

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 314**

51 Int. Cl.:  
**C08B 37/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08709658 .2**  
96 Fecha de presentación: **28.02.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2115010**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.11.2009**

54 Título: **REDUCCIÓN DE ENDOTOXINA EN ÁCIDOS POLISIÁLICOS.**

30 Prioridad:  
**28.02.2007 EP 07103275**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**28.02.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**28.02.2012**

73 Titular/es:  
**LIPOXEN TECHNOLOGIES LIMITED  
LONDON BIOSCIENCE INNOVATION CENTRE 2  
ROYAL COLLEGE STREET  
LONDON NW1 0NH, GB**

72 Inventor/es:  
**JAIN, Sanjay;  
LAING, Peter y  
GREGORIADIS, Gregory**

74 Agente: **Izquierdo Faces, José**

**ES 2 375 314 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

Reducción de endotoxina en ácidos polisialílicos.

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a la reducción de endotoxina en el ácido polisialílico (PSA) y sus conjugados mediante la incubación con una base fuerte, seguido por la recuperación del PSA, habitualmente por la adsorción y elución de una columna de intercambio. El ácido PSA con contenido de endotoxina reducido puede ser usado para sistemas de administración de medicamentos de derivatización, incluyendo proteínas y fármacos péptidos, lo que mejora las farmacocinéticas y las farmacodinamias de los fármacos.
- 10 **[0002]** Los ácidos polisialílicos son polímeros no ramificados de origen natural del ácido siálico producidos por ciertas cepas bacterianas y en los mamíferos en ciertas células [Roth y otros, 1993]. Se pueden producir en varios grados de polimerización desde  $n$ =alrededor de 80 o más residuos de ácido siálico hasta  $n$ =2 por hidrólisis ácida limitada o por digestión con neuraminidasas, o por el fraccionamiento de las formas naturales bacterialmente derivadas del polímero. La composición de diferentes ácidos polisialílicos también varía de tal forma que hay formas homopoliméricas, es decir, el ácido polisialílico alfa-2, 8-enlazado que comprende el polisacárido capsular de la cepa *E. coli* K1 y el grupo B *meningococci*, que también se encuentra en la forma embrionaria de la molécula de adhesión celular neuronal (N-CAM). Las formas heteropoliméricas también existen tales como el ácido polisialílico alternando alfa-2,8 alfa-2,9 de la cepa de *E. coli* K92 y polisacáridos de grupo C de *N. meningitidis*. El ácido siálico puede también ser encontrado en la alternancia de copolímeros con monómeros que no sean ácido siálico como el grupo W135 o el grupo Y de *N. meningitidis*. Los ácidos polisialílicos tienen importantes funciones biológicas incluyendo la evasión de los sistemas inmunológico y complementario por bacterias patogénicas y la regulación de la adhesividad de gliales de las neuronas inmaduras durante el desarrollo fetal (en donde el polímero tiene una función anti-adhesiva) [Muhlenhoff y otros, 1998], a pesar de que no hay receptores conocidos para los ácidos polisialílicos en mamíferos. El ácido polisialílico alfa-2,8-enlazado de la cepa de *E. coli* K1 también es conocido como "ácido colomínico (CA)" y es usado (en varias longitudes) para ejemplificar la presente invención.
- 15 **[0003]** La forma alfa-2,8 enlazada del ácido polisialílico, entre los polisacáridos bacterianos, es no-inmunogénica (no provocando respuestas ni de células T ni de anticuerpos en sujetos mamíferos, incluso cuando se conjuga con proteínas portadoras inmunogénicas) que puedan reflejar su status como un polímero mamífero (así como bacteriano). Las formas más cortas del polímero (hasta  $n$ =4) se encuentran en gangliósidos de la superficie celular, que están ampliamente distribuidos en el cuerpo, y se cree que imponen y mantienen efectivamente la tolerancia inmunológica al ácido polisialílico. En años recientes, las propiedades biológicas de los ácidos polisialílicos, particularmente las del ácido polisialílico homopolimérico alfa-2,8 enlazado han sido aprovechadas para modificar las propiedades farmacocinéticas de la proteína y las moléculas de fármacos de bajo peso molecular [Greoriadis, 2006; Jain y otros, 2003; US-A-5846.951; WO-A-0187922]. La derivatización del ácido polisialílico da lugar a mejoras impresionantes en la vida media de circulación para un número de proteínas terapéuticas incluyendo la catalasa y la asparaginasa, y también permite que tales proteínas sean usadas en presencia de anticuerpos preexistentes surgidos como una consecuencia no deseada (y algunas veces inevitable) de una exposición anterior a la proteína terapéutica. En muchos aspectos, las propiedades modificadas por las proteínas polisialiladas son comparables a las proteínas derivatizadas con polietilenglicol (PEG). Por ejemplo, en cada caso, las vidas medias se aumentan, y las proteínas y los péptidos son más estables a la digestión proteolítica, pero la retención de la actividad biológica parece ser mayor con el PSA que con el PEG [Hreczuk-Hirst y otros, 2002]. También hay preguntas sobre el uso del PEG con agentes terapéuticos que han de ser administrados crónicamente, ya que el PEG es sólo muy lentamente biodegradable [Beranova y otros, 2000] y las formas con alto peso molecular tienden a acumularse en los tejidos [Bendele y otros, 1998; Convers y otros 1997]. Se ha descubierto que las proteínas PEGadas generan anticuerpos PEG que pueden también influenciar el tiempo de residencia del conjugado en la circulación sanguínea [Cheng y otros, 1999]. A pesar de la historia establecida del PEG como un polímero administrado parenteralmente conjugado a las terapéuticas, se requerirá una mejor comprensión de su inmunotoxicología, farmacología y metabolismo [Hunter y Moghimi, 2002]. De igual modo hay preocupación sobre la utilidad del PG en agentes terapéuticos que pueden requerir altas dosificaciones, ya que la acumulación de PEG puede llevar a la toxicidad. El ácido polisialílico alfa-2,8 enlazado por lo tanto ofrece una alternativa atractiva al PEG, siendo un polímero biodegradable inmunológicamente invisible que es parte natural del cuerpo humano, y que se degrada, por las neuraminidasas del tejido, a ácido siálico, un sacárido no tóxico. Sin embargo, el PSA bruto se contamina con altos niveles de endotoxina lo que limita su utilidad terapéutica.
- 20 **[0004]** Nuestro grupo ha descrito, en ensayos anteriores y en patentes concedidas, la purificación y el fraccionamiento del PSA y su utilidad para mejorar las propiedades farmacocinéticas de proteínas terapéuticas [Gregoriadis, 2006, Jain y otros, 2004; US-A-05846.951; WO-A-0187922]. Ahora describimos la preparación de PSAs purificados con contenido reducido de endotoxina que pueden ser usados para producir proteínas derivatizadas del PSA, y otros agentes terapéuticos. Estos nuevos materiales y métodos son particularmente adecuados para la producción de agentes terapéuticos derivatizados del PSA destinados para su uso en humanos y animales, en los que la definición química y molecular de las entidades del fármaco es de la mayor importancia debido a las éticas médicas y los requisitos de seguridad de las autoridades reguladoras como la FDA y la EMEA.
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

- 5 **[0005]** La endotoxina (que es un lipopolisacárido) fue primero definida por Richard Pfeiffer en 1892 como una sustancia tóxica estable al calor liberada por la ruptura de cubiertas microbianas. La respuesta inflamatoria en el huésped infectado resulta en la producción de toxicidad lo que parece estar adaptado óptimamente para la limpieza de la mayoría de las infecciones locales. Sin embargo, también puede tener lugar una respuesta inflamatoria que lleva a un shock séptico y la muerte cuando hay una distribución sistémica de las infecciones severas.
- 10 **[0006]** Este lipopolisacárido (LPS) se utiliza en la mayoría de los pasos que tienen lugar durante la presentación de la endotoxina a las células mieloides del sistema inmune y la producción de las citocinas inflamatorias. El componente más potente del LPS es el lípido A y se ha convertido en sinónimo de la endotoxina. También se hace referencia como endotoxina a los mediadores inflamatorios de las bacterias como el peptidoglicano, la fracción diacilglicerilcisteína de las lipoproteínas bacterianas, y las firmas de ácidos nucleicos bacterianos. Recientemente, se ha descubierto que el receptor tipo Toll (TLR4) es el transductor de señal inflamatorio del lípido A. Además, se han identificado los transductores de señales para diferentes mediadores inflamatorios. La estructura de la endotoxina es importante ya que su elucidación facilita un entendimiento de cómo puede ser retirada.
- 15 **[0007]** El LPS está formado de tres partes: la región del lípido hidrofóbico, proximal, que ancla el LPS a las valvas exteriores del OM, la distal, repeticiones del O-antígeno hidrofílico, que se extiende en el medio acuoso, y el núcleo oligosacárido interconectando. El O-antígeno y los azúcares fundamentales aunque no son esenciales para la supervivencia, proporcionan resistencia bacteriana contra varios agentes antimicrobianos incluyendo detergentes y el complejo de ataque de la membrana del complemento sérico.
- 20 **[0008]** Las células del tipo salvaje que producen el O-antígeno debido a su colonia brillante son conocidas como "suaves" y las que no tienen el O-antígeno son conocidas como "rugosas". A las moléculas que contienen el polisacárido O-antígeno se hace referencia habitualmente como LPS y las moléculas que carecen del O-antígeno, como en la *Neisseria*, son denominadas lipooligosacáridos o LOS. Como el Lípido A es esencial para la supervivencia y también es un potente mediador inflamatorio, es conocido un objetivo para el desarrollo de antibióticos y agentes antiinflamatorios.
- 25 **[0009]** Muchos mediadores inflamatorios, además del LPS, pueden ser considerados como endotoxinas, incluyendo el peptidoglicano, la fracción glicerilcisteína diacil de lipoproteínas bacterianas, las firmas del ácido nucleico bacteriano y las endotoxinas inactivas (producidas por cepas mutantes de endotoxina).
- 30 **[0010]** La estructura del lípido A modificada ha sido usada para desarrollar nuevos antagonistas de endotoxina y adyuvantes inmunes [Christ y otros, 1995]. La determinación de los detalles bioquímicos de la estructura y la función del lípido A ayuda a entender su papel en la patogénesis bacteriana y para intervenir con tratamientos nuevos para la infección [Bishop 2005].
- 35 **[0011]** Los métodos han sido desarrollados para reducir el contenido de endotoxina de los fluidos. La WO87/075361, por ejemplo, describe la retirada de la endotoxina de fluidos que contienen endotoxina, como la sangre, usando polimixina B inmovilizada en un apoyo de fase sólida.
- 40 **[0012]** La US 6.942.802 B2 describe métodos para la retirada de la endotoxina bacteriana de una solución proteica para recuperar la proteína. En esta patente, se usa la cromatografía de afinidad con el metal inmovilizado.
- 45 **[0013]** La US 6.713.611 B2 se refiere a un método de retirada de una endotoxina de una solución que contiene proteínas básicas. El método comprende añadir un surfactante a la solución y cargar la solución resultante en una columna de intercambio de cationes con la recuperación posterior de la proteína básica de la columna.
- 50 **[0014]** La US 6.617.443 describe un método para retirar endotoxinas de un material del que se recuperan los ácidos nucleicos. Las endotoxinas son retiradas preincubando los ácidos nucleicos en una solución de detergente libre de sales y la posterior cromatografía de intercambio de aniones en un intercambiador de aniones de tentáculo.
- 55 **[0015]** La US 5.169.535 describe un método para retirar endotoxina de una solución que contiene proteína y endotoxina, donde el pH de la solución es ajustado a pH 9 o menor (el punto isoeléctrico de la proteína) y la solución se pasa a través de una columna embalada con un quitosano granular reticulado. La endotoxina es absorbida y la proteína pasa a través.
- 60 **[0016]** La US 5.917.022 describe un proceso para la retirada de endotoxina de un producto biológico como las proteínas para uso terapéutico, fracciones de plasma sanguíneo, y soluciones de albumina. Este método comprende enlazar la endotoxina presente en el mencionado producto biológico a una matriz hidrofílica reticulada hecha de un copolímero de alil dextrano y N,N-metileno bisacrilamida, a la que la endotoxina se enlaza con algún grado de especificidad. Este proceso está en la clase del método de cromatografía de afinidad.
- 65 **[0017]** La US 7.109.322 revela un proceso para reducir o retirar endotoxinas de composiciones que contienen sustancias activas terapéuticas, habitualmente ácidos nucleicos, extraídos de fuentes naturales por ingeniería genética y/o biotecnología. Para ese propósito, las composiciones que se recuperan del caldo de fermentación, por

- ejemplo, son tratadas con materiales cromatográficos. Las fracciones de las fuentes naturales como el caldo de fermentación del *E. coli* obtenido son centrifugadas, lisadas usando 200 mM de NaOH, 1% de dodecil sulfato de sodio, filtradas, después pasadas a través de una columna de intercambio de aniones a la que el ácido nucleico preferiblemente (en comparación con la endotoxina) absorbe. El ácido nucleico es eluido con un regulador de la elución y recuperado. En otro ejemplo un adsorbente de afinidad de metal para la endotoxina se usa antes de la columna de intercambio de aniones.
- [0018]** La invención US 6.699.386 B2 proporciona un adsorbente que tiene una alta capacidad para absorber endotoxina selectivamente y un método para adsorber endotoxina de una solución proteica. El adsorbente está compuesto de una sustancia básica pegada a un material base por medio de un agente reticulante.
- [0019]** La invención US 6.774.102 describe material para el tratamiento sanguíneo que tiene la capacidad de retirar selectivamente endotoxina y citocina induciendo sustancias de la sangre o el plasma por adsorción extracorpórea para el tratamiento del shock séptico terapéutico. También se proporcionan métodos y dispositivos que usaban un adsorbente que tiene un oligopéptido polidisperso de la invención inmovilizado en un medio de apoyo de estado sólido para la retirada de la endotoxina de la sangre de un sujeto humano o animal.
- [0020]** También se han descrito métodos para la retirada de endotoxina de muestras de polisacáridos.
- [0021]** La US 5.589.591 revela un proceso para producir una composición polisacárida sustancialmente libre de endotoxina usando una técnica de separación por tamaño, preferiblemente la ultrafiltración. El método es adecuado para retirar endotoxina del manano, de la goma arábica y del arabinogalactano recuperados de su origen vegetal.
- [0022]** La US 5.039.610 describe un proceso para la retirada de endotoxina de polisacáridos Gram-negativos como el fosfato de polirribosilribitol. El polisacárido que contiene polvo derivado del caldo de fermentación de la bacteria Gram-negativa es solubilizado para proporcionar un ión de conteo divalente para la endotoxina. El alcohol es añadido incrementalmente para inducir la precipitación del lipopolisacárido y el material resultante es mezclado con una resina no iónica, un detergente y un agente quelante.
- [0023]** La WO98/32873 revela un proceso para separar endotoxinas de polisacáridos capsulares bacterianos, por ejemplo un polisacárido capsular de la *N. meningitidis*, serogrupo C (ejemplo 2), que es un ácido polisiálico (polímero del ácido N-acetilneuramínico). Los pasos principales de este proceso son mezclar la muestra con una solución de detergente, la precipitación alcohólica, y la filtración.
- [0024]** Sin embargo, hasta la fecha, sigue siendo un reto reducir el contenido de endotoxina de una muestra de ácido polisiálico a un nivel aceptable para su uso en productos farmacéuticos. El polisacárido de los caldos de fermentación tiene un contenido aniónico y un peso molecular muy similar al de la endotoxina. EL compuesto natural también es un lipopolisacárido. Por estas razones la mayoría de las técnicas de purificación resultan en alguna copurificación del PSA y de la endotoxina. La presente invención supera estos problemas.
- [0025]** De acuerdo a un primer aspecto de la invención, proporcionamos un proceso para reducir el contenido de endotoxina de una muestra que contiene ácido polisiálico y endotoxina que comprende los pasos secuenciales de:
- (i) Añadir a la muestra una base que tiene un pKa de al menos 12 para formar una solución básica que tiene un pH de al menos 12, incubar la solución durante un tiempo a una temperatura; y después
  - (ii) recuperar el ácido polisiálico que tiene un contenido de endotoxina reducido de la solución.
- [0026]** En una realización la recuperación del PSA de la solución incluye los pasos de:
- (iii) pasar la solución tratada con base a través de una columna de intercambio de aniones por lo que el ácido polisiálico es absorbido en la resina de intercambio de iones.
  - (iv) lavar la columna con un regulador de lavado, por lo que el ácido polisiálico permanece absorbido en la resina de intercambio de iones; y
  - (v) eluir el ácido polisiálico de la columna usando un regulador de elución para proporcionar una solución de producto de ácido polisiálico que tiene un contenido de endotoxina reducido. Se cree que al menos alguno de los productos de endotoxina tratados con base pasan a través de la columna de intercambio de iones en el volumen de vacío.
- [0027]** En otra realización el paso de recuperación (ii) implica un paso de tratamiento de retirada de sal, es decir basado en cromatografía de exclusión por tamaño por lo que los materiales de mayor peso molecular, como los polisacáridos son recuperados libres de sales. La invención es de particular utilidad para el tratamiento de caldos de fermentación microbianos.
- [0028]** La solución que contiene el ácido polisiálico y la endotoxina que está sujeta al tratamiento base del proceso de la invención es preferiblemente el caldo de fermentación, habitualmente el sobrenadante tras la centrifugación, o el producto de pasos de tratamiento preliminares para la retirada de contaminantes no deseados como los

nutrientes, los lípidos, las proteínas y el ácido nucleico. La muestra puede, sin embargo, contener proteínas que no son deseadas en el producto final ya que se espera que sean degradadas por la base y los productos de la degradación retirados fácilmente durante los pasos de recuperación del PSA.

5 **[0029]** Este proceso resulta en muestras de PSA que tienen contenido de endotoxina reducido y que son adecuadas para el uso en la preparación de productos farmacéuticos. Sorprendentemente, para la persona experta, el uso de la base fuerte no resulta en la degradación (del peso molecular) o la desacetilación del PSA. La persona experta habrá evitado el contacto del PSA con una base fuerte como el NaOH donde la desacetilación se debe evitar, ver por ejemplo Moe y otros. Hemos mostrado, sin embargo, que incubando con la base seguido de la  
10 recuperación del PSA por ejemplo por elución en una columna de intercambio de aniones es un método particularmente efectivo para reducir el contenido de endotoxina del PSA, mientras que no lleva a la modificación química (desacetilación, por ejemplo), ni a la reducción del peso molecular.

15 **[0030]** De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona una muestra de material del PSA que tiene contenido de endotoxina reducido obtenible por el proceso anterior.

**[0031]** El contenido de endotoxina debe ser reducido a un nivel farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, el contenido de endotoxina de la muestra, tras el proceso de la invención, es menor de 25 EU/mg de material de PSA. Por lo tanto, un tercer aspecto de la invención proporciona una muestra de PSA que comprende un contenido de  
20 endotoxina de 25 EU/mg de material de PSA, o menos, medido usando la prueba LAL. Preferiblemente, el contenido de endotoxina está en el intervalo de 0,05-25 EU/mg de material de PSA. La presente invención proporciona muestras del mismo PSA y del conjugado de PSA (por ejemplo molécula biológica, o conjugado de sistema de administración de fármaco) (en adelante referido como material del PSA) que tiene un bajo contenido de endotoxina.

25 **[0032]** El proceso de la invención es llevado a cabo bajo condiciones que proporcionan rendimientos útiles de PSA. Es posible evitar la contaminación del PSA con ligandos de afinidad como la polimixina B, o policationes como la poli-D-lisina, que son comúnmente usadas en adsorbentes de afinidad diseñados para retirar la endotoxina ya sea omitiendo el uso de tales materiales completamente o usándolos bajo condiciones en las que no tiene lugar una degradación de la matriz (bajo lo que no se puede optimizar la retirada de endotoxina). Este PSA "purificado" puede  
30 ser usado para derivatizar agentes terapéuticos, como las proteínas, y usado en el cuerpo humano sin riesgo de toxicidad por endotoxina.

**[0033]** El nivel de endotoxina es medido usando la prueba LAL como se describe en la Farmacopea Europea 5.0, Apéndice XlVC.  
35

**[0034]** En el paso (i) del proceso, la muestra es añadida a una base que tiene un pKa de al menos 12. Sin restringirse por la teoría, se piensa que la base parte enlaces, probablemente enlaces de éster en la endotoxina, volviéndola inactiva, y/o permitiendo la retirada de los productos de la reacción. Para tener utilidad en el proceso de esta invención la base debe, por lo tanto, ser lo suficientemente fuerte para reaccionar e hidrolizar la endotoxina. Es sorprendente que la concentración de endotoxina es reducida sin destruir sustancialmente el ácido polisialico, por  
40 ejemplo desacetilando los grupos N-acetil o rompiendo las cadenas de ácido polisialico.

**[0035]** Preferiblemente, la base tiene un pKa de la menos 13, más preferiblemente al menos 14. La base preferiblemente forma una solución básica que tiene un pH de al menos 13, más preferiblemente al menos 14. La muestra es típicamente incubada en la base en un regulador adecuado, por ejemplo regulador HEPES, o agua.  
45

**[0036]** Las bases adecuadas para su uso en la presente invención son NaOH, KOH,  $Ca(OH)_2$  y LiOH. Particularmente se prefiere el NaOH. El NaOH a una concentración de 2N es adecuado.

50 **[0037]** El paso (i) es llevado a cabo durante un tiempo que típicamente varía de 5 minutos a 24 horas, preferiblemente de 30 minutos a 5 horas. La temperatura está típicamente en el intervalo de 0° C o 60° C y está preferiblemente de 2° C a 40° C. Mayores temperatura y/o tiempos más largos pueden llevar a la degradación no deseada del mismo PSA.

55 **[0038]** En una realización de la invención, la incubación en el paso (i) se lleva a cabo durante 2 horas a 20° C con agitación constante. El paso (i) puede ser seguido inmediatamente por un paso adicional en el que la muestra es neutralizada. La neutralización puede ser realizada, por ejemplo con HCl, para conseguir un pH de la solución final de alrededor de 7,4.

60 **[0039]** Un método adecuado que hace uso de la cromatografía de intercambio de iones en la que los pasos (iv) y (v) se pueden basar se describe en nuestra Solicitud de Patente anterior WO2006/016161. Este método puede ser adaptado para su uso en la presente invención, donde no es necesario separar el PSA, en esta etapa, en fracciones de diferente peso molecular medio. En ese método del estado de la técnica, el ácido polisialico es separado en fracciones de diferente peso molecular medio. La solución acuosa del PSA se pone en contacto con una resina de intercambio de aniones en una columna por lo que el PSA se absorbe. El PSA es después sometido a una elución selectiva por reguladores de elución acuosos, y el PSA es recuperado de las fracciones eluidas. La elución selectiva  
65

implica lavar la resina en la columna con al menos un regulador de elución. Si se usa más de un regulador de elución, cada uno puede tener diferente fuerza iónica y/o pH, en el que el segundo y los siguientes reguladores tienen mayor fuerza iónica y/o pH que los reguladores del paso inmediatamente anterior. El proceso de fraccionamiento usando el intercambio de iones lleva a una pequeña reducción en el contenido de endotoxina.

**[0040]** En las realizaciones preferidas del proceso de esta invención, la muestra se pasa a través de una columna de intercambio de aniones tras haber sido tratada con la base. La muestra puede necesitar ser preparada antes de ser cargada en la columna, por ejemplo, puede necesitar ser eluida. Al menos algunas de las endotoxinas pasarán a través de la columna y se prefiere que el regulador de carga sea seleccionado de tal forma que el PSA sea completamente adsorbido y al menos alguna endotoxina no sea adsorbida. Más adelante se describen ejemplos de reguladores de carga.

**[0041]** El paso (iv) del método es un paso de lavado, en el que se lava un regulador de elución de baja concentración iónica a través de la columna. Por ejemplo se puede llevar a cabo tal paso de lavado inicial con un regulador que tiene una concentración de sal de 100 mM o menos. Típicamente el regulador de lavado comprende trietanolamina y tiene un pH de alrededor de 7,4. Este paso inicial puede lavar los contaminantes de bajo peso molecular. El paso de lavado puede implicar un volumen de al menos 1, preferiblemente 1,5 volúmenes de columna, en base al volumen de la columna de resina de intercambio de iones. Durante este paso, sustancialmente todo el ácido polisialico permanece en la resina de intercambio de iones. Se puede realizar más de un paso de lavado. El segundo regulador de lavado puede ser idéntico al primero, o alternativamente, comprender un alcohol y/o un surfactante. Ejemplos adecuados de surfactantes son los no iónicos como el PEG, Tween 20 y 80 y el Triton. Los pasos de lavado pueden retirar endotoxina adicional de la columna.

**[0042]** Se debe señalar que una columna de resina de intercambio de aniones puede tener un diámetro de la sección transversal que es mayor que la altura o puede, como en una columna convencional, tener una altura que es mayor que el diámetro de la sección transversal. El volumen puede estar en el rango de 1 a 5000 ml. La altura de la columna puede estar en el intervalo de 1 cm a 5000 cm<sup>2</sup>. La sección transversal puede ser de cualquier forma pero preferiblemente es redonda.

**[0043]** Tras el paso de lavado de la resina de intercambio de aniones, el PSA es eluido usando un regulador de elución. El regulador de elución usado en el paso (v) generalmente tiene una fuerza iónica relativamente más grande que el regulador de lavado, para retirar el PSA de la columna. Típicamente, el regulador de elución comprende NaCl a una concentración de al menos 04M.

**[0044]** Hemos descubierto que se prefiere para el paso de elución de la realización preferida usar al menos 1,0, preferiblemente al menos 1,25 y más preferiblemente al menos 1,5 volúmenes de columna del regulador de elución respectivo. Preferiblemente no se usan más de 3 volúmenes de regulador de elución. El caudal para una matriz de 75 ml es preferiblemente de 7 ml/minuto.

**[0045]** La realización preferida del proceso puede comprender más de uno, por ejemplo al menos 5, por ejemplo tantos como 20 o, generalmente en el intervalo de 6 a 12, pasos secuenciales de elución con reguladores de elución de fuerza iónica sucesivamente cada vez mayor. La fuerza iónica en el primero de estos pasos esenciales está generalmente en el intervalo de 1 mM a 1 M. DE esta manera, el ácido polisialico eluido puede ser fraccionado en muestras que tienen diferente peso molecular medio.

**[0046]** Preferiblemente la fuerza iónica de un regulador de elución varía variando el nivel de una sal de un ácido mineral fuerte y una base mineral fuerte, preferiblemente el cloruro de sodio.

**[0047]** Después de que el paso (v) ha sido realizado, y la solución de producto obtenida, los pasos (i) y (iii) a (v) pueden ser repetidos. Preferiblemente se repiten los pasos (iii)-(v).

**[0048]** El PSA puede ser tratado adicionalmente. Pasos posteriores pueden incluir purificación adicional y/o pasos de concentración. Con respecto a los pasos adicionales, estos generalmente implican pasos en los que el polisacárido es aislado de cualquier sal, por ejemplo usando membranas, por ejemplo membranas de ultra-filtración. Tales pasos pueden adicionalmente permitir que la concentración de PSAs forme soluciones más concentradas. Tales soluciones pueden estar sujetas a pasos adicionales de tratamiento de membrana, por ejemplo ultra-filtración sucesiva u otros pasos de filtración.

**[0049]** El regulador de elución de intercambio de aniones puede contener un ácido o base volátil y en este caso los pasos adicionales pueden implicar la volatilización del base volátil de las fracciones eluidas. A pesar de que es posible recuperar el PSA de las soluciones acuosas por técnicas de precipitación, por ejemplo involucrando no solventes para los PSAs, se prefiere que no se utilicen tales solventes, ya que esto puede hacer el aislamiento final de los solventes respectivos más difícil. Consecuentemente el paso final de recuperación implica preferiblemente la evaporación del agua y, preferiblemente, cualquier componente regulador volátil restante que permanezca de los pasos de elución. En un caso preferido en donde está presente la trietanolamina, el catión de trietanolamina y el anión de acetato son volátiles y pueden ser retirados fácilmente al vacío.

**[0050]** El PSA puede ser finalmente aislado de la solución por secado, preferiblemente bajo presión reducida. Esto es realizado preferiblemente por secado por congelación.

5 **[0051]** La precipitación, usando preferiblemente un no solvente, puede ser llevada a cabo como un paso preliminar para el fraccionamiento para retirar una parte de la población y disminuir la poli-dispersidad de las fracciones de mayor peso molecular. Preferiblemente, se usa la precipitación de etanol diferencial.

10 **[0052]** El proceso puede comprende un paso adicional, ya sea antes del paso (i), entre los pasos (i) y (ii) o después del paso (ii). Este puede implicar la cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC), la cromatografía de afinidad, como la cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC) o la cromatografía de exclusión por tamaño.

15 **[0053]** Una columna HIC adecuada es una en la que la endotoxina es adsorbida pero que no adsorbe el PSA, como el Fenilo FF. El regulador de carga es típicamente sulfato de amonio, cloruro sódico, etc. en agua desionizada, o agua desionizada ajustada a un pH de 7,4.

20 **[0054]** El HIC es llevado a cabo preferiblemente antes del paso (i). De hecho, se cree que esta es la primera divulgación del uso del HIC para la retirada de endotoxina de una muestra de PSA. Es sorprendente que el HIC pueda ser usado para la retirada de la endotoxina sin la co-eliminación del ácido polisialico como el recuperado de un caldo de fermentación, es decir, en la forma de un lipopolisacárido, o viceversa, por ejemplo donde el material del PSA es conjugado para hacerlo más hidrofóbico que la endotoxina. Por la selección apropiada de la columna y de las condiciones la endotoxina será adsorbida a la columna mientras que el material del PSA pasa a través o viceversa, ya sea en la columna de vacío (con regulador de carga) o por la elución con un regulador de elución adecuado. De acuerdo con un aspecto adicional de la invención proporcionamos por lo tanto un nuevo proceso para la reducción del contenido de endotoxina de una muestra que contiene ácido polisialico y endotoxina comprendiendo pasar la muestra a través de una columna de interacción hidrofóbica a la que se adsorbe la endotoxina, por donde pasa el PSA a través de la columna y es recogido para proporcionar una solución de producto de ácido polisialico que tiene un contenido reducido de endotoxina. De acuerdo a todavía otro aspecto adicional de la invención proporcionamos un nuevo proceso para reducir el contenido de endotoxina de una muestra que contiene ácido polisialico y endotoxina que comprende pasar al muestra a través de una columna de interacción hidrofóbica a la que se adsorbe el material del PSA, por donde pasa la endotoxina a través de la columna y el material del PSA es adsorbido, y después el material del PSA es eluido y recogido para proporcionar una solución de ácido polisialico que tiene un contenido de endotoxina reducido. Se prefiere el uso de una columna de fenilo, ya que enlaza a la endotoxina mientras permite que el PSA pase a través de la columna. En la primera realización, tras el paso del volumen de vacío que contiene la endotoxina, la columna puede ser lavada con un regulador de lavado y fracciones de lavado recogidas, que pueden también comprender PSA. La segunda realización es de particular utilidad para purificar conjugados de PSA con proteínas, como las proteínas relativamente hidrofóbicas.

40 **[0055]** Los medios de filtración por afinidad pueden ser usados en el proceso de la presente invención habitualmente tras el paso (ii). Se seleccionan las matrices de afinidad que específicamente atrapan endotoxina. Las condiciones se seleccionan de tal forma que el PSA no es adsorbido cuando se carga la solución. A menudo se prefiere evitar el uso de cromatografía de afinidad específica de la endotoxina, para evitar la contaminación por productos de la degradación de la matriz. Preferiblemente, donde se incluye cualquiera de dichos procesos, las condiciones se seleccionan para evitar dicha degradación. A pesar de que tales condiciones pueden ser seleccionadas a costa de la optimización de la eliminación de endotoxina, cuando se combinan con los pasos esenciales del proceso de la invención en un proceso multipaso el nivel de endotoxina puede ser reducido a niveles aceptables.

50 **[0056]** En una realización de la presente invención, se usa una matriz de afinidad que comprende un agente enlazante de la endotoxina inmovilizado para purificar la muestra del PSA. Un agente adecuado es un gel de polimixina B, en particular Detoxi-Gel™.

55 **[0057]** El gel eliminador de endotoxina Detoxi-Gel™ usa polimixina B inmovilizada para enlazar y eliminar pirógenos de la solución. Las polimixinas son una familia de antibióticos que contienen un ciclopéptido catiónico con una cadena de ácido graso. La polimixina B neutraliza la actividad biológica de las endotoxinas enlazándose a la porción del lípido A del lipopolisacárido bacteriano. Los estudios realizados por Kugler y otros (1985) indican que la polimixina B inmovilizada inactiva algunas, pero no todas, las endotoxinas.

60 **[0058]** El gel de polimixina B inmovilizada es una matriz de afinidad estable que resiste la lixiviación del ligando en la preparación valiosa. El hacer uso de un apoyo de afinidad permite la limpieza fácil de reguladores, medios de cultivo celular, soluciones que contienen macromoléculas como las proteínas, y componentes farmacológicamente importantes. El Gel eliminador de Endotoxina Detoxi-Gel™ también ha sido usado para eliminar endotoxina de muestras ácido nucleico (ADN) (Wicks y otros, 1995).

65 **[0059]** Típicamente, antes de que se use un gel de polimixina B, tiene que ser primero desgasificado. Los geles pueden ser regenerados por lavado, típicamente con un detergente, por ejemplo desoxicolato de sodio, seguido por

un lavado para retirar el detergente. Un agente adecuado para lavar el gel es el agua libre de pirógenos. Una vez generado, el gel es aplicado a la columna y se añaden el regulador, o agua, libre de pirógenos. El tiempo de incubación de la columna es típicamente una hora. Una vez que la muestra ha sido recogida, es típicamente, liofilizada para evitar la contaminación bacteriana.

**[0060]** Una columna Cellufine™ es otro tipo de columna de cromatografía por afinidad, que puede ser usada para reducir el contenido de endotoxina de la muestra de PSA. Dicha columna está típicamente equilibrada con de 2-8, por ejemplo 5 volúmenes de columna de regulador libre de endotoxina, por ejemplo el regulador HEPES (pH 7,4). El HEPES puede también ser usado como regulador de carga. La Cellufine es un material particularmente adecuado para el uso ya que tiene un enlazante no específico bajo del PSA.

**[0061]** Otras columnas de cromatografía por afinidad selectivas de endotoxina comercialmente disponibles son las columnas EndoTrap. Una columna EndoTrap Red™ puede ser también usada para reducir el contenido de endotoxina de la muestra PSA. Dicha columna está típicamente equilibrada con de 5-10, por ejemplo 5 volúmenes de columna de regulador libre de endotoxina, por ejemplo con Regeneration Buffer Red™ y 20mM de regulador HEPES (pH 7,4) o con agua desionizada (pH 7,4). El HEPES o el agua desionizada (pH 7,4) pueden ser usadas también como el regulador de carga.

**[0062]** Se puede usar también una columna EndoTRap Blue™ para reducir el contenido de endotoxina de la muestra de PSA. Dicha columna está típicamente equilibrada con de 5-10, por ejemplo 5 volúmenes de columna de agua desionizada (pH 7,4), suplementada con 50-100  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{+2}$ .

**[0063]** En el proceso de acuerdo al primer aspecto de la invención, la muestra puede ser sometida a medios de purificación adicionales. Por ejemplo, la muestra puede ser sometida a uno o más pasos preliminares de incubación con un surfactante, un agente quelante, una base, un solvente orgánico, un oxidante o una peroxidasa, antes del paso (i), entre los pasos (i) y (ii) o tras el paso (ii).

**[0064]** Preferiblemente, el surfactante es un surfactante aniónico, por ejemplo, dodecil sulfato de sodio (SDS). Alternativamente, el surfactante puede ser 0,5% Triton X 114 o 1% Triton X 100 ó 114. Alternativamente se pueden usar surfactantes catiónicos, por ejemplo compuestos activos de superficie bactericidamente efectivos como el cetiltrimetilamonio, bromuro. Un tiempo de incubación adecuado es 1 hora. Las temperaturas en el intervalo de 0-50° C son adecuadas, a pesar de que se prefiere 35-37° C.

**[0065]** En donde se usa un surfactante no iónico la solución se carga en una columna de intercambio de aniones para la eliminación de los surfactantes no iónicos. Aquí, se puede usar el regulador 20mM TEA.

**[0066]** En una realización de la presente invención, la muestra de PSA se incuba con un 1% de SDS/ 2N NaOH en regulador HEPES durante 1 hora, y después la solución es cargada en una columna para remover la sal y el surfactante aniónico, por ejemplo, una columna GPC, y fraccionada con un regulador adecuado, típicamente con regulador HEPES. Se puede usar una columna pd10 Sephadex 25.

**[0067]** Alternativamente, se pueden usar también otros surfactantes no iónicos que tienen diferentes puntos de enturbamiento al del Triton, como el Tween 20 y el Tween 80, para reducir el contenido de endotoxina de la muestra de PSA. La muestra de PSA se incuba en 0,1% de Tween 80 durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después la solución se carga en una columna de intercambio de aniones con un regulador adecuado e agua desionizada (pH 7,4) para la eliminación de los surfactantes. La columna se lava extensivamente con agua y regulador (pH 7,4) para eliminar el surfactante.

**[0068]** En realizaciones el proceso incluye un paso de oxidación. Este paso se pretende que oxide la unidad final de ácido polisialico para volverlo reactivo, por ejemplo con proteínas o péptidos. Simultáneamente puede llevar a una reducción en el contenido de endotoxina y por lo tanto ser un paso útil para conseguir el objetivo general de reducción de endotoxina. Los oxidantes adecuados son el peryodato de sodio, superóxido, hipoclorito y la peroxidasa.

**[0069]** El proceso de la invención puede comprender el uso de la extracción de fase, la precipitación por diafiltración y/o el uso de calor seco antes del paso (i) o tras el paso (ii). Cuando se usa el calor seco, típicamente la muestra de PSA se calienta en un frasco a una temperatura en el intervalo de 100-200° C, más preferiblemente alrededor de 150° C durante 1-6 horas, típicamente alrededor de 4 horas. Estas condiciones no desactivan o degradan el PSA.

**[0070]** La diafiltración puede ser usada posteriormente a la incubación de la muestra del PSA con un surfactante, o alternativamente, usada independientemente del tratamiento con surfactante. El filtro debe ser lo suficientemente pequeño para mantener al menos el PSA de mayor peso molecular mientras que permite que la endotoxina pase a través. Un aparato típico de ultrafiltración con un cierre de 5 kDa para proteínas globulares tiene poros lo suficientemente grandes para permitir el paso de la endotoxina (-10.000 Da) mientras mantiene los PSAs de -20.000 y más altos. Un paso de diafiltración es usado preferiblemente tras el tratamiento básico, por ejemplo como parte del paso de recuperación (ii).



**[0071]** El proceso de la presente invención proporciona al PSA con un contenido reducido de endotoxina a niveles farmacéuticamente aceptables, para el uso en humanos y veterinario. Idealmente, el contenido de endotoxina del PSA de producto es menor de 25 EU/mg PSA. Preferiblemente, el contenido de endotoxina del PSA está en el intervalo de 0,05-25 EU/mg.

**[0072]** La presente invención puede ser de utilidad para producir conjugados de PSA que tienen un contenido bajo de endotoxina. En un conjugado de PSA preferiblemente la fracción conjugada es preferiblemente una molécula biológica, más preferiblemente una proteína. Los conjugados proteicos de PSA pueden ser producidos por una variedad de métodos, en particular ver nuestras Solicitudes de Patente anteriores WO-A-0187922 y WO092/22331. El proceso de acuerdo al primer aspecto de la invención es generalmente inadecuado para los conjugados de moléculas biológicas de PSA ya que la base típicamente daña la fracción biológica, es decir cualquier conjugación no llevada a cabo antes del paso (i). En un cuarto aspecto de la invención se proporciona un proceso que comprende los pasos secuenciales de:

(v) la mezcla de endotoxina - conjugado de PSA se pone en contacto con un surfactante no iónico durante un tiempo predeterminado a una temperatura predeterminada;

(vi) la muestra tratada con surfactante se pasa a través de una columna de intercambio de aniones mediante la cual el conjugado de PSA es adsorbido en la columna

(vii) el conjugado de PSA es eluido de la columna usando un regulador de elución para producir una solución de conjugado de PSA que tiene un contenido reducido de endotoxina.

**[0073]** Ejemplos de surfactantes no iónicos para ser usados en este aspecto son por ejemplo los compuestos PEG, sorbitán momoelato Tween 20/80 o un miembro de la serie Triton. De nuevo, sin desear restringirse por la teoría, se cree que el surfactante reduce los niveles de endotoxina interrumpiendo la formación de micela de la endotoxina, o disolviendo la endotoxina.

**[0074]** El producto del cuarto o del primer aspecto de la invención puede ser una composición farmacéutica, en cuyo caso, el contenido de endotoxina debe ser lo suficientemente bajo par evitar efectos secundarios tóxicos cuando la composición se administra a un humano o a un animal. La composición puede ser una composición farmacéutica humana o veterinaria.

**[0075]** Típicamente, las muestras de PSA, antes de la purificación, es decir, el material de partida del paso (i) del primer aspecto y el paso (v) del cuarto aspecto tiene un contenido de endotoxina en el intervalo de 1000-200.000 EU/mg. Para ser farmacéuticamente aceptable, el contenido final de endotoxina de la muestra no debe ser mayor de 25 EU/mg. El contenido de endotoxina permisible depende del uso pretendido del PSA. Si el PSA se va a usar para derivatizar una proteína que se va a usar como un medicamento, el contenido de endotoxina permisible varía con la dosis de proteína que se va a usar como un medicamento – dosis más altas requieren típicamente una eliminación más rigurosa de la endotoxina.

**[0076]** Para los conjugados de proteína de PSA usados en composiciones farmacéuticas con una dosis humana (veterinaria) de 10-500 mg, el contenido de endotoxina no debe ser mayor de 0,5 EU/mg, y preferiblemente está en el intervalo de 0,05-0,5 EU/mg. Para conjugados de proteína de PSA con una dosis humana de 1-10 mg, el contenido de endotoxina no debe ser mayor de 5 EU/mg, y está preferiblemente en el intervalo de 0,5-5 EU/mg. Par conjugados de proteína con una dosis humana de hasta 1000 µg, el contenido de endotoxina no debe ser mayor de 25 EU/mg, y está preferiblemente en el intervalo de 5 a 25 EU/mg.

**[0077]** En la invención la muestra que contiene endotoxina y el PSA está convenientemente en un caldo de fermentación. El caldo de fermentación puede ser producido recombinantemente o ser un caldo microbiano productor de PSA de origen natural, un producto de la hidrólisis de los mismos o un derivado fraccionado de cualquiera de ellos. Los microbios pueden ser *E coli K1*, *Neisseria meningitidis*, o *Moraxella liquefaciens*. Típicamente, el proceso de acuerdo al primer aspecto de la invención comprende un paso preliminar en el que los microbios se fermentan para producir un caldo de fermentación. El PSA puede ser un poli(2,8-enlazado ácido siálico), poli(2,9-enlazado ácido siálico) o un PSA alternando 2,8-2,9 enlazado. Preferiblemente, el PSA es ácido colomínico (CA) o un derivado, oxidado, reducido, aminado y/o hidrazina de los mismos.

**[0078]** El PSA típicamente tiene al menos 2, preferiblemente al menos 5, más preferiblemente al menos 10, por ejemplo al menos 50 unidades sacáridas. Típicamente, los PSAs de más utilidad tienen un peso molecular medio de hasta 100 kDA.

**[0079]** El PSA se puede derivar de cualquier fuente, preferiblemente una fuente natural como una fuente bacteriana, por ejemplo *E. coli* K1 o K92, meningococci grupo B, o incluso leche de vaca o N-CAM. El polímero de ácido siálico puede ser también un polímero heteropolimérico como el grupo 135 o el grupo V de la *N. meningitidis*, o puede ser sintetizado por ejemplo, enzimáticamente. El PSA puede ser un copolímero de bloque, como un conjugado o un homo poli(ácido siálico) con un bloque de otro polímero de origen natural o polímero sintético. El PSA puede estar en la forma de una sal o de ácido libre. Puede estar en forma hidrolizada, de tal forma que el peso molecular ha sido reducido después de la recuperación de una fuente bacteriana. El PSA en el material de partida para un proceso de la invención puede ser material que tiene una amplia extensión de pesos moleculares tales como tener una

polidispersidad de más de 1,3, por ejemplo tanto como 2 o más. Preferiblemente la polidispersidad del peso molecular es menor de 1,2, más preferiblemente menos de 1,1, por ejemplo tan baja como 1,01.

5 [0080] La derivatización de proteínas y sistemas de administración de fármacos con el PSA purificado puede resultar en una vida media aumentada, estabilidad mejorada, inmunogenicidad mejorada y/o control de la solubilidad y por lo tanto biodisponibilidad y propiedades farmacocinéticas, o puede mejorar los activos de solubilidad o la viscosidad de soluciones que contienen el activo derivatizado.

10 [0081] Preferiblemente los PSAs del producto final de los aspectos del proceso de la invención y de los nuevos productos tienen 2-1000 unidades de ácido siálico, por ejemplo 10-500, más preferiblemente de 10 a 50 unidades de ácido siálico. Preferiblemente, la polidispersidad del PSA será menor de 2, idealmente menor de 1,2, e idealmente en el intervalo de 1,01 a 1,10.

15 [0082] Los métodos de purificación usados en la presente invención reducen ventajosamente la polidispersidad del PSA, además de reducir el contenido de endotoxina.

20 [0083] El contenido de endotoxina de una muestra de PSA se reduce por el proceso de la invención en al menos 5 veces, preferiblemente al menos 10 veces, más preferiblemente al menos 100, 200, 500 veces y en algunas realizaciones hasta 1000, 10.000, 100.000 o incluso 1 millón de veces. Preferiblemente el tratamiento base y la recuperación reduce el contenido de endotoxina al menos 5 veces. La reducción total por los pasos preliminares y los múltiples pasos de recuperación de PSA pueden llevar a una reducción de al menos  $10^5$  veces. Generalmente la combinación de los pasos de recuperación se selecciona de tal manera que la reducción de endotoxina se maximiza mientras que la recuperación de PSA se maximiza por el uso de pasos que son complementarios entre sí en términos de eliminación de la fracción de endotoxina.

25 [0084] La sección "Ensayo para Endotoxina" (prueba LAL) de los Ejemplos describe como se puede medir el contenido de endotoxina.

### 30 Ejemplos

#### Ensayo par Endotoxina de Referencia

35 [0085] Para realizar el ensayo para endotoxina, se usó el Endofase-PTS (Sistema de Prueba Portátil) de Charles River Laboratories. Este está basado en el ensayo LAL (Lisato de Amebocitos de Limulus).

#### Funcionamiento del Instrumento

40 [0086] Toda la información requerida se introdujo en el lector. Una vez que toda la información de la prueba se había introducido el lector mostró "añadir muestra; presionar enter". Las muestras de PSA fueron preparadas, a menos que se especifique lo contrario a 1 mg/ml en de regulador 20 mM TEA a pH 7,4. 25  $\mu$ L de la muestra fueron puestos en una pipeta en cuatro depósitos de muestra y la tecla enter fue presionada en el lector. La bomba extrajo las alícuotas de la muestra en el canal de prueba y los resultados se produjeron en 15-20 minutos. Cuando la prueba estaba completa el instrumento mostró la medición de endotoxina y los criterios de aceptación del ensayo en la pantalla. El instrumento dio las siguientes especificaciones: Muestra EU/mL, muestra%CV, pico%CV y % de recuperación del pico.

#### Ejemplo 1 – Reducción de Endotoxina Usando hidróxido de Sodio

50 [0087] Se preparó una solución de 6 mg/ml de ácido colomínico contaminado con endotoxina (31 kDa no oxidado) en 0,5M de regulador NaOH Hepes y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después 0,5 ml de solución se cargaron en una columna de desalación de cromatografía de exclusión por tamaño y la fracción recogida fue desechada. La columna fue después lavada con 2,5 ml de regulador HEPES y la fracción fue recogida seguido por la recogida de otra fracción de 2 ml con regulador HEPES. Las fracciones de la elución recogidas fueron después analizadas par el contenido de ácido colomínico por análisis de resorcinol. Las fracciones que contenían ácido colomínico fueron después agrupadas y fueron analizadas para su contenido de endotoxina. Las muestras fueron probadas para el grado de desacetilación del PSA.

60 [0088] Hubo una reducción de 53 veces en el contenido de endotoxina usando NaOH y no hubo un grado detectable de desacetilación. Tampoco hay ninguna rotura del CA observada en la PAGINA usando NaOH y SDS.

#### Ejemplo 2 – Reducción de endotoxina por intercambio de aniones tras la base

65 [0089] Se midió una muestra tomada directamente del fermentador *E. coli* K1 (1 mg/ml) en 20mM de regulador TEA (pH 7,4) y se encontró que era de más de  $10^5$  EU/mg. Después se añadió NaOH a la solución de PSA para hacer la normalidad final de 2N NaOH en la solución de muestra de PSA y después se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con un mezclador suave. Se registro el pH de la solución. La columna HiTrap QFF (1 ml) fue

5 lavada con 10 volúmenes de columna de agua desionizada (pH 7,4) y después se equilibró la columna usando 10 volúmenes de columna de 20mM TEA. La conductividad de la solución de la muestra fue medida y diluida apropiadamente para igualar la conductividad de la solución del regulador. La solución de la muestra fue después cargada en QFF (1 ml de columna) a la tasa de 1 ml/min y el volumen de vacío (-1/3 del volumen de la columna) fue recogido separadamente. La columna fue después lavada con 20 mM TEA y se recogió cada fracción lavada de 1 ml. La muestra fue después eluida con 1M NaCl en 20mM TEA y se recogieron las fracciones. Se realizó el análisis de resorcinol de las muestras de la elución para calcular la cantidad de ácido colomínico presente en las muestras y se determinó el contenido de endotoxina de las muestras de la elución agrupadas que contenían ácido colomínico. Se descubrió que el nivel de endotoxina del producto se había reducido a 1407 EU/mg, es decir, más de 71 veces. La recuperación del PSA fue del 91%.

10 [0090] El tratamiento con la base y la recuperación por intercambio de aniones se repitieron tomando el producto anterior y se observó una reducción adicional en el contenido de endotoxina, hasta menos de 300, es decir, una reducción adicional de 5 veces.

15 **Ejemplo 3 – Reducción en endotoxina por intercambio básico/aniones seguido por surfactante no iónico e intercambio de aniones**

20 [0092] Se trató el producto de la solución del ácido colomínico de un caldo de fermentación diferente por la base por el proceso del Ejemplo 2 y después fue tratado con TRiton X 114 de la siguiente manera, después con intercambio de aniones.

25 [0093] Se preparó una solución de 1% de Triton X 114 y fue añadida a la solución de PSA en la cantidad apropiada para hacer la concentración final de 0,5% de Triton X 114. La solución se vuelve turbia a temperatura ambiente (25° C). Para volver la solución clara, se mantuvo en hielo durante 10-15 minutos. De nuevo la solución se mantuvo a temperatura ambiente durante 20 minutos para volverla turbia. La solución turbia fue centrifugada y se separaron dos capas: la capa superior que contenía el PSA y la capa inferior de Triton X 114 que contenía la endotoxina. La capa superior fue mantenida para cargarla en la columna QFF. La columna HiTrap QFF se preparó, se cargó, se lavó y se eluyó como en el Ejemplo 4.

30 [0094] En este caso el nivel de endotoxina se redujo de sobre  $10^5$  a alrededor de  $4,4 \times 10^3$  EU/mg en el primer paso del tratamiento básico y  $8,2 \times 10^2$  EU/mg adicionales tras el segundo paso del surfactante y el intercambio de aniones.

### 35 REFERENCIAS

[0095] Bishop, R.E., en Russell W, Herwald H (eds) Concepts in Bacterial Virulence: Contrib Microbiol Basel, Karger, 12 (2005) 1-27.

40 [0096] Bendel, A., Seely, J., Richey, C., Sennello, G., Shopp, G., Renal tubular vacuolation in animals treated with polyethylene-glycol conjugated proteins, Toxicological sciences, 42 (1998) 152-157.

45 [0097] Beranova, M., Wasserbauer, r., Vancurova, D., Stiffer, M., Ocenaskova, J., Mora, M., Biomaterials, 11 (2000) 521-524.

[0098] Cheng T, Wu, M., Wu, P., Chern, J, Roffer, SR., Accelerated clearance of polyethylene glycol modified proteins by anti-polyethylene glycol IgM. Bioconjugate chemistry, 10 (1999) 520-528.

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

- 5 1. El proceso para reducir el contenido de endotoxina de una muestra que contiene ácido polisialílico y endotoxina que comprende los pasos secuenciales de:
- (i) Añadir a la muestra una base que tiene un pKa de al menos 12 para formar una solución básica que tiene un pH de al menos 12, incubar la solución durante un tiempo a una temperatura; y
- (ii) recuperar el ácido polisialílico que tiene un contenido de endotoxina reducido.
- 10 2. El proceso de acuerdo a la reivindicación 1 en donde la base tiene un PKA de al menos 13.
3. El proceso de acuerdo a la reivindicación 1 ó 2 en donde el pH de la mencionada solución básica es de al menos 13.
- 15 4. El proceso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la base es NaOH, KOH, Ca(OH)<sub>2</sub> o LiOH.
5. El proceso de acuerdo a la reivindicación 4 en donde la base es 2N NaOH.
- 20 6. El proceso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el tiempo mencionada varía de 5 minutos a 24 horas y donde la mencionada temperatura está en el intervalo de 0° a 60° C.
7. El proceso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el paso (ii) incluye los siguientes subpasos secuenciales:
- 25 (iii) pasar la muestra a través de una columna de intercambio de aniones por lo que el ácido polisialílico es adsorbido en la resina de intercambio de iones.
- (iv) lavar la columna con un regulador de lavado, por lo que el ácido polisialílico permanece adsorbido en la resina de intercambio de iones; y
- 30 (v) eluir el ácido polisialílico de la columna usando un regulador de elución para proporcionar una solución de producto de ácido polisialílico que tiene un contenido de endotoxina reducido.
8. Un proceso de acuerdo a la reivindicación 7, en donde la muestra, tras el paso (i), es neutralizada antes del paso (ii).
- 35 9. El proceso de acuerdo a la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en donde en el paso (iv), la columna se lava en un primer paso con un primer regulador de lavado de baja fuerza iónica para eluir la endotoxina de la columna y en donde el regulador de elución usado en el paso (v) tiene una fuerza iónica más alta.
- 40 10. el proceso de acuerdo a la reivindicación 9, en donde el mencionado regulador de lavado y/o el mencionado regulador de elución contiene una base volátil.
11. El proceso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en donde en el paso (iv) la columna se lava más de una vez.
- 45 12. El proceso de acuerdo a la reivindicación 11, que comprende lavar la columna con un segundo regulador de lavado, que comprende NaCl a una concentración de al menos 0,2 M.
- 50 13. El proceso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12 en donde los pasos (i) y (iii) a (v) son repetidos en la solución del producto.
14. El proceso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende al menos un paso adicional en el que el nivel de endotoxina del ácido polisialílico se reduce por la purificación llevada a cabo ya sea antes del paso (i), entre los pasos (i) y (ii) o tras el paso (ii) seleccionada de cromatografía de intercambio de iones, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía por afinidad, cromatografía por exclusión de tamaño o combinaciones de las mismas.
- 55 15. El proceso de acuerdo a la reivindicación 14, en donde la cromatografía de interacción hidrofóbica se lleva a cabo antes del paso (i)
- 60 16. El proceso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la muestra de ácido polisialílico ya sea antes del paso (i), entre los pasos (i) y (ii) o tras el paso (ii), se incuba con un surfactante, un agente quelante, un solvente orgánico, un oxidante o una peroxidasa.
- 65 17. El proceso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende un paso preliminar en el que el *E. coli* se fermenta para producir un caldo de fermentación que contiene el ácido polisialílico y la endotoxina,

opcionalmente comprendiendo los pasos intermedios de retirar la proteína, el lípido, el ácido nucleico y/o los nutrientes, para formar la mencionada muestra.

- 5     **18.** El proceso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el contenido de endotoxina del ácido polisiálico en la solución del producto no es más de 25 EU/mg de ácido polisiálico, medido por la prueba LAL.
- 19.** El proceso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la muestra contiene conjugado de ácido polisiálico-proteína y endotoxina.
- 10    **20.** El proceso de acuerdo a la reivindicación 19 en donde el contenido reducido de endotoxina no es más de 5 EU/mg.
- 21.** El proceso de acuerdo a la reivindicación 20 en donde el contenido reducido de endotoxina no es más de 0,5 EU/mg.
- 15    **22.** El proceso para preparar un conjugado de molécula ácido polisiálico-biológica, que comprende reducir el contenido de endotoxina de una muestra que contiene ácido polisiálico de acuerdo al proceso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores y conjugar el ácido polisiálico obtenido con la molécula biológica.
- 20    **23.** El proceso de acuerdo a la reivindicación 22, en donde la molécula biológica es una proteína.