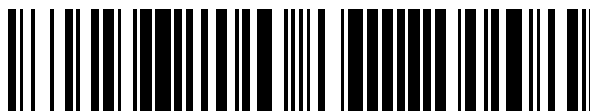


19

OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 562 637**

15 Folleto corregido: T3

Texto afectado: Dibujos

48 Fecha de publicación de la corrección: 30.05.2017

51 Int. Cl.:

**C07D 471/16** (2006.01)**A61K 31/519** (2006.01)**A61P 21/02** (2006.01)**A61P 23/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA CORREGIDA

T9

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.03.2010 PCT/IB2010/051187**87 Fecha y número de publicación internacional: **30.09.2010 WO10109386**96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.03.2010 E 10755518 (7)**97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2015 EP 2412714**54 Título: **Método para la purificación industrial de ficotoxinas biológicamente activas**

30 Prioridad:

**24.03.2009 CL 7232009**

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

**07.03.2016**

73 Titular/es:

**PROTEUS S.A. (100.0%)  
Cerro San Luis 9971, Bodega 3, Quilicura  
Santiago, CL**

72 Inventor/es:

**LAGOS GONZÁLEZ, MARCELO SANTIAGO**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel****Observaciones :****Véase nota informativa (Remarks, Remarques  
o Bemerkungen) en el folleto original publicado  
por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 562 637 T9

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

Método para la purificación industrial de ficotoxinas biológicamente activas

Campo de la invención

5 Esta invención se relaciona con la producción industrial, en grandes cantidades, en condiciones controladas y en forma continua de las ficotoxinas paralizantes neosaxitoxina, saxitoxina y gonyaulatoxinas (gonyaulatoxina 2 y gonyaulatoxina 3) a partir de cianobacterias productoras de ficotoxinas paralizantes, y en forma particular con la purificación de dichas ficotoxinas. Con el objetivo central de obtener un compuesto sustancialmente puro que mantenga su potente actividad biológica hasta el producto final, donde se utiliza como materia prima para el desarrollo de nuevos medicamentos.

10 Estas ficotoxinas tienen aplicación en productos cosméticos o farmacéuticos, por ejemplo en productos cosméticos para combatir las arrugas y líneas de expresión, o en productos farmacéuticos de aplicación clínica tales como anestésicos locales, medicamentos para el control de patologías asociadas con hiperactividad muscular, para el control del dolor a nivel local y periférico, es decir productos para mejorar la calidad de vida.

Descripción de la técnica anterior

15 Las ficotoxinas neosaxitoxina, saxitoxina y gonyaulatoxinas son compuestos activos producidos por florecimientos algales nocivos, de los géneros *Alexandrium* sp., *Piridinium* sp., y *Gymnodinium* sp., (Lagos, N. (1998) Microalgal blooms: A global issue with negative impact in Chile. Biol. Res. 31: 375-386). En los últimos 15 años, se ha demostrado que además de producirse por dinoflagelados marinos, estas ficotoxinas también pueden producirse por cianobacterias de agua dulce, tales como las algas verde-azuladas fotosintéticas.

20 Hasta ahora en la bibliografía se han identificado sólo 4 géneros de cianobacterias productoras de ficotoxinas paralizantes, y cada una produce una mezcla distinta de ficotoxinas, tanto en cantidad, como en tipos de ficotoxinas producidas, es decir producen distintos perfiles de ficotoxinas paralizantes (Lagos, N., Onodera, H., Zagatto, P.A., Andrinolo, D., Azevedo, S.M.F.Q., y Oshima, Y., 1999, The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. TOXICON, 37: 1359 - 1373. Pereira, P.,  
25 Onodera, H., Andrinolo, D., Franca, S., Araujo, F., Lagos, N., y Oshima, Y., 2000, Paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacteria *Aphanizomenon flos-aquae*, isolated from Montargil reservoir, Portugal. TOXICON, 38: 1689 - 1702.

El principio activo de estas ficotoxinas paralizantes actúa como bloqueante específico de los canales de sodio dependientes de voltaje, que se encuentran en las células excitables (Kao, C.Y., 1966, Tetrodotoxin, saxitoxin and their significance in the study of excitation phenomenon. Pharm. Rev. 18: 997-1049). Debido a la inhibición de los canales de sodio, se bloquea la transmisión del impulso nervioso y de esta forma se impide la liberación de neurotransmisores a nivel de la placa neuromotora, lo que impide entonces la contracción muscular. Debido a estos efectos fisiológicos, estos compuestos son potencialmente útiles en farmacología, al usarlos como inhibidores de la actividad muscular en patologías asociadas con hiperactividad muscular, como son los espasmos musculares y distonías focales, cuando se aplica en forma inyectable y localmente. Adicionalmente, debido a que se genera un bloqueo a nivel de transmisión del impulso nervioso, cuando estos compuestos se aplican como una infiltración local, no sólo bloquean las vías eferentes de neurotransmisión, sino que además bloquean las vías aferentes y por ende producen también inhibición de las vías sensoriales, generando un efecto anestésico, siendo ambos efectos inseparables al inyectarse localmente. Este es un efecto sorprendente, pues ambos efectos se dan simultáneamente  
40 (patente estadounidense 4.001.413).

Las ficotoxinas neosaxitoxina, saxitoxina y gonyaulatoxinas, en la actualidad no se encuentran disponibles comercialmente como un producto masivo, a pesar de sus grandes aplicaciones potenciales con fines terapéuticos y cosméticos. Es evidente que se requiere de un procedimiento de producción industrial de estos compuestos, para satisfacer su creciente demanda, relacionada con su gran cantidad de usos y aplicaciones clínicas y cosméticas recientemente desarrolladas.  
45

Lubna Zaman describe el aislamiento de varias ficotoxinas incluyendo saxitoxina y gonyautoxina, conservando los compuestos sobre carbón con la siguiente elución y realización de HPLC (Lubna Zaman, Osamu Arakawa, Ako Shimosu y Yoshio Onoue, 1997, Occurrence of paralytic shellfish poison in Bangladeshi freshwater puffers. TOXICON, 35, 3, 423-431). Sin embargo, el procedimiento incluye la extracción en etanol y medio de HCl a pH 2. Las ficotoxinas pierden su actividad a pH bajo, resultando el medio de HCl adicionalmente difícil de eliminar del producto purificado.  
50

El documento US 2008/006579 A1 se refiere a un método general para concentrar productos biotransformados catalizados por células en tierra de diatomeas, en el que los productos deseados se encuentran en el medio fuera de

dichas células. De nuevo, a los valores de pH<4 descritos, las ficotoxinas no son activas, mientras que se notifican que valores de pH superiores dan un rendimiento insuficiente en el método de la publicación. La presente invención, por el contrario, lisa la célula con el fin de obtener las ficotoxinas intracelulares, y manteniendo así la actividad biológica de dichas ficotoxinas.

5 Ghazzarossian describe un método para el aislamiento de saxitoxina empleando Celite pero también acidificando con HCl hasta pH 2-3 (Ghazzarossian V.E., Schantz E.J., Schnoes H.K. y Strong F.M., 1974, Identification of a poison in toxic scallops from a Gonyaulax Tamarensis red tide. Biochim. and Biophys. Research Comunic. Academic Press Inc., 59, 4, 1219-1225).

10 Es destacable que tanto Lubna Zaman como Ghazzarossian purifican ficotoxinas a partir de tejido de pez infectado como fuente, lo que determina el procedimiento de extracción.

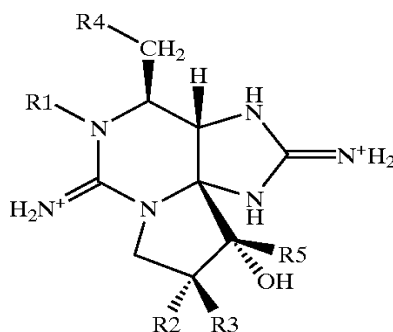
La invención presentada aquí corresponde a la extracción, fraccionamiento y purificación de las ficotoxinas paralizantes neosaxitoxina, saxitoxina y gonyaulatoxinas, partiendo de un procedimiento innovador de cultivos celulares continuos, en condiciones controladas y en grandes cantidades a partir de cepas de cianobacterias (algas verde-azuladas). El objetivo central es el mantenimiento de la potente actividad biológica de este principio activo durante todo el procedimiento de purificación industrial.

Las cianobacterias productoras de ficotoxinas paralizantes pertenecen a los géneros: *Cylindrospermopsis sp*, *Mycrocistis sp*, *Anabaena sp*, *Gomphosphaeria sp*, *Oscillatoria sp*, *Aphanizomenon sp* (*Aphanizomenon issatchenkoi*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Aphanizomenon gracile*), y *Lyngbya wollei* y otros. Ninguna de estas cianobacterias se ha empleado, hasta ahora, en la producción de ficotoxinas a niveles industriales.

20 La producción industrial de ficotoxinas a partir de cianobacterias debe resolver dos problemas técnicos, que si bien están interrelacionados son diferentes entre sí. En primer lugar se debe generar una gran cantidad de biomasa productora de ficotoxinas. Este problema técnico se resuelve en la invención protegida en la solicitud de patente CL 722-2009, también presentada por los autores de la presente invención. En segundo lugar, una vez producida la biomasa y las ficotoxinas, estos compuestos deben purificarse en ciertas condiciones adecuadas para mantener la actividad biológica de los compuestos activos, preservar su potente actividad biológica y producir rendimientos masivos. Este segundo problema técnico es el que resuelve la presente invención.

El método propuesto es la purificación de ficotoxinas a partir de un cultivo clonal de cianobacterias, que produce un perfil simple de ficotoxinas paralizantes (que comprende una o dos ficotoxinas o que tiene un perfil con una ficotoxina que representa más del 75% de la composición total del perfil), por ejemplo, una cepa que sólo produzca neosaxitoxina y saxitoxina o sólo gonyaulatoxinas 2/3, como componentes principales. Tener rendimientos superiores al 75% de un principio activo farmacológico es también un efecto sorprendente, que se logra el presente procedimiento industrial.

La estructura química de estas ficotoxinas tiene una estructura general (I), y su estructura particular la definen los sustituyentes R1 a R5, según se indica en la tabla:



(I)

35

Compuesto	R1	R2	R3	R4	R5
Saxitoxina	H	H	H	COONH <sub>2</sub>	OH
Neosaxitoxina	OH	H	H	COONH <sub>2</sub>	OH
Gonyaulatoxina 1	OH	H	OSO <sub>3</sub>	COONH <sub>2</sub>	OH
Gonyaulatoxina 2	H	H	OSO <sub>3</sub>	COONH <sub>2</sub>	OH
Gonyaulatoxina 3	OH	OSO <sub>3</sub>	H	COONH <sub>2</sub>	OH

Compuesto	R1	R2	R3	R4	R5
Gonyaulatoxina 4	H	OSO <sub>3</sub>	H	COONH <sub>2</sub>	OH
Gonyaulatoxina 5	H	H	H	COONHSO <sub>3</sub>	OH

5 La revelación de que estos alcaloides son producidos por cianobacterias es muy reciente. Sólo en los últimos 15 años se ha demostrado que corresponden a metabolitos secundarios encontrados dentro de las células, que en ciertas condiciones pueden liberarse al medio de cultivo. Por lo tanto, en un cultivo continuo de cianobacterias, se generan dos fuentes de estos compuestos, la primera en el sedimento celular y la segunda en el medio de cultivo donde se cultivan las cianobacterias.

10 Para la producción industrial de estas ficotoxinas y para poder purificarlas es indispensable tener un cultivo masivo de estas cianobacterias, como el que se indica en la solicitud de patente CL 722-2009. Antes del procedimiento descrito en la solicitud de patente CL 722-2009, no se había logrado el desarrollo de procedimientos industriales de alto volumen para la obtención de las ficotoxinas. Sin embargo las ficotoxinas se purificaban en laboratorios de investigación básica a partir de mariscos contaminados con marea roja, con el objetivo de obtener algunos microgramos de estas toxinas como patrones analíticos (patrones para usarse como compuestos de referencia en análisis químicos).

15 Hasta la fecha, no existen publicaciones que describan procedimientos de purificación de estas ficotoxinas a partir de mariscos contaminados, y tampoco a partir de dinoflagelados a niveles industriales; en este caso, se considera que los niveles industriales son de un orden de magnitud de gramos para la producción del metabolito o ficotoxina. No se ha publicado nada sobre el aislamiento de ficotoxinas a partir de cianobacterias, lo que no es de extrañar cuando se considera que las cianobacterias productoras de estas ficotoxinas sólo se han descrito recientemente en la bibliografía (Lagos, 2003).

20 En esta solicitud de patente se presenta un procedimiento de purificación y producción industrial de neosaxitoxina, saxitoxina y gonyaulatoxinas 2/3, usando un procedimiento biotecnológico innovador a partir de cianobacterias aisladas, clonadas que optimiza la producción industrial continua de estas ficotoxinas en condiciones controladas, a mientras mantienen su potente actividad biológica durante todo el procedimiento industrial para producir un principio activo industrial útil para el desarrollo de nuevos fármacos.

25 La integración de la propuesta de producción con las tecnologías usadas en esta invención considera el ajuste a escala productivo de cianobacterias anteriormente descrito para producir la cantidad necesaria para usos masivos farmacológicos y el desarrollo de nuevos medicamentos o principios activos para aplicaciones cosméticas.

Las ventajas de la presente invención para producir masivamente estas ficotoxinas en condiciones controladas a partir de cianobacterias, son:

- 30
- La disponibilidad de clones de cepas de cianobacterias seleccionadas y productoras de ficotoxinas con una composición única y perfiles de toxina simples.
  - Fácil procedimiento de purificación de alto rendimiento de las ficotoxinas.
  - Relación coste – producción – rendimiento muy favorable no logrado hasta ahora.

#### Campo de aplicación para la producción masiva de las ficotoxinas neosaxitoxina, saxitoxina y gonyaulatoxinas

35 El campo de aplicación de estos alcaloides incluye sus aplicaciones clínicas como agentes terapéuticos en patologías asociadas con hiperactividad muscular, tales como espasmos musculares y distonías focales. Adicionalmente, pueden usarse como anestésicos locales en diferentes preparaciones farmacéuticas de amplio espectro, lo que permite la clasificación de estas ficotoxinas como productos de gran utilidad en el tratamiento de diversas patologías, muchas de ellas de gran demanda comercial. Por otra parte, también pueden aplicarse en productos cosméticos para combatir las arrugas y líneas de expresión, aplicaciones de evidente demanda comercial.

40 Sin embargo, estas ficotoxinas no están disponibles comercialmente en cantidades industriales a los niveles requeridos en la actualidad. Por tanto el presente método de purificación, fraccionamiento y producción de neosaxitoxina, saxitoxina y gonyaulatoxinas, resuelve un problema biotecnológico que permanecía sin solución hasta ahora. La innovación propuesta en el presente documento, permite satisfacer la gran demanda en los mercados nacionales e internacionales del principio activo de estas ficotoxinas puras, a gran escala para usos terapéuticos y cosméticos y de otros productos que mejoren la calidad de vida de las personas.

45

Estas ficotoxinas presentan propiedades fisicoquímicas muy favorables para aplicaciones en el campo de la medicina y de la industria cosmética. Sus propiedades físicas y químicas son las siguientes: son solubles en agua, estables a temperatura ambiente, altamente resistentes a medios ácidos y a temperaturas extremas (por encima de

100°C), peso molecular muy bajo (298 - 445 g/mol), lo que permite aplicaciones más fáciles, menos peligrosas e indoloras, sin respuestas alérgicas o inmunitarias, a diferencia de otros compuestos, como por ejemplo la proteína de alto peso molecular de la toxina botulínica (Botox®).

- 5 Debido a estas propiedades físicas y químicas de las ficotoxinas, como son su bajo peso molecular y alta estabilidad química, es posible idear aplicaciones y desarrollos biotecnológicos para muchos productos y preparaciones farmacéuticas, como son el uso en cremas, geles, aplicaciones transdérmicas con aparatos de ultrasonido, infrarrojos y otros, parches de liberación controlada (parches adheridos a la piel de aplicación lenta y continua). Todas estas aplicaciones son posibles debido a la gran estabilidad de estos compuestos y a la posibilidad adicional de permitir reacciones químicas con uniones covalentes a otros compuestos químicos.
- 10 Estas ventajas posicionan a las ficotoxinas neosaxitoxina, saxitoxina y gonyaulatoxinas como alternativas superiores a la toxina botulínica, un compuesto utilizado ampliamente en aplicaciones dermocosméticas, que es una proteasa que tiene las desventajas de ser inestable, de alto peso molecular, genera respuesta inmunitaria alérgica, produce daño estructural (digiere terminaciones nerviosas y terminaciones circundantes, produciendo efectos adversos no deseados y actualmente muy cuestionados a nivel mundial) y se digiere a sí misma en periodos cortos de tiempo.
- 15 Las aplicaciones clínicas recientemente publicadas para las ficotoxinas neosaxitoxina, saxitoxina y gonyaulatoxinas, están abriendo mercados para aplicaciones de demanda masiva: en el campo cosmético, para dolores de espalda, migrañas, fisuras anales, control de dolor en cirugía laparoscópica y control del dolor neuropático en general, con millones de pacientes potenciales, planteando una demanda futura incalculable de estos compuestos.
- 20 En la tabla 1 se indican las ventajas de las ficotoxinas neosaxitoxina, saxitoxina y gonyaulatoxinas al compararlas, por ejemplo, con la toxina botulínica (Botox®), que produce una respuesta fisiológica similar y por tanto tiene aplicaciones similares a las de las ficotoxinas en terapia clínica y cosmética, aunque los mecanismos moleculares de acción de las ficotoxinas y la toxina botulínica son muy distintos.

TABLA 1: Ventajas de las ficotoxinas en comparación con la toxina botulínica

Propiedades	Botox®	Ficotoxinas
Toxina activa	Toxina botulínica	neoSTX*; STX*; GTX*
Peso molecular	900.000	Oscilando entre 298 y 450
Estabilidad química	Inestable	Muy estable
Almacenamiento	Congelado	Temperatura ambiente
Mecanismo de acción	Inhibición de la liberación de ACH*	Inhibidor del impulso nervioso, inhibidor de la liberación de cualquier neurotransmisor
Tiempo de activación	5-15 días	Inmediato (minutos)
Duración	De 2 a 4 meses	Dependiente de la dosis
Aplicación tópica y otros modos de aplicación	No es posible	En crema, en geles, en parches, iontoforéticamente, ultrasonido.
neoSTX: neosaxitoxina STX: saxitoxina GTX: gonyaulatoxina ACH: acetilcolina		

- 25 La relativa facilidad en el cambio de los usuarios de Botox® al uso de los potenciales productos derivados de ficotoxina (incluyendo neosaxitoxina, saxitoxina y gonyaulatoxinas) debido a aplicaciones indoloras, de menor coste y de efecto instantáneo, genera ventajas competitivas de las ficotoxinas sobre Botox®.

Objetos de la invención

- 30 El objeto general de la invención es la extracción, purificación y producción industrial de ficotoxinas biológicamente activas, compuestos y metabolitos secundarios producidos por cianobacterias que tienen alto valor añadido y comercial y que no se encuentran disponibles comercialmente a niveles de producción industrial. Lo sorprendente de esta invención es su capacidad para obtener estos compuestos biológicamente activos durante todo el procedimiento industrial, siendo un procedimiento biotecnológico único y sorprendente.

- 35 Un objeto específico de la invención es un procedimiento de purificación, masivo, industrial y de alto rendimiento de producción de las ficotoxinas neosaxitoxina, saxitoxina y gonyaulatoxinas en forma biológicamente activa, a partir de niveles prácticamente ilimitados de cianobacterias producidas en cultivos continuos y en condiciones controladas.

Otro objeto específico de la invención es lograr un procedimiento de purificación de ficotoxinas a partir de sedimentos húmedos y/o congelados de cianobacterias, eliminando los pigmentos y otros metabolitos secundarios principales que acompañan a las ficotoxinas durante el procedimiento de purificación.

#### Descripción de los dibujos

- 5 La figura 1 muestra un cromatograma correspondiente a 10 microlitros de extracto de la cianobacteria *Aphanizomenon gracile*, inyectados en un equipo de cromatografía líquida de alta resolución analítico (HPLC). El método de detección usado fue detección fluorescente en línea. Pico 1, Rt = 2,640 minutos, pigmentos de cianobacterias. Pico 2, Rt = 7,980 minutos, neosaxitoxina. Pico 3, Rt = 11,970 minutos, saxitoxina.
- 10 La figura 2 es un cromatograma correspondiente a 10 microlitros de extracto purificado de *Aphanizomenon gracile* purificado mediante cromatografía líquida de alta resolución preparativa de exclusión molecular (separación por tamaño molecular). El método de detección usado fue detección fluorescente en línea. Pico 1, Rt = 3,067 minutos, pigmentos de cianobacterias. Pico 2, Rt = 9,373 minutos, neosaxitoxina. Pico 3, Rt = 12,953 minutos, saxitoxina.
- 15 La figura 3 muestra un cromatograma de un patrón analítico que incluye como componentes principales neosaxitoxina y saxitoxina, con una pequeña cantidad de una mezcla de gonyaulotoxinas (patrón NL2), determinado y cuantificado mediante cromatografía líquida de alta resolución analítica con detección fluorescente en línea. Primer pico Rt = 3,653 minutos, mezcla de gonyaulotoxinas; segundo pico 2, Rt = 5,040 minutos, neosaxitoxina; tercer pico, Rt = 7,440 minutos, saxitoxina.
- 20 La figura 4 es un cromatograma de una muestra de neosaxitoxina purificada a partir de extractos de cianobacterias *Aphanizomenon gracile* (Rt = 4,933 minutos). Esto corresponde a la fracción eluida a partir de cromatografía líquida de alta resolución preparativa usando columnas de intercambio iónico con detección fluorescente en línea.
- La figura 5 muestra un cromatograma de patrones analíticos de gonyaulotoxinas. De izquierda a derecha: Pico 1: GTX4 (gonyaulotoxina 4); Pico 2 GTX1 (gonyaulotoxina 1); Pico 3 GTX5 (gonyaulotoxina 5); Pico 4 GTX3 (gonyaulotoxina 3); Pico 5 GTX2 (gonyaulotoxina 2).
- 25 La figura 6 muestra un cromatograma de una muestra de extracto de la cianobacteria *C. raciborskii*. Pico 1, Rt = 8,873 minutos, Pico 2, Rt = 10,927 minutos, Pico 3, Rt = 13,260 minutos; Pico 4, Rt= 16,647.
- La figura 7 es un cromatograma de una fracción de *C. raciborskii* parcialmente purificada mediante cromatografía líquida de alta resolución preparativa de exclusión molecular con presencia dominante de los epímeros GTX3 y GTX2, respectivamente.
- 30 La figura 8 muestra un cromatograma de la fracción final pura de los epímeros GTX3 y GTX2 obtenidos a partir de cianobacterias en cultivo continuo de *C. raciborskii*.
- La figura 9 muestra un gráfico de elución de una cromatografía preparativa de exclusión molecular que muestra las fracciones obtenidas y donde se identifica el intervalo de fracciones donde aparecen los distintos compuestos presentes (compuestos orgánicos, ficotoxinas y sales).
- 35 La figura 10 muestra un gráfico de elución de una cromatografía preparativa de intercambio aniónico que muestra las fracciones obtenidas y donde se identifica el intervalo de fracciones donde aparecen los distintos compuestos presentes (ficotoxinas y sales).
- La figura 11 muestra un gráfico de elución de una cromatografía preparativa de intercambio catiónico que muestra las fracciones obtenidas y donde se identifica el intervalo de fracciones donde aparecen los distintos compuestos presentes (ficotoxinas y sales).
- 40 La figura 12 muestra un gráfico de elución de una cromatografía preparativa de exclusión molecular que muestra las fracciones obtenidas y donde se identifica el intervalo de fracciones donde aparecen las distintas ficotoxinas purificadas (saxitoxina y neosaxitoxina).

#### Breve descripción de la invención

- 45 Este documento describe la purificación y purificación industrial de las ficotoxinas neosaxitoxina, saxitoxina y gonyaulotoxinas en una forma biológicamente activa, a partir de cultivos de cianobacterias productoras de estas ficotoxinas.

Las cianobacterias utilizadas en la presente invención pertenecen a los géneros: *Cylindrospermopsis sp*, *Mycrocistis*

*sp., Anabaena sp., Gomphosphaeria sp., Oscillatoria sp., Aphanizomenon sp (Aphanizomenon issatchenkoi, Aphanizomenon flos-aquae, Aphanizomenon gracile).*

5 Las cianobacterias se obtienen preferentemente a partir de un cultivo continuo, masivo, semiautomático en condiciones controladas tal como el descrito en la solicitud de patente chilena CL 722-2009, presentada simultáneamente con la presente solicitud por los mismos autores.

10 La purificación industrial de las ficotoxinas neosaxitoxina, saxitoxina y gonyaulatoxinas a partir de cianobacterias en un cultivo continuo, se realiza usando un método que incluye extracción, fraccionamiento, partición con disolventes, participación en fases sólidas y partición en superficies de contacto líquidas-sólidas de estas ficotoxinas (neosaxitoxina, saxitoxina y gonyaulatoxinas) a partir de sedimentos de células del cultivo o del sobrenadante del cultivo. Se trata de un procedimiento continuo, secuencial y semiautomático, que genera cantidades industriales de un principio activo que mantiene su actividad biológica durante todo el procedimiento de purificación, hasta llegar a su producto final. El procedimiento implica procedimientos químicos y bioquímicos en varias etapas de fraccionamiento usando centrifugación diferencial, extracción con disolventes acuosos y orgánicos, partición en fases de disolventes hidrófobos, partición en fases sólidas, purificación en columna y diversos tipos de cromatografías de alta resolución preparativas (intercambio catiónico, intercambio aniónico y exclusión molecular), hasta obtener extractos parcialmente purificados, sin pigmentos, correspondientes a fracciones con perfiles de ficotoxina simples y ficotoxinas puras a partir de estas fracciones (figuras 1 a 8). Todas estas etapas son parte de un procedimiento biotecnológico único y parte de un procedimiento industrial sólo desarrollado en Chile.

#### Descripción detallada de la invención

20 La invención se refiere a un método de purificación para la producción industrial de las ficotoxinas neosaxitoxina, saxitoxina y gonyaulatoxinas, manteniendo su actividad biológica durante todo el procedimiento de purificación industrial, a partir de cianobacterias productoras de estas ficotoxinas.

25 Las cianobacterias productoras de estas ficotoxinas pertenecen a los géneros: *Cylindrospermopsis sp., Myrocistis sp., Anabaena sp., Gomphosphaeria sp., Oscillatoria sp., Aphanizomenon spp. (Aphanizomenon issatchenkoi, Aphanizomenon flos-aquae, Aphanizomenon gracile).*

El material de partida es un cultivo unialgal de una especie de cianobacteria; el que sea un cultivo unialgal es indispensable para la obtención de estas ficotoxinas purificadas con altos rendimientos. Esto forma parte del procedimiento de crecimiento y ajuste a escala hasta nivel industrial, para obtener una alta cantidad de ficotoxinas en el material de partida.

30 Las cianobacterias se obtienen por el desarrollo de un método y procedimiento de cultivo continuo, masivo, semiautomático en condiciones controladas que sostiene un crecimiento logarítmico permanente de cianobacterias, descrito en la solicitud de patente chilena CL 722-2009, presentada simultáneamente con la presente solicitud por los mismos autores.

35 Durante el procedimiento de cultivo de estas especies de cianobacterias, las ficotoxinas se acumulan en el interior de las células, pero también se liberan al medio de cultivo, teniendo de esta manera dos fuentes de ficotoxinas.

Por ejemplo, en el cultivo de *Aphanizomenon gracile*, el principal componente liberado a partir de las células de cianobacterias es neosaxitoxina (figuras 2 y 4).

Por lo tanto, existen dos fuentes posibles de obtención de ficotoxinas a partir de un cultivo industrial de cianobacterias:

- 40
- a partir de los sobrenadantes filtrados (sin células ni filamentos) del medio de crecimiento de cianobacterias;
  - a partir de los sedimentos húmedos obtenidos por centrifugación del cultivo en desarrollo, que está compuesto por células y filamentos de cianobacterias.

45 La producción de las ficotoxinas objetivo, que depende en cada caso de la cianobacteria productora cultivada en cada caso, puede obtenerse para cualquiera de las cianobacterias mencionadas, tanto a partir de los sobrenadantes como a partir de los sedimentos obtenido.

50 La producción industrial de las ficotoxinas neosaxitoxina, saxitoxina y gonyaulatoxinas, a partir de cianobacterias en cultivo continuo se logra usando un método que incluye extracción, fraccionamiento, partición con disolventes, partición en fases sólidas y partición en fases líquidas-sólidas de estas ficotoxinas (neosaxitoxina, saxitoxina y gonyaulatoxinas) a partir de células del cultivo (sedimento). El procedimiento implica procedimientos químicos y bioquímicos en varias etapas de fraccionamiento usando centrifugación diferencial, extracción con disolventes

5 acuosos y orgánicos, partición en fase de disolventes hidrófobos, partición en fases sólidas, purificación en columna y diversos tipos de cromatografías de alta resolución preparativas (intercambio catiónico, intercambio y exclusión molecular), hasta obtener extractos parcialmente purificados, sin pigmentos correspondientes a fracciones con perfiles de ficotoxina simples y ficotoxinas puras a partir de estas fracciones (figuras 1 a 8). El enfoque fundamental está dirigido a obtener un principio activo estable que mantenga toda la potencia de su actividad biológica, de tal manera que pueda usarse como base para el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos.

En una forma simplificada, el método de purificación de la neosaxitoxina, saxitoxina y gonyaulatoxina de la invención comprende las siguientes etapas:

- 10 a. proporcionar una fuente de ficotoxinas, concretamente un cultivo de clones de cianobacterias, que está separado en un medio de cultivo y un sedimento húmedo de células de cianobacterias o un sedimento congelado de células de cianobacterias;
- b. lisar dicho sedimento usando homogeneización, extracción con disolventes, molino de bolas, ciclos de congelación/descongelación, ultrasonificación o lisis enzimática;
- 15 c. someter el material obtenido a extracción en frío y separación de fases orgánica/acuosa, concretamente un 50% en volumen de una mezcla de cloroformo:metanol 1:1 y un 50% en volumen de ácido acético 1 mM, a pH de entre 4 y 5, y posteriormente separar las fases acuosa y orgánica usando cloroformo:metanol 1:1 en volumen, lo que se repite entre 1 y 5 veces;
- d. obtener un concentrado de la fase acuosa obtenida en la etapa (c);
- e. centrifugar la fase acuosa concentrada para obtener un sobrenadante;
- 20 f. hacer pasar el sobrenadante a través de una matriz sólida de tierra de diatomeas, donde las ficotoxinas quedan retenidas, y lavar con una disolución de lavado; luego obtener un eluato de ficotoxina con una disolución de elución;
- g. hacer pasar el eluato que contiene las ficotoxinas a través de una matriz de carbón activado, donde nuevamente las ficotoxinas quedan retenidas, y luego lavar con agua destilada para eliminar los pigmentos e impurezas retenidos; las ficotoxinas deben eluirse de la misma con una disolución de elución;
- 25 h. hacer pasar el eluato de la etapa anterior que contiene las ficotoxinas nuevamente a través de una matriz sólida de tierra de diatomeas, lavar y eluir una vez más con una disolución de extracción;
- i. evaporar los componentes orgánicos del eluato acuoso de la etapa anterior, para obtener un extracto de ficotoxinas parcialmente purificado;
- 30 j. someter el extracto de ficotoxinas parcialmente purificado obtenido en la etapa anterior a un procedimiento bioquímico de separación y fraccionamiento mediante HPLC preparativa (HPLC-Prep: cromatografía líquida de alta resolución preparativa) en varias etapas, según el principio físico o químico de fraccionamiento utilizado, que puede comprender secuencialmente: exclusión molecular, intercambio aniónico, intercambio catiónico y nuevamente exclusión molecular.

35 De este modo se obtienen preparaciones de ficotoxina pura, adecuadas para aplicaciones farmacéuticas y cosméticas.

El método de la presente invención proporciona por primera vez en el estado de la técnica, un procedimiento para purificar ficotoxinas, tales como neosaxitoxina, saxitoxina y gonyaulatoxinas, a partir de cianobacterias productoras de estas ficotoxinas.

40 Este método comprende proporcionar una cantidad adecuada de una fuente de ficotoxinas, como por ejemplo un cultivo de cianobacterias, el medio de cultivo donde crecen las cianobacterias en dicho cultivo o un sedimento de cianobacterias.

45 Si se usa un cultivo de cianobacterias, las células se separan del medio de cultivo, por ejemplo usando una etapa de centrifugación. Se obtiene así una fase líquida acuosa correspondiente al medio de cultivo y un sedimento húmedo correspondiente a las cianobacterias. Los sedimentos de cianobacterias pueden congelarse o procesarse directamente, puesto que la etapa de congelación no afecta la posterior purificación de las ficotoxinas neosaxitoxina, saxitoxina y gonyaulatoxinas.



Los sedimentos obtenidos se lisan usando métodos apropiados conocidos en el estado de la técnica, tales como homogenización, extracción con disolventes (fase orgánica/fase acuosa), molino de bolas, ciclos de congelación/descongelación, ultrasonicación, lisis enzimática, y similares.

5 El material procedente de la lisis de cianobacterias se somete a una extracción en frío usando una mezcla de disolventes orgánicos en fase acuosa (cloroformo:metanol 1:1 con ácido acético 10 mM que comprende un 50% en volumen de la mezcla anterior), y posteriormente se separan las fases orgánica y acuosa usando una fase orgánica a pH 5 que comprende cloroformo:metanol 1:1 en volumen, lo que se repite entre 1 y 5 veces. Se recogen todas las fases acuosas obtenidas para formar una única fase acuosa con la que se prosigue el procedimiento de purificación.

10 La fase acuosa obtenida en la etapa anterior o el sobrenadante del medio de cultivo se concentra usando por ejemplo, un evaporador rotatorio a temperatura ambiente, hasta alcanzar una concentración de entre 5 y 20 veces el volumen original. El concentrado se somete a centrifugación a una fuerza centrífuga relativa que oscila entre 15.000 x g y 25.000 x g durante períodos que oscilan entre 10 y 40 minutos. El sobrenadante del centrifugado se hace pasar a través de una columna de tierras de diatomeas, lavando la columna con de 5 a 15 veces su volumen de una disolución apropiada, como por ejemplo, ácido acético 50 mM. Se eluyen las ficotoxinas con una disolución apropiada, como por ejemplo una mezcla de extracción alcohólica, etanol:agua:ácido acético 5 mM en una proporción de 2:1:1 (vol/vol/vol). El eluato de la etapa anterior se hace pasar a través de columnas de carbón activado, que entonces se lavan con agua destilada para eliminar los pigmentos e impurezas retenidos. En la columna se retienen las ficotoxinas y se eluyen con una disolución apropiada, como por ejemplo, una mezcla de elución alcohólica, etanol:agua:ácido acético 1 mM en una proporción de 3:2:1 (vol/vol/vol) a pH 5. El eluato de la etapa anterior nuevamente se hace pasar a través de una columna de tierra de diatomeas. Se lavan las columnas con una disolución apropiada de ácido acético 50 mM usando un volumen equivalente a 10 veces el volumen de la matriz y se eluyen las ficotoxinas con una disolución apropiada, como por ejemplo mediante extracción con disolventes con una disolución alcohólica apropiada a pH 5, por ejemplo una mezcla de cloroformo/metanol/agua; 1:1:1 (vol/vol/vol). El eluato de la etapa anterior se deja en una fase acuosa, evaporando los disolventes orgánicos, usando por ejemplo un equipo "Speed Vac" (Savant, NY, EE.UU.). Se obtiene de ese modo un extracto de ficotoxina parcialmente purificado.

30 El extracto parcialmente purificado de la etapa anterior se somete a HPLC preparativa (cromatografía líquida de alta resolución preparativa) en varias etapas que pueden comprender secuencialmente: exclusión molecular, intercambio aniónico, intercambio catiónico y nuevamente exclusión molecular. La realización de varias cromatografías sucesivas garantiza una pureza analítica apta para los requerimientos de la industria farmacéutica. No obstante, en ciertos casos, dependiendo del grado de pureza requerido, las ficotoxinas pueden purificarse utilizando sólo una etapa de HPLC-Prep.

35 Debe entenderse que los valores mencionados de las proporciones y razones de los componentes de cada disolución, las concentraciones de componentes o los valores de pH pueden variar en un intervalo de  $\pm$  el 5% sin alterar el resultado de la invención.

En forma más detallada y esquemática, el método de purificación de ficotoxinas de la invención puede definirse en las siguientes etapas:

40 a. Proporcionar una cantidad adecuada de una fuente de ficotoxinas, tal como el cultivo de una cianobacteria pura, según la divulgación de la solicitud chilena "Culture of cyanobacteria able to produce neosaxitoxin and saxitoxin at industrial levels" (CL 722-2009), presentada simultáneamente con la presente solicitud por los mismos autores.

- Separar las células y el medio de cultivo mediante centrifugación. Se utilizan volúmenes de 1 l de cultivo obtenido de cada reactor y se centrifuga a 10.000 x g durante 25 minutos, para obtener un sobrenadante y un precipitado o sedimento húmedo de cianobacterias.

45 • Etapa opcional de congelar los sedimentos de células. Los sedimentos de células pueden congelarse para purificarse después o la purificación puede comenzar de inmediato.

50 b. Lisar el sedimento usando un método preferido de lisis de sedimentos y entonces pesar y añadir el mismo volumen de la mezcla de disolventes orgánicos en fase acuosa en peso del sedimento (cloroformo:metanol; 1:1 + ácido acético 10 mM en una mezcla al 50% con la mezcla anterior), para destruir la pared celular y la membrana citoplasmática. Esto se realiza en un medio levemente ácido (pH 5,0). Un medio levemente ácido es un requisito importante y único que permite que el principio activo permanezca activo.

c. Someter el material procedente de la lisis celular a una extracción en frío y separación de fases (orgánica / acuosa).

- Repetir la extracción de la fase orgánica obtenida previamente.
  - Combinar las dos fases orgánicas obtenidas.
  - Extraer la fase acuosa dos veces con fase orgánica a pH 5,0. Se usa el mismo volumen de disolución de cloroformo:metanol; 1:1 vol/vol.
- 5 d. Concentrar la fase acuosa extraída 10 veces su volumen (se obtiene una décima parte del volumen inicial), utilizando por ejemplo un evaporador rotatorio a temperatura ambiente.
- e. Centrifugar el concentrado, preferentemente a 20.000 x g durante 30 minutos.
- 10 f. Tratar la fase acuosa sobrenadante de la etapa de centrifugación con una matriz sólida de tierras de diatomeas en una etapa que consiste en hacer pasar el sobrenadante a través de una columna de tierra de diatomeas. Se lava la columna, con ácido acético 50 mM con un cantidad de preferentemente 10 veces el volumen de la columna y se extrae la ficotoxina retenida en la columna con una disolución de extracción alcohólica o tampón de elución (etanol:agua:ácido acético 5 mM; 2:1:1 vol/vol/vol).
- 15 g. Hacer pasar ahora el eluato de la columna de la etapa anterior a través de columnas de carbón activado, que luego se lavan con agua destilada para eliminar los pigmentos e impurezas retenidos. En las columnas se retienen las ficotoxinas que se eluyen con una mezcla de elución alcohólica (etanol:agua:ácido acético 1 mM 3:2:1 vol/vol/vol, pH 5,0 Este fraccionamiento elimina una gran fracción de los pigmentos y moléculas de bajo peso molecular más abundantes en el lisado de cianobacterias, como son aminoácidos, bases nucleotídicas, péptidos, azúcares (monosacáridos y disacáridos).
- 20 h. Nuevamente realizar una elución diferencial desde matrices sólidas de tierra de diatomeas. Se cargan columnas de tierra de diatomeas con el extracto eluido del carbón activado. Nuevamente se retienen las ficotoxinas en la matriz sólida por efectos de interacción hidrófoba. Inicialmente se lavan estas columnas para eluir una gran fracción de los componentes de bajo peso molecular, que se eliminan. Las ficotoxinas retenidas se eluyen posteriormente de la columna mediante extracción con disolventes con una mezcla de cloroformo:metanol:agua 1:1:1 vol/vol/vol. El uso de columnas de tierra de diatomeas genera un fraccionamiento estratificado total. Este procedimiento masivo para grandes cantidades no genera el fraccionamiento logrado con estas columnas cuando se usa en una técnica discontinua. Otro efecto sorprendente se representa por la sustitución de la técnica discontinua por una separación en columna, que produce inesperadamente una gran purificación previa inicial del material industrial masivo, con el consecuente ahorro en costes y un gran aumento en la eficiencia.
- 25
- 30 i. Dejar el eluato de la segunda columna de tierra de diatomeas en una fase acuosa, evaporando los disolventes orgánicos, por ejemplo usando un equipo de "Speed Vac" (Savant, NY, EE.UU.). Se obtiene de ese modo un extracto de ficotoxina parcialmente purificado.
- j. Someter este extracto parcialmente purificado a una HPLC preparativa (HPLC-Prep: cromatografía líquida de alta resolución preparativa).
- 35 A) Separación mediante HPLC preparativa por tamaños: Para esta separación se utilizan por ejemplo columnas de acero inoxidable a alta presión, rellenas con fino Bio-Gel P-2 (Bio-Rad) 45-90 micrómetros (en húmedo). Estas columnas tienen 10 centímetros de diámetro y 85 centímetros de largo, y se rellenan a presión con resina seca de Bio-Gel P-2 y que presenta un tamaño de exclusión de 1800 Daltons. Esta resina separa, en el volumen de vacío (Vo), cualquier molécula de tamaño mayor y que presente un peso molecular superior a 1800 Daltons. De esta manera pasan en las fracciones iniciales (en el frente de la ejecución), todas las macromoléculas e incluso pequeños péptidos de 10 aminoácidos, quedando retenidas los compuestos de menor peso molecular como son las ficotoxinas (de 298 a 445 Daltons). Usando esta resina de exclusión molecular, se elimina el 90% del material orgánico no deseado, incluyendo una gran cantidad de pigmentos propios que son característicos de estas cianobacterias. Todos estos compuestos y las macromoléculas solubles salen de la columna en las primeras fracciones (5 primeros litros eluidos). Las fracciones intermedias muy cercanas a las fracciones finales, son las que contienen las ficotoxinas. En las fracciones finales, se elimina gran parte de la sal presente en los extractos. El uso de esta resina para exclusión molecular es un concepto totalmente innovador, especialmente en la forma que se utiliza en este caso. Las columnas de fraccionamiento son de diseño particular de esta invención no sólo por su tamaño sino también en la forma en que se rellenan las columnas. Esta etapa de purificación es trascendental, eficiente y suministra prácticamente un principio activo parcialmente purificado. Todos los fraccionamientos de cromatografía líquida preparativa usados de aquí en adelante, usan este procedimiento biotecnológico innovador de relleno de columna con una matriz sólida a alta presión, lo que genera superficies de contacto prácticamente ilimitadas que son totalmente apropiadas para procedimientos de purificación industrial de principio activos masivos. También en estos procedimientos de HPLC preparativa, se debe mencionar la celeridad favorable del procedimiento, cuestión fundamental para lograr un compuesto puro biológicamente activo. La figura 9, muestra un gráfico de
- 40
- 45
- 50

elución de una cromatografía preparativa, que ejemplifica esta etapa de exclusión molecular. Las fracciones que contienen ficotoxinas se concentran y luego se someten a una segunda separación que corresponde a un procedimiento de intercambio aniónico. La exclusión molecular también es útil para eliminar la mayor cantidad de sales presentes en estos extractos, que no se eliminaron totalmente en los fraccionamientos de fases realizados inicialmente en este procedimiento de purificación. Esto es importante, puesto que estas sales podrían interferir en los procedimientos de intercambio iónico. Por lo tanto, en esta separación no sólo se eliminan las macromoléculas y moléculas con un peso molecular por encima de 1800 Daltons, sino que también se elimina la mayor parte de los componentes salinos de bajo peso molecular (sodio 23, cloro 35, etc.).

B) Intercambio aniónico: Se montan columnas similares a las columnas de exclusión molecular preparativas, pero ahora usando una resina de intercambio aniónico. En este caso se usa Cellex-D (Bio-Rad) con una capacidad de intercambio de 0,66 miliequivalentes por gramo. En esta cromatografía preparativa, las ficotoxinas con una carga neta positiva (+2 y +1) a pH neutro, eluyen en las primeras fracciones (2,5 litros iniciales), pues no se retienen en la columna por tener carga positiva. Por lo tanto, estas ficotoxinas eluyen en el volumen de vacío de la columna. En estas columnas, sólo se retienen los compuestos que presentan carga negativa y se eluyen al final de la cromatografía en fracciones que no contienen ficotoxinas y que por tanto se eliminan. La fracción inicial que contiene la cantidad total de ficotoxinas se concentra de nuevo (liofilizador industrial) y se aplica entonces en columnas de intercambio catiónico preparativas. Esta fracción contiene ficotoxinas sustancialmente puras con carga neta +2 (neosaxitoxina y saxitoxina) y +1 (gonyaulatoxinas).

C) Intercambio catiónico: En esta cromatografía preparativa (usando columnas con las mismas dimensiones que las anteriores, rellenas con Bio-Rex® 70 de Bio-Rad), se quedarán retenidas las ficotoxinas, que se separarán en dos grupos principales: las que tienen carga neta +2 y las que tienen carga neta +1. En las fracciones iniciales, se eluye la pequeña fracción restante de sales con carga negativa (medido mediante conductividad eléctrica), luego se eluyen la gonyaulatoxinas, y finalmente se eluye la saxitoxina y la neosaxitoxina. Se separan estas dos últimas ficotoxinas separadas y una fracción que contiene una mezcla de ambas con una proporción de 2/3 de neosaxitoxina y 1/3 de saxitoxina. La última fracción que eluye contiene sustancialmente neosaxitoxina pura.

D) Por último, varias fracciones finales concentradas de la separación por intercambio catiónico se separan de nuevo en las columnas de exclusión molecular Bio-Gel P-2 (usando un procedimiento idéntico al descrito en A), para eliminar las sales restantes y obtener saxitoxina pura eluida en agua destilada.

Debe entenderse que los valores mencionados para las proporciones y razones de los componentes de cada disolución, las concentraciones de componentes o los valores de pH pueden variar en un intervalo de  $\pm$  el 5% sin alterar el resultado de la invención.

Las ficotoxinas adecuadas para purificarse con el método anteriormente descrito son neosaxitoxina, saxitoxina y gonyaulatoxinas. La obtención de una toxina particular dependerá de la cepa de cianobacterias desde la cual se realiza la purificación, debido a que ciertas cepas producen preferentemente un tipo de ficotoxina particular. Como criterio de separación y fraccionamiento, se consideran los tiempos de retención característicos del compuesto objetivo (ficotoxinas), tal como se presenta a continuación en los siguientes ejemplos de la presente solicitud.

La pureza de cada disolución madre (lote) puede determinarse mediante espectroscopía visible y ultravioleta, y también usando espectrometría de masas. La detección y cuantificación finales puede realizarse mediante espectrofluorimetría. Este último método analítico para detección cuantitativa, es específico para todas las ficotoxinas, tales como neosaxitoxina, saxitoxina y gonyaulatoxinas (Lagos, 1998. Microalgal blooms: a global issue with negative impact in Chile. Biol. Res. 31: 375-386).

## Ejemplos

**Ejemplo 1:** Ficotoxinas obtenidas y purificadas a partir de *Aphanizomenon gracile* mantenida en cultivos continuos en condiciones controladas.

Como ya se ha indicado, en cultivos de *Aphanizomenon gracile* que usa un único clon seleccionando, la neosaxitoxina es la principal ficotoxina producida. En este caso particular, este clon también produce una cantidad menor de saxitoxina.

La producción de neosaxitoxina a partir de la cianobacterias *Aphanizomenon gracile* se realizó a partir de una cantidad inicial de 10 miligramos de células húmedas de *Aphanizomenon gracile*. El sedimento (obtenido en la etapa a) se sometió al método descrito en la memoria descriptiva, es decir:

b. para 10 mg de sedimento de células, se añadieron 10 ml del mismo volumen en peso de la mezcla de disolventes orgánicos en fase acuosa (cloroformo:metanol; 1:1 + ácido acético 50 mM en una proporción del 50% con la mezcla anterior), para destruir la pared celular y la membrana citoplasmática, en un medio levemente ácido (pH 5,0).

c. Las células lisadas de la etapa b se someten a una extracción en frío y separación de fases (orgánica/acuosa).

d. La fase acuosa extraída según de la etapa c, se concentra 10 veces en volumen (se obtiene una décima parte del volumen inicial), utilizando por ejemplo un evaporador rotatorio a temperatura ambiente.

e. El concentrado se centrifuga a 20.000 x g durante 30 minutos.

5 f. Se hacen pasar 2 ml del sobrenadante de la centrifugación a través de una columna de tierra de diatomeas. Esta columna se lava con 10 veces su volumen, (en este caso 20 ml) con ácido acético 50 mM. Después del lavado, se extrae la neosaxitoxina retenida en la columna con 5 ml de una mezcla de extracción alcohólica (etanol:agua:ácido acético 5 mM; 2:1:1 vol/vol/vol).

10 g. Se hace pasar el eluato de la columna obtenido en la etapa f a través de columnas de carbón activado, que entonces se lavan con agua destilada para eliminar los pigmentos e impurezas retenidos. En las columnas se retienen las ficotoxinas y se eluyen con 10 ml de una mezcla de elución alcohólica (etanol:agua:ácido acético 1 mM; 3:2:1 vol/vol/vol) pH 5.

15 h. Se hace pasar el eluato a través de una columna de tierra de diatomeas y se lava con ácido acético 50 mM. Posteriormente, se eluye la toxina de la columna con una mezcla de 5 ml de cloroformo:metanol:agua; 1:1:1 vol/vol/vol.

i. Se deja el eluato de la segunda columna de tierra de diatomeas en una fase acuosa, evaporando los disolventes orgánicos con un equipo "Speed Vac" (Savant, NY, EE.UU.). Se obtiene un extracto de neosaxitoxina parcialmente purificado.

20 j. Se somete el extracto parcialmente purificado a una HPLC preparativa de exclusión molecular (cromatografía líquida de alta resolución preparativa).

25 Cada reactor después de 2 días de cultivo produce un promedio de 652,4 microgramos de toxina total por cada litro recogido. La proporción de neosaxitoxina/saxitoxina promedio es de 8,47. En porcentajes, se obtiene un promedio del 11,8% de saxitoxina y el 88,2% de neosaxitoxina. El principal objetivo es la producción de neosaxitoxina, que se busca, se aumenta y se protege por ser este compuesto el principio activo patentado en aplicaciones clínicas como fármaco o cosmético. La neosaxitoxina tiene un efecto biológico que es un 25% más potente que el de saxitoxina y también es la ficotoxina más potente descrita hasta ahora.

30 Las figuras 1,2 y 4 muestran cromatogramas de series de HPLC detectadas mediante detección fluorescente en línea, que describen un perfil de ficotoxinas producido por la especie *Aphanizomenon gracile*. Las figuras 1 y 2 describen los perfiles de HPLC de fracciones que presentan distintos grados de purificación a partir de extractos de *Aphanizomenon gracile*. Nuevamente, es importante recordar que estos son cromatogramas de cromatografías líquidas de alta resolución analíticas que se realizan para detectar y cuantificar ficotoxinas. No son cromatogramas preparativos del procedimiento industrial. Estos cromatogramas sólo son útiles para mostrar el grado de pureza y el contenido de cada fracción purificada.

35 La figura 1 muestra un cromatograma de un extracto no purificado de *Aphanizomenon gracile* realizado para conocer y cuantificar el perfil de ficotoxinas presentes en este extracto original. El cromatograma muestra un perfil simple con proporciones principales de neosaxitoxina y menor cantidad de saxitoxina (menos del 13%).

40 La figura 2 muestra la purificación de 10 microlitros de un extracto de *Aphanizomenon gracile* en cultivo continuo y en condiciones controladas purificado parcialmente mediante cromatografía líquida de alta resolución preparativa de exclusión molecular (separación por tamaño molecular). En este extracto purificado parcialmente ya está presente un pico a  $R_t = 9,373$  minutos que satura el cromatograma y corresponde a neosaxitoxina, indicando la presencia de gran cantidad de neosaxitoxina en esta fracción.

45 La figura 4 muestra una muestra de neosaxitoxina purificada a partir de extractos de cianobacterias *Aphanizomenon gracile* ( $R_t = 4,933$  minutos) que se obtiene en la fracción eluida de HPLC con columnas de intercambio iónico, que corresponde a la última etapa de purificación (etapa final del método anteriormente descrito). Se obtiene un solo pico que corresponde a un solo componente que en este caso es neosaxitoxina pura.

TABLA 2: Producción de neosaxitoxina y saxitoxina en función del número de filamentos y el peso en húmedo del sedimento de *Aphanizomenon gracile*.

neoSTX mM	STX mM	neoSTX µg/ml	STX µg/ml	neoSTX pg/fil.	STX pg/fil	Fil. ciano./ml*
8,98	3,50	2,83	1,05	2,42	0,90	1.170.000,00
13,66	4,91	4,30	1,47	3,44	1,18	1.250.000,00
3,42	1,03	1,08	0,31	1,71	0,49	630.000,00
17,82	4,78	5,61	1,43	9,42	2,41	596.000,00
17,81	4,02	5,61	1,21	13,17	2,83	426.000,00
7,66	1,47	2,41	0,44	4,94	0,91	488.000,00
10,87	2,19	3,42	0,66	10,25	1,97	334.000,00
10,52	2,07	3,31	0,62	4,38	0,82	756.000,00
10,77	1,96	3,39	0,59	7,47	1,30	454.000,00
17,24	2,99	5,43	0,90	13,12	2,16	414.000,00
5,31	0,41	1,67	0,12	5,19	0,38	322.000,00
12,26	2,17	3,86	0,65	9,47	1,59	408.000,00
9,84	1,94	3,10	0,58	17,42	3,27	178.000,00

STX: saxitoxina

neoSTX: neosaxitoxina

Fil. ciano.: filamentos de cianobacterias

\* Los filamentos de cianobacterias corresponden a asociaciones de 20 a 100 células de cianobacterias. Estas cianobacterias forman filamentos en disolución y estos filamentos se cuentan usando la ampliación de un microscopio de fase invertida.

5 Los rendimientos obtenidos corresponden a una producción sorprendente no esperada de ficotoxinas puras (neosaxitoxina y saxitoxina) por miligramo de cianobacteria húmeda, cuando se compara con la producción de filamentos y sedimentos de cianobacterias en las condiciones de cultivo habituales descritas hasta ahora en frascos de cultivo pequeños sin microaeración continua y con ciclos de luz:día y sin luz:noche.

10 En el ejemplo descrito en este caso, las cianobacterias están siempre en fase de crecimiento logarítmico, con iluminación permanente las 24 horas del día y con recogida permanente de cianobacterias, induciendo un crecimiento permanente, mediante el aporte de nutrientes nuevos en un volumen que es equivalente al volumen recogido en cada recogida.

**Ejemplo 2:** Ficotoxinas obtenidas y purificadas a partir de *Cylindrospermopsis raciborskii* mantenida en cultivos continuos en condiciones controladas.

15 Se cultivó la cianobacteria *Cylindrospermopsis raciborskii* según el método de cultivo continuo, masivo, semiautomático, en condiciones controladas en crecimiento logarítmico permanente, descrito en la solicitud de patente chilena presentada simultáneamente con la presente solicitud por los mismos autores.

El extracto no purificado de la cepa *Cylindrospermopsis raciborskii* presenta un perfil cromatográfico según la figura 6. *Cylindrospermopsis raciborskii* presenta un perfil de toxina, donde predominan GTX3 y GTX2 con los mayores tiempos de retención en la columna (los dos últimos picos a la derecha, respectivamente).

20 El extracto de *Cylindrospermopsis raciborskii* obtenido del cultivo continuo se somete al procedimiento de purificación correspondiente a las etapas mencionadas anteriormente, en las mismas condiciones descritas para el ejemplo 1 y ya en la etapa de HPLC preparativa de exclusión molecular, se obtienen casi exclusivamente los epímeros GTX3 y GTX2, como se muestra en la figura 7.

25 La fracción final del método de purificación de ficotoxinas a partir de *Cylindrospermopsis raciborskii* tiene solamente GTX3 y GTX2, como se muestra en la figura 8 y pueden recogerse las fracciones que contienen cada gonyaulatoxina para obtener grandes cantidades de GTX3 y GTX2 puras.

**REIVINDICACIONES**

1. Método para la purificación industrial de las ficotoxinas biológicamente activas neosaxitoxina, saxitoxina y gonyaulatoxinas a partir de cianobacterias, comprendiendo dicho método las etapas de:

- 5 a) proporcionar una fuente de ficotoxinas, concretamente un cultivo de clones de cianobacterias, que está separado en un medio de cultivo y un sedimento húmedo de células de cianobacterias o un sedimento congelado de células de cianobacterias;
- b) lisar dicho sedimento usando homogeneización, extracción con disolventes, molino de bolas, ciclos de congelación/descongelación, ultrasonificación o lisis enzimática;
- 10 c) someter el material procedente de la lisis de células de cianobacterias obtenido en la etapa b) a extracción en frío y separación de fases orgánica/acuosa, concretamente un 50% en volumen de una mezcla de cloroformo:metanol 1:1 y un 50% en volumen de ácido acético 1 mM, a pH de entre 4 y 5, y posteriormente separar las fases orgánica y acuosa usando cloroformo:metanol 1:1 en volumen, lo que se repite entre 1 y 5 veces;
- d) obtener un concentrado de la fase acuosa obtenida en la etapa (c);
- e) centrifugar el concentrado obtenido en la etapa d) para obtener un sobrenadante;
- 15 f) hacer pasar el sobrenadante a través de una columna de tierra de diatomeas, y lavar la columna con una disolución de lavado; luego obtener un eluato de ficotoxina con una disolución de elución;
- g) hacer pasar el eluato de la etapa anterior a través de columnas de carbón activado, y luego lavar dichas columnas de carbón activado con agua destilada para eliminar los pigmentos e impurezas retenidos; las ficotoxinas se eluyen con una disolución de elución;
- 20 h) hacer pasar el eluato de la etapa anterior nuevamente a través de una columna de tierra de diatomeas; las columnas se lavan con una disolución como en la etapa f), y las ficotoxinas se eluyen con una disolución de extracción;
- i) dejar el eluato de la etapa anterior en una fase acuosa, evaporando los disolventes orgánicos, para obtener un extracto de ficotoxina parcialmente purificado;
- 25 j) someter el extracto parcialmente purificado de la etapa anterior a cromatografía líquida de alta resolución preparativa en varias etapas para obtener la ficotoxina biológicamente activa pura.

2. Método según la reivindicación 1, en el que la extracción de la etapa (c) se repite 3 veces.

30 3. Método según la reivindicación 1, en el que la disolución de lavado de las etapas f) y h) es ácido acético 50 mM, en la etapa (f) las columnas se lavan con de 5 a 15 veces su volumen y la disolución de elución es una mezcla de extracción alcohólica.

4. Método según la reivindicación 1, en el que la disolución de elución de la etapa g) es una mezcla de elución alcohólica.

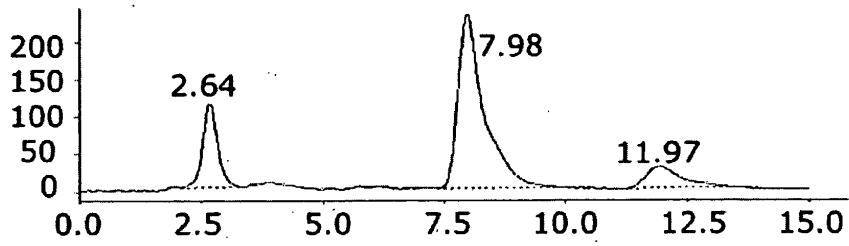
5. Método según la reivindicación 1, en el que la disolución de la etapa h) es una mezcla de cloroformo:metanol:agua 1:1:1 vol/vol/vol.

35 6. Método según la reivindicación 1, en el que las etapas cromatográficas de la etapa j) son secuencialmente exclusión molecular, intercambio aniónico, intercambio catiónico y exclusión molecular.

7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que las cianobacterias productoras de ficotoxinas pertenecen a los géneros *Cylindrospermopsis sp*, *Mycrocystis sp*, *Anabaena sp*, *Gomphosphaeria sp*, *Oscillatoria sp*, *Aphanizomenon sp* y *Lyngbya wollei*.

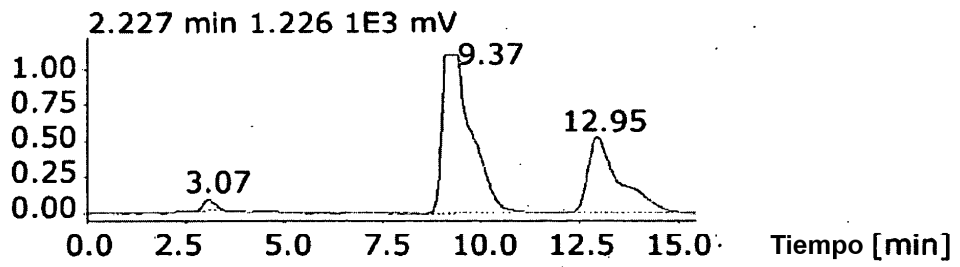
40

Fig. 1



	Rt	Area
2	7.980	8828.1702
3	11.970	1422.1239

Fig. 2



3.067	1476.1705
9.373	57577.6740
12.953	28441.3271

Fig. 3

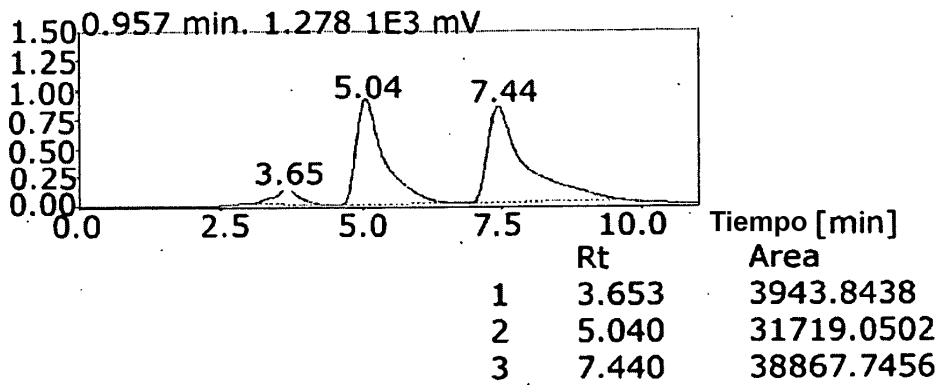


Fig. 4

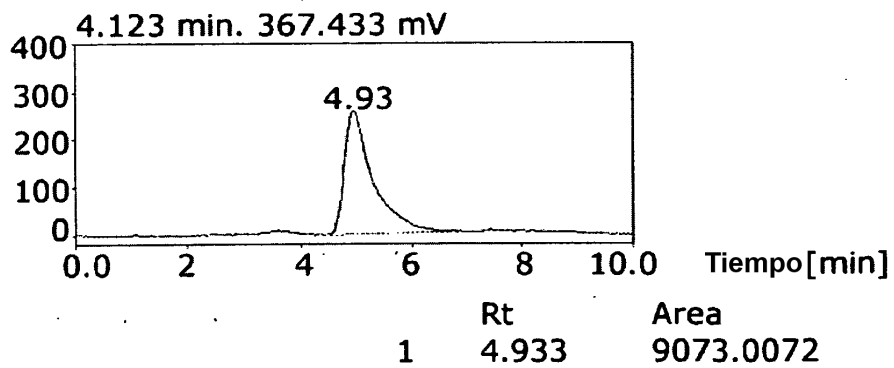
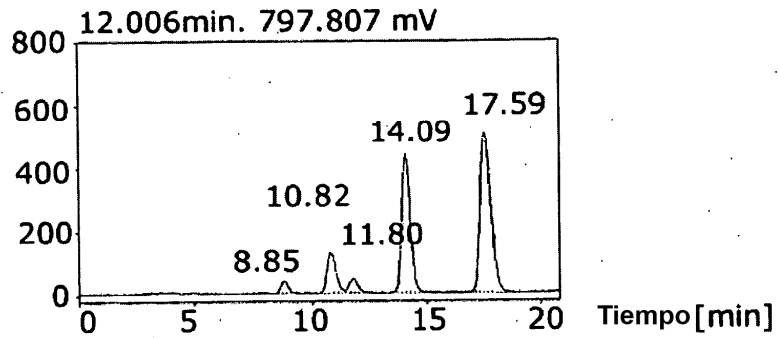




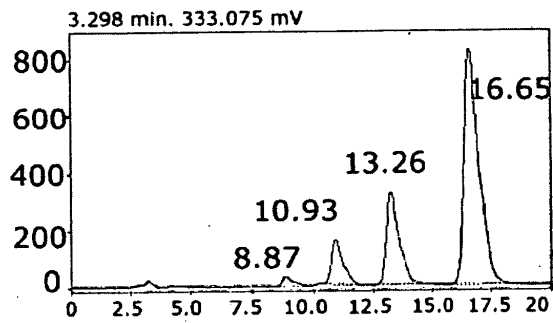
Fig. 5



STD NLG 9/13  
10µL

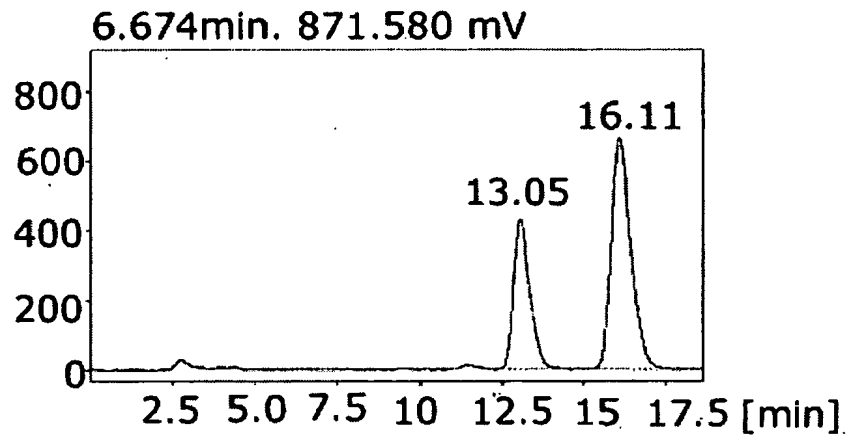
1	8.847	765.0926
2	10.820	3323.3249
3	11.800	1208.5950
4	14.087	11392.8204
5	17.587	16678.3203

Fig. 6



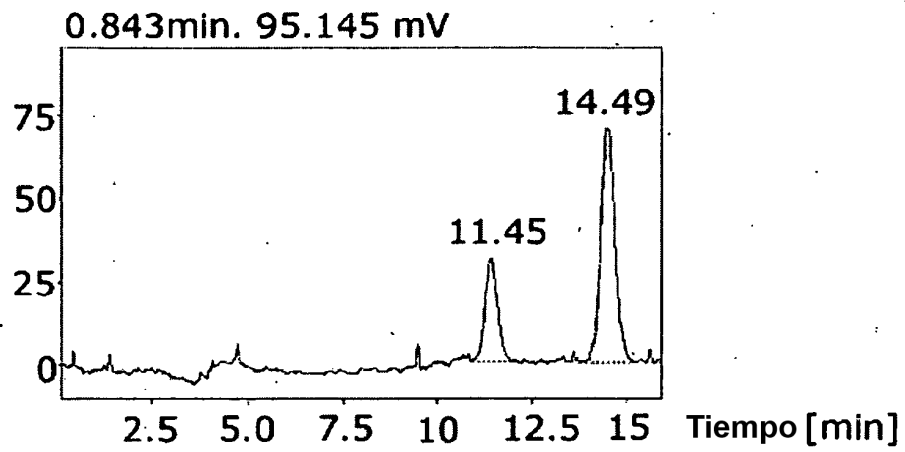
1	8.873	1016.8684
2	10.927	5262.1901
3	13.260	11837.7101
4	16.647	36388.1650

Fig. 7



13.053	15184.1044
16.113	27008.5695

Fig. 8



10 $\mu$ l, Botella 4 500 ml GTX 3/2  
pH 3.0 (NaCl 0.9%), DIL 1/3000  
05 Octubre 2005

Fig. 9

Gráfico de elución de una Cromatografía Preparativa A)

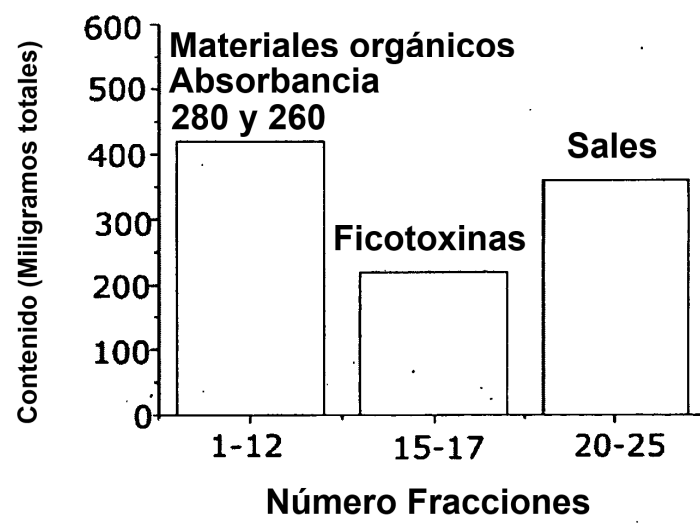


Fig. 10

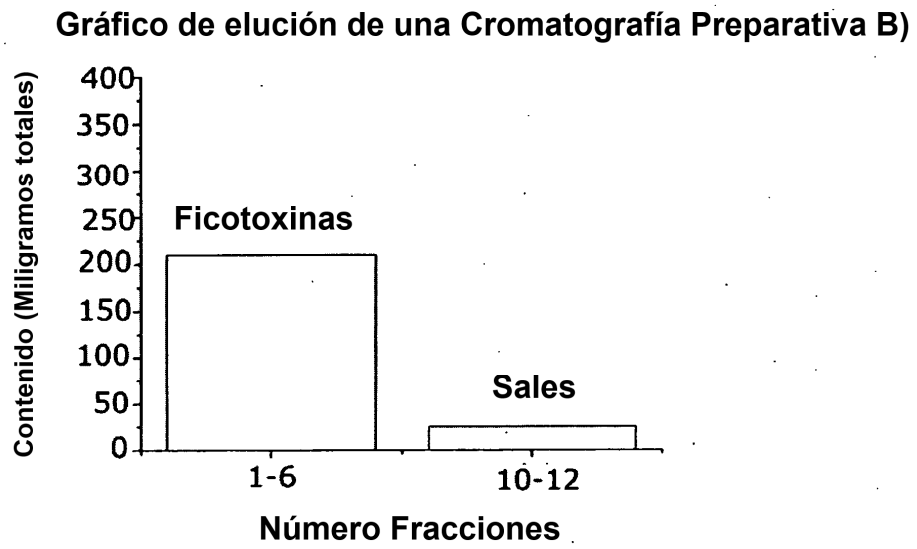


Fig. 11

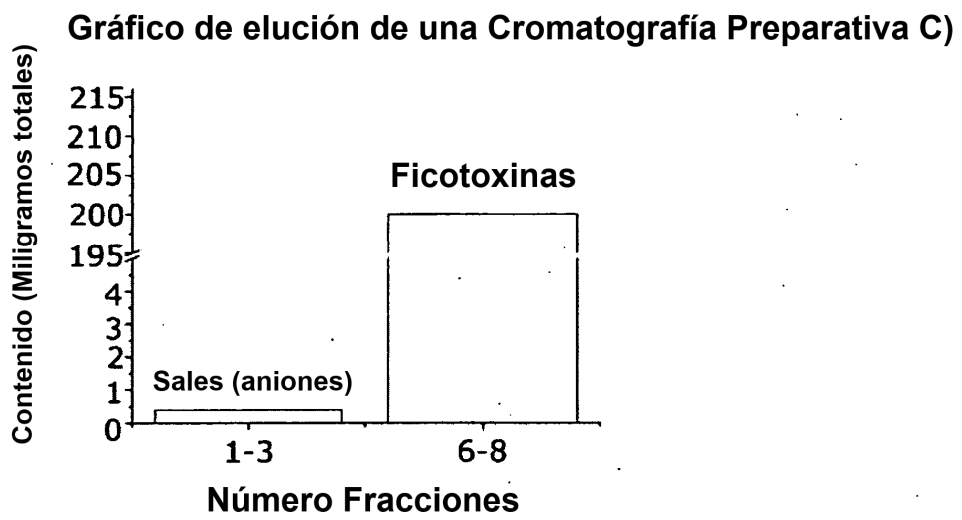


Fig. 12

Gráfico de elución de una Cromatografía Preparativa D)

