаляют некоторые наружные материалы дрожжевой клетки. Щелочной раствор гидролизует белки, нуклеиновые кислоты, маннаны и липиды. Поверхностно-активное вещество способствует удалению липидов и других гидрофобных примесей, что предоставляет дополнительное преимущество, приводя к улучшенному продукту β-глюкана.

Предыдущие процедуры очистки приводили к получению β-глюкана, содержащего небольшое количество летучих органических соединений (VOCs). В предыдущих исследованиях было показано, что VOCs образуются путем высвобождения жира в виде свободных жирных кислот, которые быстро распадаются до различных VOCs. В большинстве случаев, определяемых количеств недостаточно для нанесения вреда, однако, очевидно преимущество в наличии продукта, вводимого людям или другим животным, который по существу не содержит никаких VOCs.

Содержание жиров в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*, полученных путем роста в аэробных и анаэробных условиях, составляет приблизительно от 3% до приблизительно 8%. Содержание жиров изменяется в зависимости от условий роста дрожжей. В Таблице 1 представлен обзор типичного содержания жиров в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*. Данные приведены из следующих источников:

- Blagovic, B., J. Rpecuc, M. Meraric, K. Georgia and V. Marie. 2001. Lipid composition of brewer's yeast. Food Technol. Biotechnol. 39:175-181.
- Shulze. 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. 1995. The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function and biogenesis.

Таблица 1			
Жирная кислота	Shulze (1995)	Blagovic и др. (2001) (рост в анаэробных условиях)	Van Der Rest и др. (1995)
10:0 Капроновая кислота	1,1%		
12:0 и 12:1 Лауриловая кислота	4,8%	7,3%	
14:0 и 14:1 Миристиловая кислота	8,8%	5,1%	7,0*%
16:0 Пальмитиновая кислота	26,8%	44,2%	12,8%
16:1 Пальмитолеиновая кислота	16,6%	16,9%	32,3%
18:0 Стеариновая кислота	6,1%	13,9%	8,0%
18:1 Олеиновая кислота	25,7%	7,3%	28,0%
18:2 и выше линолевая кислота, арахидоновая кислота и другие	10,1%	5,3%	9,4%
*включает липиды от 10:0 до 14:1			

Материал клеточной стенки дрожжей, как правило, содержит 10-25% жиров в зависимости от типа дрожжей и условий роста. В рамках настоящего изобретения во время переработки материала клеточной стенки дрожжей в β -глюкан, часть, но не все жиры удаляются на этапах центрифугирования и промывания. Таким образом, типичный способ выделения может привести к 3-7% содержанию жира.

Производственный процесс, как правило, включает стадии по удалению маннозопротеинов, липидов и других нежелательных компонентов клеточной стенки дрожжей. Некоторыми ключевыми стадиями, которые типичны для такой обработки, являются различные этапы промывания, в которых используются кислоты и щелочи в качестве отдельных этапов промывания для избавления от определенных компонентов клеточной стенки. В нескольких стадиях используют промывание щелочью, где щелочь, обычно гидроксид натрия, добавляют к жидкой суспензии клеточной стенки. Одна из задач щелочи состоит в том, чтобы удалить липиды посредством образования жирных кислот из липидов. Результатом является снижение содержания жиров в β -глюкане.

Этапы промывания щелочью, обычно применяемые при получении β -глюкана из дрожжей, оставляют после себя остаточные жирные кислоты и частично разрушенные триглицериды, которые обладают повышенной реакционной способностью. Прямым результатом процессов промывки щелочью является высвобождение реакционноспособных жирных кислот, которые быстро распадаются до различных окисленных продуктов деградации жиров.

Многочисленные исследователи подробно описывали тот факт, что полиненасыщенные жиры распадаются во время хранения. Хотя триглицерид может подвергаться автоокислению в присутствии кислорода, свободным жирным кислотам больше свойственно подвергаться окислительному расщеплению. Характерным этапом в разложении липида, также известного как триглицерид, является высвобождение жирной кислоты из триглицерида. Ткани живых организмов практически не содержат жирные кислоты в свободном состоянии, но разложение является характерным, когда организм умирает или собирается в качестве урожая для дополнительной обработки, как, например, это происходит с семенами масличных культур и при переработке непищевого животного жира. (Nawar, W. W. Chapter 4. Lipids. In: Food Chemistry. © 1985. Editor: Owen R. Fennema. Marcel Dekker, Inc.; DeMan, J. M. Chapter 2. Lipids In: Principles of Food Chemistry © 1985. AVI Publishing Co., Inc.) Bo

многих триглицеридах 2-ое положение в молекуле глицерида занято ненасыщенной жирной кислотой. При обработке β -глюкана щелочью происходит хорошо известный процесс омыления, то есть высвобождение ненасыщенных жирных кислот, которые

5 Процесс окисления жира осуществляется по нескольким механизмам. Самым общим механизмом является самоокисление. Процесс запускается посредством удаления водорода из олефинового соединения с образованием свободного радикала. Удаление водорода из жира происходит в положении атома углерода рядом с двойной

10 связью. Реакция запускается различными факторами, которые приводят к образованию свободных радикалов, как например, ультрафиолет, металлы, синглетный кислород, и т.д.

15 $RH \rightarrow R' + H'$ (образование свободнорадикального электрона)
Второй стадией является присоединение кислорода с образованием свободного перокси-радикала, который распространяет цепную реакцию путем захвата водорода из другой ненасыщенной жирной кислоты.

$R' + O_2 \rightarrow RO_2'$ (образование окисленного свободного радикала)

20 $RO_2' + RH \rightarrow ROOH + R'$ (ROOH - реактивная гидроперекись, которая распадается до продуктов побочных реакций, таких как VOCs)

Цепная реакция продолжается до тех пор, пока она не останавливается, когда свободные радикалы взаимодействуют друг с другом с образованием инертных продуктов.

25 $R' + R' \rightarrow R-R$

$R' + RO_2' \rightarrow RO_2R$

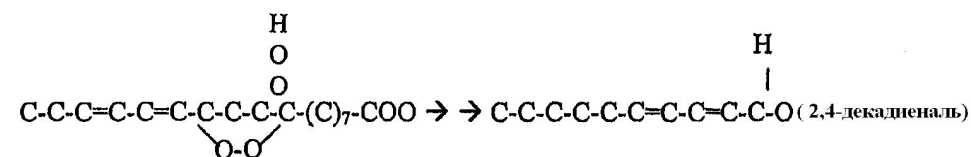
Последующие химические реакции приводят к образованию VOCs. Линолевая кислота используется в качестве модели в химических реакциях, но в клеточной оболочке дрожжей и в композициях дрожжевого β -глюкана присутствуют и другие

30 ненасыщенные жирные кислоты, которые приводят к образованию таких же конечных продуктов.

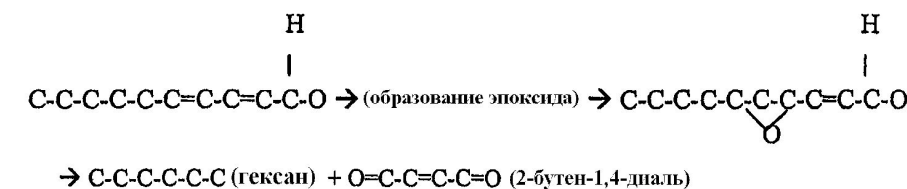
$ROOH \rightarrow RO' + OH-$
 $RO' \rightarrow$ реакции распада приводят к образованию альдегидов, алкил радикалов (которые образуют углеводороды и спирты), сложных эфиров, спиртов и

35 углеводородов.

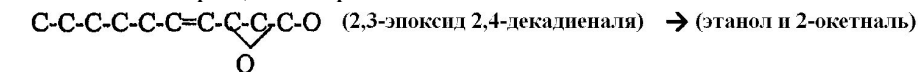
Пример:



При разложении эпоксида образуется несколько продуктов, включая



50 Точно так же, если между 2 и 3 углеродами образуются эпоксидные связи химические процессы приводят к:



Подобным образом, образование любых VOCs, которые определяются в

композиции β -глюкана, может быть объяснено реакциями самоокисления, которые протекают при разложении реакционноспособных перекисных соединений, которые образовались в процессе окисления жирной кислоты. Поэтому, удаление как можно большего количества жира из композиции β -глюкана приводит к продукту, который является более чистым не только в отношении жиров, но также и в отношении примесных VOC.

Обращаясь к фиг.1, следующим этапом в процессе очистки является экстракция кислотой, представленной в стадии 18, которая удаляет гликоген. Одна или несколько экстракций кислотами проводится путем доведения pH экстракта щелочь/поверхностно-активное вещество до приблизительно от 5 до 9, и перемешивая материал в присутствии от приблизительно 0,05 М до приблизительно 1,0 М уксусной кислоты при температуре от приблизительно 70°C до 100°C в течение от приблизительно 30 минут до приблизительно 12 часов.

В одном варианте осуществления нерастворимый материал, остающийся после центрифугирования экстракта щелочью/поверхностно-активным веществом, повторно суспендируют в воде, и pH раствора доводят концентрированной HCl до приблизительно 7. Материал перемешивают с достаточным количеством ледяной уксусной кислоты для образования 0,1 м раствора уксусной кислоты, который нагревают до 90°C в течение приблизительно 5 часов.

На стадии 20, нерастворимый материал промывают. В обычной стадии промывания материал смешивают в очищенной водой при приблизительно комнатной температуре в течение, по меньшей мере, приблизительно 20 минут. Промывание водой проводят два раза. Очищенный продукт β -глюкана затем собирают, как показано в стадии 22. Опять же, выделение, как правило, проводят путем центрифугирования или непрерывного центрифугирования.

На этом этапе получают очищенный порошковый продукт β -глюкана. Продукт может быть в форме целых частиц глюкана или любой его части в зависимости от исходного материала. Кроме того, частицы крупных размеров могут быть разломаны на меньшие частицы. Продукт включает частицы β -глюкана в интервале от тех, которые по существу сохранили *in vivo* морфологию (целые частицы глюкана) до частиц субмикронного размера.

Как известно в уровне техники, порошковый β -глюкан используется во многих продуктах, добавках и фармацевтических применениях. В качестве альтернативы, порошковый β -глюкан может быть обработан дополнительно с образованием водного, растворимого β -глюкана.

Растворимый β -глюкан

На фиг.2 представлен способ 24, который включает стадии 26-32 для получения водного, растворимого β -глюкана. Исходным материалом, используемым в способе 24, является порошковый β -глюкан, который можно получить по способу 10 или получить любым из многих ранее применяемых способов. Исходный порошковый β -глюкана может варьировать в размере от целых частиц глюкана до частиц субмикронных размеров.

На стадии 26 порошковый β -глюкан обрабатывают кислотой под давлением и при повышенной температуре для получения растворимого β -глюкана. Гранулированный, порошковый β -глюкан повторно суспендируют и перемешивают в герметичном реакционном сосуде в буферном растворе и pH доводят до 3,6. Буферные реагенты добавляют таким образом, что каждый литр, общий объем конечной суспензионной смеси, содержал приблизительно 0,61 г ацетата натрия, 5,24 мл ледяной уксусной

кислоты и 430 г гранулированного, порошкового β -глюкана. Сосуд продувают азотом для удаления кислорода и увеличения давления в реакционном сосуде.

В частном варианте осуществления, давление в сосуде доводят до 35 фунт/кв.дюйм ($24\,607,4\text{ кг/м}^2$) и суспензию нагревают до приблизительно 135°C в течение приблизительно от 4,5 до 5,5 часов. Было установлено, что в этих условиях β -глюкан будет растворяться. При снижении температуры ниже 135°C также уменьшается скорость растворения.

Необходимо отметить, что эти температура и давление являются обязательными для только что описанного варианта осуществления. Оптимизация температур и давлений может потребоваться, если любое из условий реакции и/или реактивов изменены.

Увеличенное давление и температура предоставляют преимущества над способами предшествующего уровня техники по растворению β -глюкана путем фактически исключения использования опасных химических соединений из способа по настоящему изобретению. Опасные химические соединения, которые использовались ранее, включают, например, воспламеняющиеся VOCs, как например, этиловый эфир и этиловый спирт, очень сильные кислоты, как например, муравьиная кислота и серная кислота, и каустические растворы с очень высоким pH. Способ по настоящему изобретению является не только более безопасным, но и, в результате уменьшения количества различных используемых химических соединений и количества включенных стадий, более экономичным.

Точная продолжительность термической обработки, как правило, определяется экспериментально путем анализа проб содержимого реактора и проведения анализов путем гель-проникающей хроматографии (GPC). Цель состоит в том, чтобы максимально повысить выход растворимого материала, который соответствует профилю спецификации GPC высокого разрешения (HR-GPC) и уровням примесей, что раскрывается далее. Как только β -глюкан становится растворимым, смесь охлаждают для остановки реакции.

Неочищенный, растворимый β -глюкан можно промыть и использовать в некоторых приложениях уже на этом этапе, однако, для фармацевтических применений, проводят дополнительную очистку. Любую комбинацию одного или нескольких стадий из следующих можно использовать для очищения растворенного β -глюкана. Другие средства, известные в этой области техники, также могут быть использованы при желании. На стадии 28, растворимый β -глюкан становится прозрачным. Подходящие средства для осветления включают, например, центрифугирование или непрерывное центрифугирование.

Затем, растворимый β -глюкан можно отфильтровать как показано в стадии 30. В одном варианте осуществления материал профильтровывают, например, через пористый фильтр, после чего через $0,2\text{ мкм}$ фильтр.

На стадии 32 для дополнительной очистки используется хроматография. Растворимый β -глюкан может обработан в некоторый момент во время стадии 28 или стадии 30 для подготовки к хроматографии. Например, если этап хроматографии включает хроматографию гидрофобного взаимодействия (HIC), растворенный β -глюкан может быть доведен до необходимой удельной электропроводности и pH раствором сульфата аммония и ацетата натрия. Подходящим раствором является $3,0\text{ М}$ сульфат аммония, $0,1\text{ М}$ ацетат натрия, который используют для доведения pH до 5,5.

В одном примере HIC колонка заполнена смолой Tosah Toyopearl Butyl 650M (или

эквивалентной). Колонка заполнена и квалифицирована согласно рекомендациям изготовителя.

Перед нанесением, уравнивающий проскок с колонки отбирают для определения рН, удельной электропроводности и исследования на эндотоксин.

Растворимый β -глюкан, выдержанный в более концентрированном растворе сульфата аммония, наносят и затем промывают. Свойства растворимого β -глюкана таковы, что большая часть продукта свяжется с ИС колонкой. Низкомолекулярные продукты так же как и некоторые высокомолекулярные продукты вымываются. Растворимый β -глюкан, остающийся на колонке, элюируют буфером, таким как 0,2 М сульфат аммония, 0,1 М ацетат натрия, рН 5,5. Многократные циклы могут быть необходимы для гарантии того, что количество нанесенной гексозы не превышает емкость смолы. Фракции собирают и анализируют для определения растворимого продукта β -глюкана.

Другой хроматографической стадией, который может быть использован, является гель-проникающая хроматография (GPC). В одном примере была использована и упакована и квалифицирована смола GPC Tosah Toyopearl HW55F, или эквивалентная, согласно рекомендациям изготовителя. Колонку уравнивали и элюировали, используя цитратный солевой буфер (0,14 М хлорид натрия, 0,011 М цитрат натрия, рН 6,3). Перед нанесением, уравнивающий проскок с колонки отбирают для определения рН, удельной электропроводности и исследования на эндотоксин. Опять же, многократные циклы могут быть необходимы для гарантии того, что количество нанесенной гексозы не превышает емкость смолы.

Элюат собирают в виде фракций, и различные комбинации образцов фракций анализируют с целью определения комбинации с оптимальным профилем. Например, комбинации образцов могут быть проанализированы посредством HR-GPC для определения комбинации, имеющей оптимизированный профиль HR-GPC. В одном оптимизированном профиле количество высокомолекулярных примесей (HMW), то есть растворимый β -глюкан свыше 380 000 Д, меньше чем или равно 10%. Количество низкомолекулярных примесей (LMW), до 25 000 Д, меньше чем или равно 17%. Выбранную комбинацию фракций впоследствии объединяют.

На этом этапе растворимый β -глюкан очищен и готов к употреблению.

Дополнительная фильтрация может быть выполнена для стерилизации продукта. При желании концентрация гексозы в продукте может быть доведена до приблизительно $1,0 \pm 0,15$ мг/мл стерильным цитратным солевым буфером.

Методики очистки, описанные выше, приводят к улучшенному растворимому β -глюкану, который предоставляет определенные преимущества в качестве фармацевтического средства, которые обсуждены ниже. Растворимый β -глюкан имеет средний молекулярный вес от приблизительно 120 000 Д до приблизительно 205 000 Д и распределение молекулярного веса (полидисперсность) не больше чем 2,5 как определено посредством HR-GPC с многократным угловым рассеянием света (HR-GPC/MALS) и дифференциальным определением показателя преломления. Порошковая дифракция рентгеновских лучей и ЯМР с вращением образца под магическим углом показали, что продукт состоит из полимерных цепей, связанных в тройные спирали.

Растворимый β -глюкан, как правило, незаряжен и поэтому не имеет pK_a . Он растворим в воде вне зависимости от рН, и вязкость увеличивается с увеличением концентрации.

В Таблице 2 суммированы типичные уровни примесей в растворимом продукте β -

глюкана, используя целые частицы глюкана, полученные по способу 10.

Таблица 2		
Примеси	Описание	Разброс уровней, определенных в трех различных пробах
HMW	≤10%	
LMW	≤17%	
Восстанавливающий сахар	0,7 - 1,6% общей гексозы*	1,0-1,1% общей гексозы
Гликоген	≤10% общей гексозы	<5% общей гексозы
Маннан (в качестве маннозы)	≤1% от выделенной гексозы	От <0,6% до ≤0,8% выделенной гексозы
Хитин (в качестве глюкозамина)	≤2% общей гексозы	0,2-0,5% общей гексозы
Белок	≤0,2% общей гексозы	<0,2% общей гексозы
Дрожжевой белок	Определение параметров**	<2 нг/мг гексозы
ДНК	Определение параметров	От <6,5 до <50 пг/мг гексозы
Эргостерол	Определение параметров	От <10 до <25 мкг/мг гексозы
Triton X-100	Определение параметров	От <1 до <5 мкг/мг гексозы
Antifoam 204	Определение параметров	<10 мкг/мг гексозы
*Общее количество глюкозы определяли калориметрическим анализом. Полимерные сахара гидролизуются в серной кислоте и антроне с образованием фурфуралов. Фурфуралы конъюгируют с антроном с образованием хромофора, который измеряют спектрофотометрически.		
**Границы не были указаны		

Примеси, связанные с продуктом, включают материал с молекулярным весом более чем 380 000 дальтон или менее чем 25 000 дальтон, поскольку, было установлено, что улучшенный растворимый β-глюкан попадает в этот диапазон молекулярного веса.

Дополнительным измерением связанных с продуктом примесей является определение восстанавливающих сахаров. На конце каждой полисахаридной цепи глюкана находится сахар в форме альдегида (восстанавливающий сахар). Таким образом, количество восстанавливающего сахара служит показателем относительного количества цепей в препарате. Поскольку каждый новый восстанавливающий конец образуется с новым распадом цепи, количество восстанавливающих сахаров является контрольным индикатором стабильности цепи. Восстанавливающие сахара можно измерять анализом с бицинхониновой кислотой (BCA), который известен в этой области техники.

Потенциальные примеси способа получения включают другие элементы дрожжевой клетки, такие как ДНК, белки дрожжевой клетки, липиды и другие полиозы, такие как гликоген, маннан и хитин. Уровни ДНК могут быть проанализированы, используя анализ гибридизации в лунке (MDS PanLabs, Seattle, WA). Остаточный белок можно определить посредством колориметрического анализа для белков или посредством более чувствительного коммерческого твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), который измеряет клеточные белки *S. cerevisiae* (Cygnus Technology, Southport, NC). Остаточные липиды могут быть проконтролированы посредством определения уровней эргостерола, используя жидкостную хроматографию высокого разрешения с обратной фазой (RF-HPLC) с детекцией при 280 нм.

Гликоген является полиозом, который прежде всего состоит из α-1,4-глюкозы, и ее присутствие можно определить посредством ферментативного анализа. Продукт добавляют в ферментативную реакцию, содержащую амилазу, которая высвобождает глюкозу из гликогена, производя восстанавливающие сахара. Восстанавливающие сахара измеряют посредством анализа BCA.

Маннан является разветвленным полимером α-1,6-маннозы с α-1,2-и α-1, 3-разветвлениями, который, как и маннозу, определяют по составляющим его моносахаридам. Продукт добавляют в реакцию, и манноза гидролизует в

трифторуксусной кислоте и анализируется посредством ВЭЖХ.

Хитин является полимером β -1,4-N-ацетилглюкозамина, который определяют посредством колориметрического анализа. Растворимый β -глюкан гидролизует в серной кислоте, и полученный глюкозамин образует комплексное соединение с реактивом Эрлиха, который измеряют колориметрически. Эти и другие подходящие анализы известны квалифицированным специалистам в этой области техники.

Потенциальные недрожжевые примеси, происходящие из компонентов, добавляемых во время производственного процесса, включают Triton X-100 (поверхностно-активное вещество) и Antifoam 204 (противовспенивающее вещество). ВЭЖХ с обратной фазой (RP-HPLC) с детекцией при 280 нм можно использовать для различения любого количества остаточного Triton X-100. Antifoam 204 определяют посредством метода RP-HPLC, используя избирательное контрольное определение ионов посредством детекции масс-спектрометром с электрораспылением в режиме определения положительных ионов.

Определенные характеристики продукта предложены для использования растворимого β -глюкана в качестве фармацевтического средства. Эти характеристики перечислены в Таблице 3.

Таблица 3			
Категория	Характеристика	Метод	Предложенные границы
Общие	Внешний вид	Визуальный	Прозрачный бесцветный раствор
	pH	pH-метрия	5,0-7,5
	Осмолярность	Осмометрия	260-312 мОсм
Идентификация	Профиль HR-GPC	GPC-MALS	Согласно стандарту; соотношение пика к удерживаемому объему: 0,8 - 1,2
Сила	Концентрация (общее количество генксозы)	Колориметрический анализ на генксозу	0,85 - 1,15 мг/мл
Примеси	HMW материал	GPC-MALS	$\leq 10\%$
	LMW материал	GPC-MALS	$\leq 17\%$
	Восстанавливающий сахар	BCA анализ	0,7-1,6% от общей генксозы
	Остаточный белок	Колориметрический анализ на белок	$\leq 0,2\%$ от общей генксозы
	Хитин (глюкозамин)	Колориметрический анализ	$\leq 2\%$ от общей генксозы
	Маннан (манноза)	Состав моносахаридов	$\leq 1\%$ от выделенной генксозы
	Гликоген	Ферментативный	$\leq 10\%$ от общей генксозы
Безопасность	Эндотоксин	анализ Pyrogene recombinant Factor C	$\leq 0,25$ EU*/мл
	Биологическая нагрузка	Фильтрация на мембране	≤ 5 КОЭ**/10мл
*эндотоксиновые единицы			
**колонии образующие единицы			

Как указано выше, растворимый β -глюкан, полученный посредством способов 10 и 24, является улучшенным продуктом по сравнению с растворимыми материалами β -глюкана предшествующего уровня техники. Совершенствование отражено в результатах клинического испытания, в котором растворимо β -глюкан по настоящему изобретению, вводимый в намного более высокой чем максимальная доза, показал такое же или меньшее количество нежелательных реакций (AEs), чем ниже, чем максимальные дозы растворимого β -глюкана предшествующего уровня техники. Результаты представлены в Таблице 4.

Таблица 4		
Связанное АЕ (развивается $\geq 5\%$ всех испытуемых)	Bf1 ¹	Улучшенный растворимый β -глюкан

5	Тело в целом	7%	--
	Боль в спине	16%	--
	Лихорадка	30%	8%
	Головная боль	7%	--
	Боль		
10	Сердечно-сосудистые	--	6%
	Вазодилатация/гиперемия		
	Пищеварение	7%	6%
	Тошнота		
	Гематология/лимфатическая система	--	--
15	Экхимоз	--	--
	Лейкоцитоз		
	Дыхание	--	1%
	Одышка		
	Опорно-двигательная система	11%	--
20	Артралгия		
	Кожа/придатки	7%	--
	Крапивница	--	--
	высыпания		
	Органы чувств	9%	--
	конъюнктивит		
¹ Максимальная однократная доза 2,25 мг/кг			
² Максимальная однократная доза 6,0 мг/кг			

Bf1, известный под торговой маркой Betafectin™, является продуктом растворимого β-глюкана, разработанного Alpha-Beta Technology, Inc. Для растворения порошкового материала β-глюкана в этом способе получения Betafectin™ используется муравьиная кислота. Кроме того, с Bf1 не проводили никакую хроматографию в способе его

очистки.

Исследования проводили на группе здоровых добровольцев. По сравнению с Bf1, участники исследования, получавшие улучшенный растворимый β-глюкан, реже сообщали о нежелательных реакциях даже при том, что максимальная дозировка более чем в 2,5 раза превышала таковую для Bf1. Таким образом, намного более высокая дозировка улучшенного растворимого β-глюкана может быть введена по меньшей мере без увеличения, но вероятно фактически даже уменьшения, побочных эффектов. Кроме того, улучшенный растворимый β-глюкан не вызывает образование биохимических медиаторов, таких как интерлейкин-1β и фактор некроза опухоли α, которые вызывают воспалительные побочные эффекты.

Способы по настоящему изобретению предоставляют несколько преимуществ над способами предшествующего уровня техники и приводят к получению улучшенных композиций β-глюкана. Порошковый β-глюкан по существу не содержит вредных VOCs. Растворение β-глюкана более безопасно и более экономично. Кроме того, растворение порошкового β-глюкана по способу настоящего изобретения приводит к растворимому β-глюкану с улучшенными фармацевтическими свойствами.

В то время как настоящее изобретение было представлено и описано со ссылками на частные варианты осуществления, квалифицированные в этой области техники специалисты понимают, что различные изменения в форме и деталях могут быть сделаны без отступления от сущности и охвата настоящего изобретения, заключенных в прилагаемой формуле изобретения.

Формула изобретения

1. Композиция, обладающая иммуностимулирующими свойствами, включающая немодифицированный, растворимый β-глюкан, имеющий средний молекулярный вес от приблизительно 120000 Да до приблизительно 205000 Да, где композиция содержит

растворимый β -глюкан с молекулярным весом более чем 380000 Да в количестве, менее чем или равном 10% и

β -глюкан с молекулярным весом менее чем 25000 Да в количестве, менее чем или равном 17%.

2. Композиция по п.1, в которой немодифицированный, растворимый β -глюкан не вызывает биохимические медиаторы, которые вызывают воспалительные побочные эффекты.

3. Композиция по п.2, где биохимическими медиаторами являются интерлейкин-1 β , фактор некроза опухоли α или оба.

4. Композиция по п.1, в которой немодифицированный, растворимый β -глюкан получен из *Saccharomyces cerevisiae*.

5. Композиция по п.1, где немодифицированный, растворимый β -глюкан может применяться в единственных дозах до приблизительно 6 мг/кг.

6. Композиция, обладающая иммуностимулирующими свойствами, включающая немодифицированный, растворимый β -глюкан, имеющий средний молекулярный вес от приблизительно 120000 Да до приблизительно 205000 Да и растворимый β -глюкан с молекулярным весом более чем 380000 Да в количестве, менее чем или равном 10%, и β -глюкан с молекулярным весом менее чем 25000 Да в количестве, менее чем или равном 17%, где немодифицированный, растворимый β -глюкан подходит для введения человеку или животному в дозе до приблизительно 6 мг/кг.

7. Композиция по п.6, в которой содержание в немодифицированном, растворимом β -глюкане восстанавливающего сахара не превышает приблизительно 1,6% от всей гексозы.

8. Композиция по п.6, в которой немодифицированный, растворимый β -глюкан содержит меньше чем приблизительно 25 мкг/мг гексозы.

9. Композиция по п.6, где не более чем у 8% людей, которым вводили немодифицированный, растворимый β -глюкан, возникла какая-нибудь нежелательная реакция.

10. Способ получения растворимого β -глюкана из п.1, где способ включает: приложение приблизительно 35 фунт/кв.дюйм (24607,4 кг/м²) давления к суспензии порошкового β -глюкана и кислоты; и нагревание суспензии до приблизительно 135°C в течение времени, которое достаточно для того, чтобы образовался растворимый β -глюкан.

11. Способ по п.10, дополнительно включающий осветление растворимого β -глюкана.

12. Способ по п.11, в котором растворимый β -глюкан осветляют посредством центрифугирования, фильтрации или их комбинации.

13. Способ по п.10, в котором суспензия находится в сосуде, из которого, по существу, удален весь кислород.

14. Способ по п.13, в котором кислород удален посредством продувания сосуда азотом.

15. Способ по п.10, дополнительно включающий разделение растворимого β -глюкана во фракции, основываясь на молекулярном весе.

16. Способ по п.15, в котором растворимый β -глюкан отделен посредством хроматографии.

17. Способ по п.10, в котором кислотой является уксусная кислота.

18. Композиция, обладающая иммуностимулирующими свойствами, включающая фармацевтически эффективное количество немодифицированного, растворимого β -

глюкана, полученного способом согласно п.10.

19. Композиция по п.18, где немодифицированный, растворимый β -глюкан может применяться в единственных дозах до приблизительно 6 мг/кг.

5 20. Композиция по п.18, в которой немодифицированный, растворимый β -глюкан не вызывает биохимические медиаторы, которые вызывают воспалительные побочные эффекты.

21. Композиция по п.20, где биохимическими медиаторами являются интерлейкин-1 β , фактор некроза опухоли α или оба.

10 22. Композиция по п.18, в которой немодифицированный, растворимый β -глюкан получен из *Saccharomyces cerevisiae*.

23. Композиция по п.18, в которой молекулярный вес немодифицированного, растворимого β -глюкана составляет от приблизительно 25000 Да до приблизительно 380000 Да.

15 24. Композиция, обладающая иммуностимулирующими свойствами, включающая фармацевтически эффективное количество немодифицированного, растворимого β -глюкана, полученного способом согласно п.10, имеющего средний молекулярный вес от приблизительно 120000 Да до приблизительно 205000 Да, которую можно вводить

20 человеку или животному в дозе до приблизительно 6 мг/кг.

25 25. Композиция по п.24, где немодифицированный, растворимый β -глюкан может применяться в единственных дозах до приблизительно 6 мг/кг.

26. Композиция по п.24, в которой содержание в немодифицированном, растворимом β -глюкане восстанавливающего сахара не превышает

25 приблизительно 1,6% от всей гексозы.

27. Композиция по п.24, в которой немодифицированный, растворимый β -глюкан содержит меньше чем приблизительно 25 мкг/мг гексозы.

30 28. Композиция по п.24, где не более чем у 8% людей, которым вводили немодифицированный, растворимый β -глюкан, возникла какая-нибудь нежелательная реакция.

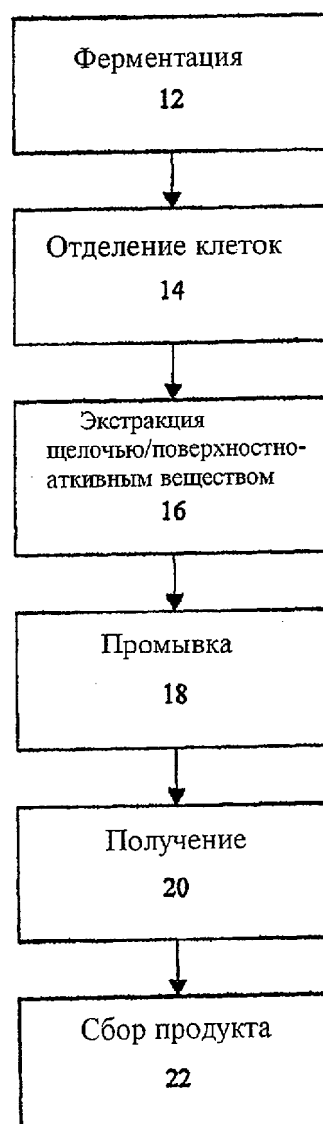
35

40

45

50

10



ФИГ.1

24



ФИГ.2