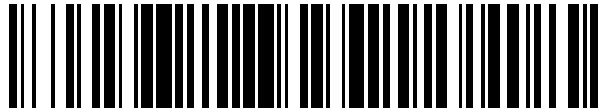


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 516**

51 Int. Cl.:

A61K 39/10 (2006.01)

C12P 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2003 E 03815086 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2012 EP 1578442**

54 Título: **Procedimiento de aislamiento de endotoxinas**

30 Prioridad:

09.12.2002 FR 0215555

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

07.03.2013

73 Titular/es:

**UNIVERSITE PARIS SUD 11 (100.0%)
150RUE GEORGES CLÉMENCEAU
91405 Orsay Cedex, FR**

72 Inventor/es:

CAROFF, MARTINE

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 397 516 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de aislamiento de endotoxinas

5 La invención tiene como objeto un nuevo procedimiento de extracción de endotoxinas a partir de bacterias, en particular de bacterias Gram negativas, así como el uso de este procedimiento para preparar composiciones que comprenden las endotoxinas o sus derivados y destinadas al uso humano o animal (uso científico, médico...).

Las endotoxinas son potentes estimuladores del sistema inmunitario (inducción de interleuquinas, TNF, NO...). Son
10 los constituyentes principales de las membranas externas de las bacterias Gram negativas. Las endotoxinas son mezclas de lipopolisacáridos o LPS.

Entre las colonias bacterianas se distinguen principalmente dos categorías: las llamadas de tipo S, por "smooth" (lisas), que se refiere al aspecto liso de la colonia; las llamadas de tipo R, por "rough" (rugosas), cuyo término se
15 refiere a la morfología rugosa de la colonia. Existe también una tercera categoría llamada SR por "semirough" (semirrugosa).

La estructura de los LPS que constituyen las endotoxinas bacterianas es diferente según se trate de bacterias de tipo R o S. Los LPS están constituidos por un dominio lipídico, llamado lípido A y una cadena de polisacárido,
20 llamada núcleo, unida al lípido A.

Los LPS de tipo S constan además de una cadena antigénica llamada de tipo O. Los LPS de tipo R no constan de esta cadena antigénica de tipo O. Los LPS de tipo SR constan de una sola unidad de la cadena antigénica de tipo O.

25 La presente invención se refiere más en particular al aislamiento de endotoxinas a partir de un cultivo bacteriano de tipo R, y en su caso, de tipo S-R. Sin embargo, también se puede aplicar a cultivos bacterianos de tipo S.

En los procedimientos de la técnica anterior, las endotoxinas bacterianas se aislaban por extracción mediante una mezcla de disolventes que podía ser una mezcla de fenol y agua o una mezcla de cloroformo, éter de petróleo y
30 fenol. Estos procedimientos presentan el grave inconveniente de usar disolventes tóxicos y por lo tanto conllevan riesgos sanitarios para las personas que los manejan. También existe un procedimiento de extracción con ácido tricloroacético, sin embargo, este procedimiento implica demasiada contaminación para ser considerado satisfactorio.

35 Además, los restos de disolventes tóxicos en los extractos bacterianos de endotoxinas hacen que no sean adecuados para la administración humana o animal así como para el uso en experimentos científicos. Por último, la eliminación de estos residuos de disolventes tóxicos constituye una etapa difícil y costosa del procedimiento de la técnica anterior.

40 El documento de Caroff, M. y Karibian, D. "Several uses for Isobutyric Acid-Ammonium Hydroxide solvent in endotoxin analysis" *Applied and Env. Microbiol.* 56: 1957-1959 (1990), describe el uso de una mezcla de disolventes de ácido isobutírico y NH₄OH molar (5:3), para determinar la pureza de endotoxinas bacterianas por cromatografía, así como para diferenciar las endotoxinas bacterianas procedentes de diferentes cepas.

45 Este documento describe también un procedimiento de purificación de endotoxinas naturales a partir de endotoxinas aisladas siguiendo uno de los procedimientos tradicionales de extracción con fenol en una primera etapa. En la segunda etapa de este procedimiento, las endotoxinas se purifican por extracción con una mezcla de disolventes de ácido isobutírico / NH₄OH molar (5:3).

50 El extracto se centrifuga y se recupera el líquido sobrenadante.

Se evaporan los disolventes. La endotoxina se recupera por trituración con etanol.

Por la lectura de este documento, el experto en la materia comprenderá que la extracción con fenol constituye la
55 primera etapa ineludible de cualquier procedimiento de aislamiento de endotoxinas bacterianas.

El documento de Thérísod, H., Labas, V. y Caroff, M. "Direct microextraction and analysis of rough-type lipopolysaccharides by combined thin-layer chromatography and MALDI mass spectrometry". *Anal. Chem.* 73: 3804-3807 (2001), describe un procedimiento de aislamiento de endotoxinas bacterianas, directamente a partir de

bacterias, por cromatografía en placa de sílice, usándose como eluyente la mezcla de disolventes de ácido isobutírico / NH₄OH (5:3).

Sin embargo, la cromatografía en placa de sílice y la extracción con disolventes, son dos técnicas de separación
5 muy distintas y no existe una correlación entre los resultados obtenidos por estas dos técnicas.

Además, los autores de la invención han descubierto sorprendentemente un procedimiento nuevo de aislamiento de endotoxinas (o lipopolisacáridos) bacterianas directamente a partir de bacterias.

10 El procedimiento de acuerdo con la invención se caracteriza porque:

- el producto de partida es un conjunto de células bacterianas, o un líquido sobrenadante de cultivo;

- en una primera etapa, las células bacterianas o el líquido sobrenadante de cultivo, se suspenden en una mezcla de
15 disolventes constituida por:

- de 10 a 90%, preferiblemente de 30 a 70%, de un disolvente elegido de: ácidos alifáticos lineales o ramificados que comprenden de 3 a 6 átomos de carbono,
- 20 - de 90 a 10%, preferiblemente de 70 a 30%, de una disolución acuosa básica de una amina alifática que comprende de 0 a 12 átomos de carbono,
- y el conjunto se agita para dar una disolución en la que las partículas están en suspensión,

- en una segunda etapa, las partículas en suspensión se separan de la disolución:

- 25 - sea por filtración de la composición,
- sea por centrifugación y recuperación del líquido sobrenadante,
- sea por centrifugación seguida de filtración del líquido sobrenadante;

- en una tercera etapa, los disolventes se eliminan del líquido sobrenadante o del filtrado por cualquier medio
30 conocido por el experto en la materia tal como, en particular: diálisis, filtración/lavado, precipitación de los LPS, por ejemplo, por adición de etanol.

El procedimiento de acuerdo con la presente invención, presenta numerosas ventajas en relación con los procedimientos de la técnica anterior. Es rápido: la extracción de las endotoxinas se hace en 12 a 24 horas o menos,
35 mientras que en los procedimientos de extracción con fenol, la etapa de extracción duraba al menos una semana.

Este método no usa sílice, es más sencillo llevar a cabo, en particular a escala industrial.

Este método no usa disolventes tóxicos, por lo tanto no es peligroso para las personas que lo llevan a cabo.

40 Es muy selectivo.

Los rendimientos son de 2 a 10 veces mayores que los obtenidos por los métodos de la técnica anterior para las bacterias ya ensayadas.

45 Los tratamientos enzimáticos habituales con ADNasa, ARNasa y proteasa, usados normalmente para eliminar los contaminantes de ADN, ARN, péptidos y proteínas residuales, en general no son necesarios.

Además, la ausencia de disolventes tóxicos, la rapidez y los buenos rendimientos del procedimiento de la invención
50 permiten contemplar su extrapolación a la escala industrial.

Por último, numerosos artículos recientes demuestran que algunos LPS comercializados actualmente y obtenidos por extracción en un sistema de fenol/agua, son portadores de contaminantes que los convierten en inutilizables en experimentos científicos. Los LPS obtenidos por el procedimiento de la invención presentan la ventaja de no ser
55 portadores de contaminantes.

Entre los ácidos alifáticos que se pueden usar en la presente invención, se elige preferiblemente un ácido ramificado. Se prefieren los ácidos alifáticos que comprenden 4 átomos de carbono, tales como los ácidos butírico e isobutírico. El ácido alifático usado preferiblemente en la presente invención es el ácido isobutírico.

Entre las aminas alifáticas que se pueden usar en la presente invención, se pueden citar en particular: amoniaco, diisopropiletilamina, trietilamina. Se elige preferiblemente amoniaco o trietilamina. Las aminas alifáticas se usan en disolución acuosa en una concentración de 5 a 20%, preferiblemente, una concentración de aproximadamente 10%.

5

La composición que resulta de la primera etapa es una composición heterogénea que consta por una parte de partículas de restos celulares en suspensión, por otra parte de las endotoxinas bacterianas en disolución en la mezcla de disolventes.

10 La eliminación de las partículas de restos celulares por filtración y/o centrifugación permite aislar las endotoxinas.

Si se desea purificar las endotoxinas de posibles restos contaminantes, se puede extraer la composición procedente de la tercera etapa del procedimiento de la invención (dializado o precipitado de LPS que se vuelve a recoger en agua) mediante metanol o una mezcla de cloroformo y metanol para eliminar, en particular, los restos fosfolipídicos o

15 lipoproteicos contaminantes.

Según el uso que se desee, se pueden conservar las endotoxinas procedentes del procedimiento de la invención en disolución acuosa, o liofilizarlas con el fin de almacenarlas en forma de polvo, teniendo la ventaja esta última solución de facilitar su manipulación y su dosificación.

20

Las células bacterianas usadas como producto de partida son preferiblemente células Gram negativas. Sin embargo, se puede considerar igualmente el uso del procedimiento de acuerdo con la invención para purificar otros fosfoglicanos o lipoglicanos aislados de otros tipos de bacterias, en particular con fines de vacunas.

25 Las células usadas preferiblemente en el procedimiento de la invención son: *Bordetella pertussis*, *Escherichia Coli*, *Bordetella parapertussis*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Haemophilus*.

Las células bacterianas en general se obtienen por centrifugación de un medio de cultivo y recuperación del sedimento bacteriano. Sin embargo, durante esta operación de centrifugación se puede recuperar un líquido sobrenadante que puede ser rico en lipopolisacáridos y puede constituir un producto de partida para la aplicación del

30

Las mezclas de disolventes usadas preferiblemente son: ácido isobutírico y amoniaco en disolución acuosa molar o trietilamina en disolución acuosa al 10% (porcentaje en volumen).

35

Preferiblemente, se usa una mezcla de ácido isobutírico y amoniaco en disolución acuosa molar en una relación en volumen de 5/3, o una mezcla de ácido isobutírico y trietilamina en disolución acuosa al 10% en una relación volumétrica de 5/3.

40 Ventajosamente, la agitación correspondiente a la primera etapa del procedimiento de la invención dura de 5 a 15 min. Todavía más ventajosamente de 10 a 15 min.

Preferiblemente, la filtración se hace sobre un soporte con una porosidad de 0,1 a 2 μm .

45 Todavía más preferiblemente, de 0,2 a 0,45 μm .

Cuando se centrifuga la mezcla procedente de la primera etapa, esta centrifugación se hace preferiblemente en las siguientes condiciones: de 1500 a 3000 g, durante 10 a 20 min a temperatura ambiente. Preferiblemente 2000 g durante aproximadamente 15 min.

50

El procedimiento de acuerdo con la presente invención permite obtener las endotoxinas de forma rápida, con rendimientos muy buenos y sensiblemente exentas de contaminantes biológicos o de disolventes. Todas estas propiedades permiten considerar aplicaciones que hasta ahora difícilmente se podían llevar a cabo.

55 En concreto, la preparación de composiciones destinadas a la administración humana o animal. Debido a la toxicidad de los disolventes usados en la técnica anterior y a las dificultades de purificación que conllevan, dichas aplicaciones no eran factibles. Gracias al procedimiento de la invención, ahora se pueden preparar composiciones, en particular composiciones terapéuticas, que se pueden administrar a seres humanos o animales (siempre que las propias moléculas no sean tóxicas) por cualquier vía: oral, inyección, aplicación sobre la piel o las mucosas.

En particular, gracias a este procedimiento, se pueden preparar composiciones de vacuna que comprenden endotoxinas o derivados de endotoxinas, a escala industrial.

- 5 Entre los derivados de endotoxinas se pueden citar, en concreto, endotoxinas detoxificadas, fragmentos de endotoxinas, endotoxinas conjugadas con otras moléculas, en particular con proteínas.

El uso de endotoxinas para preparar composiciones de vacunas se cita en particular en el documento EP-976402.

- 10 Por lo tanto, la invención tiene también como objeto un procedimiento para preparar una composición que comprende una o varias endotoxinas o derivados de endotoxinas, tales como, en concreto, fragmentos de endotoxinas, endotoxinas detoxificadas, destinadas a la administración humana o animal, caracterizado porque comprende una etapa de aislamiento de las endotoxinas como la descrita anteriormente. En un segundo paso, las endotoxinas aisladas se incorporan a un vehículo adecuado, en particular un vehículo farmacéutico adecuado. Se pueden acondicionar también directamente en vistas a una preparación extemporánea de la composición destinada a la administración humana o animal.

Las endotoxinas pueden también comercializarse directamente para uso científico.

20 Parte experimental:

Se ponen células en cultivo siguiendo un método descrito por Di Fabio, J.L.; Caroff, M., Karibian, D.; Richards, J. C. y Perry, M. B. *FEMS Microbiol. Lett.* 1992, 76: 275-281.

- 25 El experto en la materia sabe adaptar las condiciones de cultivo en función del tipo celular implicado.

- Se suspende 1 gramo de células liofilizadas (o el equivalente de sedimento bacteriano húmedo) en 50 ml de una mezcla de ácido isobutírico y NH₄OH molar (5:3) y se agita suavemente mediante agitación magnética durante 5 min. La mezcla se centrifuga a 2000 g durante 15 min a temperatura ambiente. El líquido sobrenadante clarificado que contiene la endotoxina se filtra sobre filtro de fibra de vidrio (Whatman GF/D), y se diluye con 3 volúmenes de agua destilada y dializada. Si es necesario, se puede realizar una segunda extracción del sedimento. El retenido de la diálisis se filtra sobre filtro de fibra de vidrio en las mismas condiciones que antes, después se liofiliza, y se extrae con una mezcla de cloroformo y metanol (1:2) para eliminar los posibles contaminantes de fosfolípidos. Después se liofiliza el residuo de la extracción. Las dos etapas de filtración se pueden realizar sobre vidrio sinterizado (16-40 µm) recubierto de filtro de fibra de vidrio y se puede aplicar un vacío parcial para acelerar el procedimiento siempre que se controle la calidad del filtrado por CCF.

El rendimiento es de 2 a 10% según las bacterias.

- 40 La extracción se realiza en 24 h. Esta duración se puede reducir a algunas horas mediante procedimientos de diálisis por filtración, aplicables a escala industrial.

- Estos ensayos se han realizado con éxito con bacterias del género *Bordetella* (*B. pertussis*, agente de la tos ferina, y otras bacterias del mismo género bacteriano responsables de infecciones respiratorias). Este método también se ha ensayado con células de *Escherichia coli* K 12 y de *Neisseria meningitidis*.

Cuando las bacterias constan de polisacáridos capsulares en gran cantidad, puede ser ventajoso eliminarlos por lavado de las células antes de proceder a la extracción.

- 50 En la figura 1 se ilustra una comparación de las endotoxinas obtenidas a partir de *Bordetella pertussis* por el presente método (es decir, isobutírico) y el método con fenol-agua, que representa una cromatografía en capa fina comparativa de las endotoxinas aisladas por estos dos procedimientos. Una comparación por SDS-PAGE, CCF y espectrometría de masas, ha permitido verificar la eficacia del método y la integridad de las endotoxinas.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de aislamiento de lipopolisacáridos **caracterizado porque**:
- 5 - el producto de partida es un conjunto de células bacterianas, o un líquido sobrenadante de cultivo;
- en una primera etapa, las células bacterianas o el líquido sobrenadante del cultivo, se suspenden en una mezcla de disolventes constituida por:
- 10 - un disolvente elegido entre: ácidos alifáticos lineales o ramificados que comprenden de 3 a 6 átomos de carbono,
- una disolución acuosa básica de una amina alifática que comprende de 0 a 12 átomos de carbono, en una relación volumétrica de 1/9 a 9/1,
- y el conjunto se agita para dar una disolución en la que las partículas están en suspensión,
- 15 - en una segunda etapa, las partículas en suspensión se separan de la disolución
- sea por filtración de la composición,
- sea por centrifugación y recuperación del líquido sobrenadante,
- 20 - sea por centrifugación seguida de filtración del líquido sobrenadante;
- en una tercera etapa, los disolventes se eliminan del líquido sobrenadante o del filtrado.
- 25 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** las células bacterianas se eligen entre las bacterias Gram negativas.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado porque** las células bacterianas se eligen entre las bacterias Gram negativas de tipo R y S-R.
- 30 4. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** las células se eligen entre: *Bordetella pertussis*, *Escherichia Coli*, *Bordetella parapertussis*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Haemophilus*.
- 35 5. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** los disolventes se eliminan del líquido sobrenadante o del filtrado por un procedimiento elegido entre: diálisis, filtración/lavado, precipitación.
6. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** se extrae la composición procedente de la tercera etapa del procedimiento mediante una mezcla de cloroformo y metanol.
- 40 7. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** la mezcla de disolventes consta de:
- 45 - un disolvente elegido entre: ácidos alifáticos lineales o ramificados que comprenden de 3 a 6 átomos de carbono,
- una disolución acuosa básica de una amina alifática que comprende de 0 a 12 átomos de carbono, en una relación volumétrica de 3/7 a 7/3.
- 50 8. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** la mezcla de disolvente se elige entre: ácido isobutírico y trietilamina en disolución acuosa al 10% con una relación volumétrica 5/3.
9. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** la
- 55 mezcla de disolventes es una mezcla de ácido isobutírico y amoníaco en disolución acuosa molar con una relación volumétrica 5/3.
10. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado porque** la agitación en la primera etapa del procedimiento dura de 5 a 15 min.

11. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado porque** la filtración se hace sobre un soporte que tiene una porosidad de 0,1 a 2 μm .
- 5 12. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado porque** la centrifugación se hace en las siguientes condiciones: de 1500 a 3000 g, durante 10 a 20 min a temperatura ambiente.
13. Procedimiento para preparar una composición que comprende uno o varios lipopolisacáridos o
10 derivados de lipopolisacáridos, destinada a la administración humana o animal, **caracterizado porque** comprende un procedimiento de aislamiento de lipopolisacáridos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
14. Procedimiento según la reivindicación 13, **caracterizado porque** la composición es una composición
15 terapéutica.
15. Procedimiento según la reivindicación 14, **caracterizado porque** la composición es una composición de vacuna.

**Cromatografía en capa fina comparativa de las endotoxinas aisladas por el método antiguo
y el nuevo**

LPS *B.pertussis*

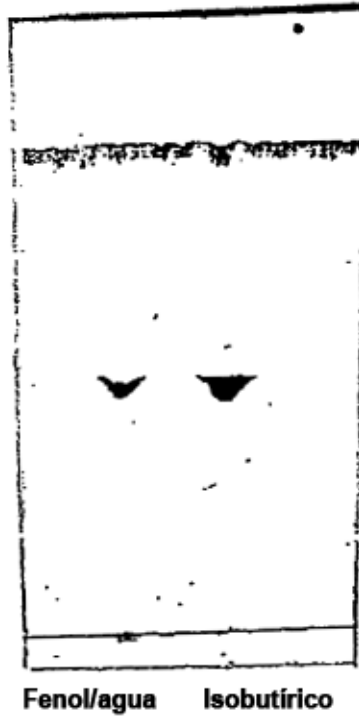


FIGURA 1