

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 957**

51 Int. Cl.:

G01N 33/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.06.2015 PCT/EP2015/063152**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.12.2015 WO15189378**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2015 E 15728849 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.01.2018 EP 3155424**

54 Título: **Desenmascaramiento de endotoxinas en disolución**

30 Prioridad:

**12.06.2014 EP 14172158
13.06.2014 US 201462011868 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.04.2018

73 Titular/es:

**HYGLOS INVEST GMBH (100.0%)
Am Neuland 1
82347 Bernried, DE**

72 Inventor/es:

BUCHBERGER, BERND

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 662 957 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

Desenmascaramiento de endotoxinas en disolución

La presente invención se refiere al desenmascaramiento de endotoxinas en composiciones, preferiblemente composiciones farmacéuticas, de modo que las endotoxinas presentes pero indetectables se hacen detectables.

5 Específicamente, la invención se refiere a un método de desenmascaramiento de una endotoxina en una composición. La invención se refiere además a un método de detección de una endotoxina en una composición. La invención se refiere además a un kit para desenmascarar una endotoxina en una composición. La invención se refiere además al uso de un modulador que puede desenmascarar una endotoxina, por ejemplo mediante la liberación de una endotoxina de un complejo entre dicha endotoxina y un enmascarador de endotoxinas, para desenmascarar una endotoxina en una composición.

Antecedentes de la invención

15 Las endotoxinas forman parte de la membrana externa de la pared celular de bacterias Gram negativas. Las endotoxinas se asocian invariablemente con bacterias Gram negativas independientemente de si los organismos son patógenos o no. Aunque el término "endotoxina" se usa ocasionalmente para referirse a cualquier toxina bacteriana asociada a células, en bacteriología se reserva de manera apropiada para referirse al complejo de lipopolisacárido (LPS) asociado con la membrana externa de patógenos Gram negativos tales como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis* y *Vibrio cholerae*.

20 La presencia de endotoxinas en composiciones acuosas es un problema complicado que amenaza y/o limita gravemente la aplicación de muchas composiciones, en particular si están previstas para el uso farmacéutico. Esto es especialmente cierto en composiciones que comprenden productos proteicos, por ejemplo productos proteicos recombinantes. Las endotoxinas que se producen de manera natural, especialmente las endotoxinas que pertenecen a la clase de compuestos caracterizados como lipopolisacáridos (LPS), son moléculas producidas por determinados tipos de bacterias, por ejemplo bacterias Gram negativas. Generalmente, las endotoxinas tales como los LPS comprenden un O-antígeno de polisacárido extenso, un polisacárido antigénico de núcleo que incluye un componente de núcleo exterior y un componente de núcleo interior, y un dominio de lípido A que comprende amidas alifáticas y ésteres de ácidos alifáticos. Tales endotoxinas se encuentran en la membrana externa de bacterias Gram negativas, donde contribuyen a la integridad estructural bacteriana protegiendo al organismo del ataque químico. Tales endotoxinas aumentan la carga negativa de la membrana celular de estas bacterias, y ayudan a estabilizar la estructura de la membrana global. Tales endotoxinas provocan fuertes respuestas de animal normales, por ejemplo de sistemas inmunitarios humanos, porque el suero normal contiene receptores de lipooligosacáridos (LOS) que normalmente dirigen los efectos citotóxicos del sistema inmunitario frente a patógenos bacterianos invasores que portan tales endotoxinas.

30 Cuando están presentes en la sangre humana en una forma disociada de sus bacterias de origen, las endotoxinas tales como los LPS pueden producir endotoxemia que en casos graves puede conducir a choque séptico. Esta reacción se debe al componente de lípido A de la endotoxina, que puede producir la activación no controlada del sistema inmunitario de mamíferos, produciendo en algunos casos mediadores inflamatorios tales como el receptor de tipo Toll (TLR) 4, que es responsable de la activación celular del sistema inmunitario.

35 Las bacterias, así como las endotoxinas que producen, también son ubicuas. Por ejemplo, se sabe que existen contaminantes de endotoxinas en las tuberías y los tubos flexibles de los sistemas de suministro de agua, incluyendo los de laboratorios e instalaciones para preparar formulaciones farmacéuticas. Las superficies de recipientes tales como fermentadores y objetos de vidrio usados en el procedimiento de formulación de productos farmacéuticos también se contaminan frecuentemente. Además, dado que los seres humanos portan bacterias y por tanto endotoxinas en sus cuerpos, el personal de tales instalaciones en las que se formulan productos farmacéuticos también representa una posible fuente de contaminantes de endotoxinas.

45 Naturalmente, además de lo anterior, las propias bacterias Gram negativas se usan ampliamente en la producción, entre otros, de proteínas terapéuticas recombinantes, por lo que siempre existe el peligro de que también pueda surgir también contaminación por endotoxinas de composiciones acuosas, por ejemplo de formulaciones farmacéuticas, que contienen tales proteínas terapéuticas, directamente a partir de tales bacterias usadas en el procedimiento de producción.

50 Para proteger frente a la posible incorporación peligrosa de contaminantes de endotoxinas, cualquiera que sea su origen, normalmente deben tomarse medidas para excluir las endotoxinas de todas las etapas y productos usados en el procedimiento de producción de tales proteínas antes de que puedan administrarse tales disoluciones para fines terapéuticos. De hecho, la exclusión y/o la retirada y la ausencia verificable de cualquier traza de endotoxina (detectable) están entre los requisitos que deben cumplirse cuando se busca la aprobación reguladora para cualquier nuevo producto terapéutico, en particular los que contienen productos producidos en bacterias, o que han entrado en contacto con bacterias en cualquier momento en el procedimiento de producción (véase por ejemplo EMEA, Q6B, Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products; 2.1.4 Purity, Impurities and Contaminants; Contaminants; 4.1 .3 Purity and impurities; 2) FDA, Q6B, Specifications: Test

Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products; II.A.4. Purity, Impurities and Contaminants; IV.A.3. Purity and Impurities). Por ejemplo, debe hacerse que todos los recipientes que contienen y/o que transfieren disoluciones destinadas para la administración eventual estén libres de endotoxinas antes de entrar en contacto con la disolución. Se usa un horno de despirogenización para este fin, en el que se requieren temperaturas de más de 200°C para descomponer endotoxinas. Basándose en el material de acondicionamiento primario como jeringas o viales, una temperatura del vidrio de 250°C y un tiempo de mantenimiento de 30 minutos son típicos para lograr una reducción de los niveles de endotoxina en un factor de 1000. Habitualmente, los líquidos no pueden despirogenizarse por calor, por lo que se usan diferentes métodos, tales como cromatografía (por ejemplo de intercambio aniónico), extracción de fases (por ejemplo, Triton X-114), filtración (por ejemplo ultrafiltración).

Un ensayo común para detectar la actividad de las endotoxinas es el ensayo del lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL), que utiliza sangre del cangrejo herradura. Niveles muy bajos de endotoxina pueden producir la coagulación por el lisado de *Limulus* debido a una potente amplificación a través de una cascada enzimática. Sin embargo, debido a la población cada vez más escasa de cangrejos herradura, se han realizado esfuerzos para desarrollar ensayos alternativos, por ejemplo de factor C recombinante, para detectar la presencia de endotoxinas en disolución. El más prometedor de tales métodos son los ensayos de afinidad-adsorción ligados a enzimas, que usan una fase sólida para la captura de endotoxinas y la posterior detección mediante la versión recombinante de una proteína en el ensayo LAL, el factor C. El kit EndoLISA® es uno de tales ensayos de afinidad-adsorción.

Sin embargo, incluso las mejores pruebas disponibles para detectar la presencia de pirógenos, tales como endotoxinas, en particular LPS, a menudo no pueden detectar LPS en disolución. Esto implica el peligro de que disoluciones que se piensa de manera razonable (en ausencia de cualquier endotoxina detectable) que están libres de endotoxinas, de hecho contienen endotoxinas que simplemente están enmascaradas para hacerse indetectables. Tales disoluciones, por ejemplo formulaciones farmacéuticas, no se excluirán de la aprobación reguladora (al menos no debido a que contienen endotoxinas), porque según todos los aspectos de diagnóstico, estas disoluciones están libres de endotoxinas, cumpliendo por tanto (o al menos pareciendo que cumplen) este requisito regulador. Sin embargo, claramente, la administración de tales disoluciones aparentemente libres de endotoxinas a sujetos corre el riesgo de desencadenar los tipos de reacciones mencionados anteriormente. En tales casos, la presencia de endotoxinas enmascaradas en tales disoluciones puede conocerse demasiado tarde, una vez que los sujetos ya han desarrollado los tipos de reacciones adversas y potencialmente mortales descritas anteriormente. Además, desde un punto de vista higiénico, las autoridades reguladoras sobre fármacos le otorgan gran valor a conocer positivamente qué sustancias están contenidas en las composiciones farmacéuticas y cuáles no. Esto es cuestión en última instancia de la capacidad para detectar de manera fiable todos los componentes de una composición dada, y la capacidad de alguien para creer los resultados obtenidos en referencia tanto a la presencia como a la ausencia de todas las sustancias sometidas a prueba.

Debe indicarse que los términos “enmascaramiento” y “desenmascaramiento”, en lo que se refiere a las endotoxinas, se han usado con diversos significados en la bibliografía. Por una parte, la bibliografía usa el término “desenmascaramiento de endotoxinas” o “revelación de endotoxinas” para describir la retirada de endotoxinas de determinadas disoluciones (por ejemplo, disoluciones de proteínas). En este caso, puede detectarse un determinado contenido en endotoxinas antes y después de usar procedimientos comunes para la retirada de endotoxinas (por ejemplo, cromatografía). Cuando las técnicas disponibles son inadecuadas para una retirada completa de endotoxinas de la muestra particular, la endotoxina que no puede retirarse se denomina endotoxina “enmascarada”; cualquier endotoxina que puede retirarse mediante las técnicas disponibles se denomina endotoxina “desenmascarada” o “revelada”. Según este uso del término, endotoxina “enmascarada” indica por tanto endotoxina que no puede retirarse e implica la retirada insuficiente de endotoxina (detectable).

Por otra parte, la bibliografía también usa el término “enmascaramiento de endotoxinas” en el caso de la detección inadecuada de endotoxinas. En este caso, sólo puede detectarse una cantidad fraccional o, en muchos casos, nada de endotoxina en absoluto, aunque estén presentes endotoxinas. Según este uso del término, endotoxina “enmascarada” indica por tanto endotoxina que no puede detectarse y que apenas puede detectarse, e implica detección insuficiente de endotoxinas.

Puede producirse detección inadecuada de endotoxinas en diversas composiciones. Por ejemplo, en disoluciones de proteínas (Petsch *et al.*, *Analytical Biochemistry* 259, 42-47, 1998), productos farmacológicos (J. Chen y K. Williams, *Follow-Up on Low Endotoxin Recovery in Biologies PDA Letter*, Oct. 2013), o incluso en componentes de formulación comunes de productos farmacológicos (J. Reich *et al.*, *Poster: Low Endotoxin Recovery in Common Protein Formulations*, 6th Workshop on Monoclonal Antibodies, Basilea, Suiza, 2013; J. Reich *et al.*, *Poster: Low Endotoxin Recovery in Biologies: Case Study - Comparison of Natural Occurring Endotoxin (NOE) and Commercially Available Standard Endotoxin*, PDA Annual meeting, San Antonio, EE.UU., 2014).

El documento WO 2009/152384 A1 da a conocer composiciones teóricas definiendo categorías de componentes en las composiciones y luego proporcionando listas de componentes dentro de cada categoría. Este documento no da a conocer ninguna composición individualizada que comprenda una proteína, un alcohol C8-C16 y LPS.

De manera similar, el documento WO 02/057789 A2 da a conocer composiciones teóricas definiendo categorías de

componentes en las composiciones y luego proporcionando listas de componentes dentro de cada categoría. Este documento no da a conocer ninguna composición individualizada que comprenda una proteína, un alcohol C8-C16 y LPS.

5 El documento EP 1 917 976 A1 da a conocer determinadas composiciones, pero no da a conocer ninguna composición que comprenda una proteína, un alcohol C8-C16 y LPS.

Por tanto, existe una fuerte motivación para proporcionar modos en los que pueden desenmascarse todas las endotoxinas presentes en composiciones, incluyendo endotoxinas que son indetectables debido a que están enmascaradas por otros componentes de composición determinados, de manera que se hagan detectables. Proporcionar un modo para desenmascarar y/o detectar endotoxinas indetectables hasta ahora en una composición ayudaría enormemente a potenciar la seguridad del paciente. Un objetivo de la presente invención es abordar tales necesidades.

Breve resumen de la invención

15 La presente invención se refiere a una composición acuosa que comprende una proteína y un compuesto alifático con C₈-C₁₆ como cadena principal y compuesto que tiene preferiblemente una sustitución con uno o más heteroátomos.

La composición acuosa puede ser preferiblemente una composición farmacéutica que contiene una proteína a la que se añade el compuesto alifático. La adición del compuesto alifático ayuda a mejorar la capacidad de detección de una posible contaminación de la composición por un LPS. Tal como se establece en otras partes de esta solicitud, los LPS podrían escapar a la detección por pruebas de endotoxinas convencionales porque están enmascarados por algunos constituyentes de composiciones que contienen proteínas.

Según una realización preferida, el compuesto alifático es un compuesto ramificado con al menos una sustitución en la cadena principal en el que la sustitución puede seleccionarse de grupos metilo, etilo, propilo y butilo.

La cadena principal del compuesto alifático es tal como se define en otra parte en el presente documento.

25 Según una realización preferida adicional, la cadena principal se selecciona de un alquilo C₈-C₁₆, alqueno C₈-C₁₆ y alquino C₈-C₁₆. La cadena principal puede contener uno o más dobles enlaces y/o uno o más triples enlaces, mientras que una cadena de alquilo saturada es la realización más preferida.

Según una realización preferida adicional, el heteroátomo que puede formar parte del compuesto alifático se selecciona de O, S y N, mientras que O es la sustitución más preferida.

30 Un compuesto alifático preferido adicional se selecciona de un alcohol, que es preferiblemente un alcohol no ramificado, más preferiblemente un 1-alcohol y lo más preferiblemente 1-dodecanol.

Se supone que el compuesto alifático estabiliza una molécula de LPS potencialmente contaminante de forma que hace que los LPS sean más propensos a la detección por kits de prueba de endotoxina convencionales tales como el EndoLISA® de Hyglos GmbH.

35 Las composiciones que podrían hacerse más propensas a la detección de endotoxinas a menudo contienen detergentes que pueden seleccionarse de un detergente aniónico, un detergente catiónico, un detergente no iónico, un detergente anfótero y cualquier combinación de los mismos. Los detergentes preferidos que pueden usarse en tales composiciones pueden seleccionarse de: un detergente aniónico que puede elegirse del grupo que consiste en: alquilsulfatos, preferiblemente laurilsulfato de amonio o laurilsulfato de sodio (SDS); alquiléter sulfatos, preferiblemente lauril éter sulfato de sodio o miristil éter sulfato de sodio; sulfato de colesterol; sulfonatos, preferiblemente dodecylbencenosulfonato, laurilsulfoacetato de sodio o xilenosulfonato; alquilsulfosuccinatos, preferiblemente laurilsulfosuccinato de disodio; sulfóxidos, preferiblemente dodecilmethylsulfóxido; fosfatos, preferiblemente trilauril éter-4 fosfato; y carboxilatos, preferiblemente estearato de sodio o lauroilsarcosinato de sodio;

45 un detergente catiónico que puede elegirse del grupo que consiste en: aminas primarias; aminas secundarias; aminas terciarias; y cationes de amonio cuaternario tales como sales de alquiltrimetilamonio (preferiblemente bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB); o cloruro de cetiltrimetilamonio (CTAC)); cloruro de cetilpiridinio (CPC); detergentes de amonio cuaternario, preferiblemente fosfato de tris[2-(2-hidroxietoxi)etil]-octadecil-amonio (Quaternium 52); y etoxilato de hidroxietilcelulosa, cuaternizado (Polyquaternium-10);

50 un detergente no iónico que puede elegirse del grupo que consiste en: ésteres alquílicos de sorbitano de polioxietilenglicol (polisorbatos), preferiblemente polisorbato 20 (Tween-20), polisorbato 40, polisorbato 60 o polisorbato 80 (Tween-80); alquil éteres de polioxietilenglicol; alquil éteres de polioxipropilenglicol; alquil éteres de glucósido; éteres de octilfenol de polioxietilenglicol; éteres de alquilfenol de polioxietilenglicol; ésteres alquílicos de glicerol; ésteres alquílicos de sorbitano; copolímeros de bloque de polietilenglicol y polipropilenglicol; cocamida MEA; esteroides, preferiblemente colesterol; ciclodextrinas; poloxámeros, preferiblemente polímeros de bloque Pluronic; y

cocamida DEA;

5 un detergente anfótero que puede elegirse del grupo que consiste en: CHAPS (3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato); sultaínas, preferiblemente cocamidopropil-hidroxisultaína; betaínas, preferiblemente cocamidopropil-betaína; óxidos de amino, preferiblemente óxido de palmitamina, óxido de laurilamina y óxido de amina de fórmula general $R^3N^+O^-$, en la que R^3 es alquilo C_8-C_{18} , alquenilo C_8-C_{18} , alquinilo C_8-C_{18} o lecitina.

10 Según una realización preferida adicional, el detergente se selecciona de un polisorbato, preferiblemente polisorbato 20 y polisorbato 80, un poloxámero, preferiblemente poloxámero 188, un octoxinol, preferiblemente un octoxinol 9, un óxido de alquilamina, preferiblemente óxido de laurilamina, una sal de amonio cuaternario, preferiblemente fosfato de tris[2-(2-hidroxietoxi)etil]-octadecil-amonio, un alquil-fosfato, preferiblemente trilauril éter-4-fosfato, y un estearato, preferiblemente estearato de sodio.

15 En una composición acuosa preferida, la proteína se elige de un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una hormona, una enzima, una proteína de fusión, un conjugado de proteína y cualquier combinación de los mismos, proteínas que se usan frecuentemente como el principio activo de preparaciones farmacéuticas donde debe tenerse un cuidado específico en que los LPS no queden sin detectarse en el control de calidad de los productos farmacéuticos.

En una realización preferida adicional, el fragmento de anticuerpo se selecciona de un Fab, un Fab', un F(ab')₂ y un Fv, un anticuerpo de cadena sencilla y cualquier combinación de los mismos.

20 En una realización preferida adicional, la composición acuosa, además del principio activo farmacéutico, que puede ser la proteína mencionada anteriormente, puede contener una proteína adicional seleccionada de una albúmina, que es preferiblemente albúmina sérica humana, albúmina sérica bovina y/u ovoalbúmina. La proteína adicional puede ser de ayuda en hacer que una posible contaminación por LPS sea más propensa a la detección por pruebas de endotoxinas convencionales tales como las mencionadas anteriormente.

25 En una realización preferida adicional, la composición acuosa puede comprender un agente caotrópico, un catión o una combinación de los mismos. Los mismos componentes también pueden ayudar a llevar una posible contaminación por LPS a una forma que es más propensa a la detección por una prueba de endotoxinas de Hyglos GmbH.

Según una realización preferida adicional, el agente caotrópico se selecciona de urea, cloruro de guanidinio, butanol, etanol, perclorato de litio, acetato de litio, cloruro de magnesio, fenol, propanol y tiourea.

30 Según una realización preferida adicional, el catión es un catión divalente, preferiblemente seleccionado de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} y Zn^{2+} .

Según una realización preferida adicional, la proteína adicional, que puede ser una albúmina, está presente en una concentración en el intervalo de desde 0,1-20 mg/ml, preferiblemente en el intervalo de desde 1-10 mg/ml, más preferiblemente en una cantidad de 10 mg/ml.

35 En una realización preferida adicional, el compuesto alifático está presente en la concentración de desde 0,01-100 mM, preferiblemente en una concentración de desde 0,1-10 mM. Este intervalo de concentración se prefiere en particular para un 1-alcanol, preferiblemente 1-dodecanol.

En una realización preferida adicional, el detergente está presente en una concentración de desde el 0,001-1,0% en peso, preferiblemente el 0,05-0,5% en peso, preferiblemente desde el 0,02-0,2% en peso.

40 En una realización preferida adicional, el agente caotrópico está presente en una concentración de desde 1 mM-1 M, preferiblemente desde 25-200 mM, preferiblemente desde 10 mM-100 mM.

En una realización preferida adicional, el catión divalente está presente en una concentración de desde 1-400 mM, preferiblemente en una concentración de desde 10-200 mM, más preferiblemente en una concentración de desde 50-100 mM.

45 En una realización preferida adicional, el pH de la composición está en el intervalo de desde 2-12, preferiblemente en el intervalo de desde pH 5-10.

En una realización preferida adicional, la composición contiene proteína de factor C, que es un componente usado en ensayos de endotoxinas convencionales.

En una realización preferida, la proteína de factor C es una proteína de factor C recombinante.

50 Una composición acuosa muy preferida comprende una proteína, preferiblemente un anticuerpo, en combinación con un 1-alcanol, preferiblemente 1-dodecanol en un intervalo de concentración de desde 0,1-10 mM, un detergente según la reivindicación 8 en un intervalo de concentración de desde el 0,002-0,2% en peso, un catión divalente, preferiblemente Ca^{2+} , en un intervalo de concentración de desde 10-200 mM, y un pH de desde 5 hasta 10.

Una composición acuosa muy preferida adicional es tal como se expuso anteriormente en el párrafo inmediatamente anterior, y que comprende además un agente caotrópico, preferiblemente cloruro de guanidinio, en el intervalo de concentración de desde 10 mM-100 mM.

5 En las composiciones anteriores, los LPS, si están presentes, serán propensos a la detección por ensayos de endotoxinas convencionales tales como el EndoLisa de Hyglos GmbH.

10 Una divulgación se refiere a un método de desenmascaramiento de una endotoxina en una composición, preferiblemente una composición farmacéutica, que comprende un enmascarador de endotoxinas y se sospecha que comprende dicha endotoxina, comprendiendo dicho método la etapa de añadir a dicha composición un modulador que puede desenmascarar dicha endotoxina, por ejemplo mediante la liberación de dicha endotoxina, si está presente, de un complejo entre dicha endotoxina y dicho enmascarador de endotoxinas. La composición farmacéutica será en la mayoría de los casos una composición acuosa.

15 Una divulgación adicional se refiere a un método de detección de una endotoxina en una composición, preferiblemente una composición farmacéutica, que comprende un enmascarador de endotoxinas y se sospecha que comprende dicha endotoxina, comprendiendo dicho método las etapas de añadir a dicha composición un modulador que puede desenmascarar dicha endotoxina, por ejemplo mediante la liberación de dicha endotoxina, si está presente, de un complejo entre dicha endotoxina y dicho enmascarador de endotoxinas; y detectar dicha endotoxina por medio de un método de detección. La composición farmacéutica será en la mayoría de los casos una composición acuosa.

20 En determinadas realizaciones, los métodos anteriores de desenmascaramiento y/o detección pueden comprender además la etapa de añadir a dicha composición un agente que influye en la estabilidad de los enlaces de hidrógeno en disolución. En determinadas realizaciones, es preferible añadir dicho agente que influye en la estabilidad de los enlaces de hidrógeno en disolución a dicha disolución antes de la adición de dicho modulador.

25 Una divulgación adicional se refiere a un kit para desenmascarar una endotoxina en una composición, preferiblemente una composición farmacéutica, que comprende un enmascarador de endotoxinas y se sospecha que comprende dicha endotoxina, comprendiendo dicho kit a) un modulador que puede desenmascarar dicha endotoxina, por ejemplo mediante la liberación de dicha endotoxina de un complejo entre dicha endotoxina y dicho enmascarador de endotoxinas; y b) un agente que influye en la estabilidad de los enlaces de hidrógeno en disolución; en el que los componentes (a) y (b) están en envases iguales o diferentes.

30 Una divulgación adicional se refiere a un uso de un modulador que puede desenmascarar endotoxinas, por ejemplo mediante la liberación de una endotoxina de un complejo entre dicha endotoxina y un enmascarador de endotoxinas, para desenmascarar una endotoxina en una composición, preferiblemente una composición farmacéutica que se sospecha que comprende dicha endotoxina y dicho enmascarador de endotoxinas.

Otras realizaciones de esta invención resultarán fácilmente evidentes a partir de la siguiente divulgación.

Breve descripción de las figuras

35 La figura 1 ilustra un mecanismo adoptado para servir de base al desenmascaramiento de endotoxinas según una realización de la presente invención. En el supuesto representado en la figura 1, la endotoxina está presente en disolución con un detergente (que puede actuar como enmascarador de endotoxinas), que forma micelas de detergente en las que se incrusta la endotoxina y por tanto queda enmascarada para su detección. La figura 1 muestra esquemáticamente los efectos de añadir un modulador de un único componente que rompe estas micelas, liberando la endotoxina incrustada, a la vez que no forma nuevas micelas por sí mismo. Tras la rotura de las micelas de detergente, el modulador de un único componente sirve entonces como chaperona para la endotoxina liberada, estabilizándola en disolución. Existe un equilibrio entre los restos de endotoxina individuales y agregados, y la detección del agregado de endotoxina avanza basándose en la forma agregada ("Aggregates are the biologically active units of endotoxins". Mueller, M., Lindner, B., Kusomoto, S., Fukase, K., Schromm, A.B. y Seydel, U. (2004) The Journal of Biological Chemistry, Vol. 279, n.º 25, págs. 26307-26313. La endotoxina en la forma mostrada en el panel (a) no es propensa a la detección, mientras que la endotoxina en la forma mostrada en el panel (c) es detectable. El supuesto representado en la figura 1 se comenta en más detalle a continuación.

50 La figura 2 ilustra un mecanismo adoptado para servir de base al desenmascaramiento de endotoxinas según una realización adicional de la presente invención. En el supuesto representado en la figura 2, la endotoxina está presente en disolución con un detergente (que puede actuar como enmascarador de endotoxinas), que forma micelas de detergente en las que se incrusta la endotoxina y por tanto queda enmascarada para su detección. La figura 2 muestra esquemáticamente los efectos de añadir un modulador de dos componentes que comprende componentes proteicos y no proteicos. Se supone que este modulador de dos componentes divide la micela de detergente en la que se insertó y enmascaró previamente la endotoxina. El componente no proteico del modulador estabiliza de manera transitoria la endotoxina fuera de la micela de detergente, mientras que el componente proteico del modulador desestabiliza la micela de detergente uniendo, entre otras, moléculas de detergente. El supuesto representado en la figura 2 se comenta en más detalle a continuación.

- La figura 3 ilustra un mecanismo adoptado para servir de base al desenmascaramiento de endotoxinas según una realización adicional de la presente invención. En el supuesto representado en la figura 3, la endotoxina está presente en disolución con un detergente (que puede actuar como enmascarador de endotoxinas), que forma micelas de detergente en las que se incrusta la endotoxina y por tanto queda enmascarada para su detección. La figura 3 muestra esquemáticamente los efectos de añadir un modulador de múltiples componentes, así como un agente que influye en la estabilidad de los enlaces de hidrógeno. Juntos, el modulador de múltiples componentes y el agente que influye en la estabilidad de los enlaces de hidrógeno desestabilizan la micela de detergente que enmascara inicialmente la endotoxina, y promueven la agregación de endotoxinas de manera que se hace detectable. El supuesto representado en la figura 3 se comenta en más detalle a continuación.
- La figura 4 ilustra un mecanismo adoptado para servir de base al desenmascaramiento de endotoxinas según una realización adicional de la presente invención. En el supuesto representado en la figura 4, la endotoxina está presente en disolución, entre otros, con una proteína. La proteína comprende una hendidura de unión en la que puede unirse la endotoxina de manera estable y por tanto permanecer enmascarada para su detección. La figura 4 muestra esquemáticamente los efectos de añadir un modulador de múltiples componentes de manera que la endotoxina previamente enmascarada se agrega y se hace detectable. El supuesto representado en la figura 4 se comenta en más detalle a continuación.
- La figura 5 ilustra un mecanismo adoptado para servir de base al desenmascaramiento de endotoxinas según una realización adicional de la presente invención. En el supuesto representado en la figura 5, la endotoxina está presente en disolución con una proteína (que puede actuar como enmascarador de endotoxinas). La proteína comprende una hendidura de unión en la que puede unirse la endotoxina de manera estable y por tanto permanecer enmascarada para su detección. La figura 5 muestra esquemáticamente los efectos de añadir un agente que influye en la estabilidad de los enlaces de hidrógeno así como un modulador de múltiples componentes que incluye componentes proteicos y no proteicos. Juntos, estos desestabilizan la endotoxina en su complejo con la proteína de enmascaramiento, estabilizan de manera transitoria la endotoxina fuera del complejo con la proteína de enmascaramiento, y promueven la agregación de la endotoxina liberada, volviéndola detectable. El supuesto representado en la figura 5 se comenta en más detalle a continuación.
- La figura 6 ilustra un mecanismo adoptado para servir de base al desenmascaramiento de endotoxinas según una realización adicional de la presente invención. En el supuesto representado en la figura 6, la endotoxina está presente en disolución con una proteína así como con un detergente (que puede actuar como enmascarador de endotoxinas). La proteína comprende una hendidura de unión en la que puede unirse la endotoxina de manera estable y por tanto permanecer enmascarada para su detección. Además, el detergente forma micelas estables en las que se enmascaran moléculas de endotoxina insertadas de manera estable. La figura 6 muestra esquemáticamente los efectos de añadir un agente que influye en la estabilidad de los enlaces de hidrógeno así como un modulador de múltiples componentes que incluye componentes proteicos y no proteicos. Juntos, estos desestabilizan la endotoxina en su complejo con la proteína de enmascaramiento y/o en la micela de detergente de enmascaramiento, estabilizan de manera transitoria la endotoxina fuera del complejo con la proteína de enmascaramiento y/o en la micela de detergente de enmascaramiento, y promueven la agregación de la endotoxina liberada, volviéndola detectable. El supuesto representado en la figura 6 se comenta en más detalle a continuación.
- La figura 7 es un gráfico que muestra la recuperación en porcentaje de la endotoxina LPS de un enmascarador detergente (polisorbato 20/citrato) usando sistemas moduladores de 1-dodecanol solo, y 1-dodecanol junto con BSA.
- La figura 8 es un gráfico que muestra la recuperación en porcentaje de la endotoxina LPS del enmascarador detergente Triton X-100 usando diversos sistemas moduladores de diversas fuerzas.
- La figura 9 es un gráfico que muestra la recuperación en porcentaje de la endotoxina LPS de diversos sistemas de enmascaramiento de detergente usando una variedad de sistemas moduladores.
- La figura 10 es un gráfico que muestra la recuperación en porcentaje de la endotoxina LPS de un detergente de enmascaramiento (polisorbato 20) dependiente del pH.
- La figura 11 es un gráfico que muestra la recuperación en porcentaje de la endotoxina LPS de un detergente de enmascaramiento (polisorbato 80) dependiente del pH.
- La figura 12 es un diagrama de flujo que muestra un esquema de validación generalizado para determinar y optimizar un procedimiento de enmascaramiento para una composición en cuestión que se sospecha que contiene endotoxinas enmascaradas.
- La figura 13 es una tabla que muestra un esquema de evaluación generalizado para determinar y optimizar un procedimiento de enmascaramiento para una composición en cuestión que se sospecha que contiene endotoxinas enmascaradas.
- La figura 14 es una representación esquemática general de los métodos inventivos en el presente documento, tal como se considera desde el punto de vista del nivel de recuperación de LPS (es decir, de la actividad medida de los LPS) antes y después del enmascaramiento (barras izquierda y central de la figura, respectivamente), así como tras

el desenmascaramiento según los métodos de la presente invención (barra derecha de la figura). Las barras izquierda y central de la figura representan por tanto las circunstancias que prevalecen con frecuencia en las formulaciones farmacéuticas, en las que la endotoxina que está presente en disolución, se hace indetectable por uno o más enmascaradores de endotoxinas. Esta endotoxina puede volverse detectable de nuevo, es decir, puede "rescatarse" de su estado enmascarado, mediante los métodos de la presente invención, que permiten que se detecte la endotoxina previamente enmascarada.

La figura 15 muestra un diagrama genérico que ilustra la dinámica asociada con los métodos de desenmascaramiento descritos en el presente documento. Se muestra la transición de LPS activo (es decir, agregado y por tanto detectable) en la parte más a la izquierda a LPS enmascarado (parte inferior central; no agregado) para varias endotoxinas representativas. Dado que la energía asociada con el "LPS enmascarado" es menor que la asociada con el "LPS activo", el LPS permanece estabilizado en esta forma enmascarada. Los métodos inventivos descritos en el presente documento desestabilizan eficazmente este LPS enmascarado, elevando así su energía hasta un nivel por encima de la del LPS enmascarado, desde donde puede disminuirse de nuevo la energía del LPS para dar la forma agregada (parte más a la derecha del diagrama). Se supone que el modulador de reconfiguración desempeña un papel clave en la mediación de este rescate del LPS de la forma solubilizada (enmascarada) a la agregada (desenmascarada).

General

Se entiende que la descripción general anterior así como la siguiente descripción detallada son a modo de ejemplo y de explicación únicamente y no son limitativas de la invención tal como se reivindica. En esta solicitud, el uso del singular incluye el plural a menos que se indique específicamente otra cosa. En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique otra cosa. Además, el uso del término "que incluye" así como otras formas gramaticales tales como "incluye" y "incluido", no es limitativo. En el mismo sentido, el uso del término "que comprende" así como otras formas gramaticales tales como "comprende" y "comprendido" no es limitativo. Los títulos de sección a lo largo de toda la descripción son únicamente para fines de organización. En particular no se pretende que sean limitativos de las diversas realizaciones descritas en el presente documento, y se entiende que elementos y realizaciones descritos bajo un subtítulo pueden combinarse libremente con elementos y realizaciones descritos bajo otro subtítulo.

En lo anterior, y en la siguiente descripción de las reivindicaciones, se pretende que las características de una cualquiera de las realizaciones puedan combinarse con las de cualquier otra realización. Tales combinaciones de una o más características en una cualquiera de las realizaciones con una o más características en cualquier otra realización pertenecen a la divulgación de la presente solicitud tal como se presenta.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a una composición acuosa que comprende una proteína y un compuesto alifático con C₈-C₁₆ como cadena principal y compuesto que tiene preferiblemente una sustitución con uno o más heteroátomos.

La composición acuosa puede ser preferiblemente una composición farmacéutica que contiene una proteína a la que se añade el compuesto alifático. La adición del compuesto alifático ayuda a mejorar la capacidad de detección de una posible contaminación de la composición por un LPS. Tal como se establece en otras partes de esta solicitud, los LPS podrían escapar a la detección por pruebas de endotoxinas convencionales porque están enmascarados por algunos constituyentes de composiciones que contienen proteínas.

Según una realización preferida, el compuesto alifático es un compuesto ramificado con al menos una sustitución en la cadena principal en el que la sustitución puede seleccionarse de grupos metilo, etilo, propilo y butilo.

La cadena principal del compuesto alifático es tal como se define en otra parte en el presente documento.

Según una realización preferida adicional, la cadena principal se selecciona de un alquilo C₈-C₁₆, alqueno C₈-C₁₆ y alquino C₈-C₁₆. La cadena principal puede contener uno o más dobles enlaces y/o uno o más triples enlaces, mientras que una cadena de alquilo saturada es la realización más preferida.

Según una realización preferida adicional, el heteroátomo que puede formar parte del compuesto alifático se selecciona de O, S y N, mientras que O es la sustitución más preferida.

Un compuesto alifático preferido adicional se selecciona de un alcohol, que es preferiblemente un alcohol no ramificado, más preferiblemente un 1-alcohol y lo más preferiblemente 1-dodecanol.

Se supone que el compuesto alifático estabiliza una molécula de LPS potencialmente contaminante de forma que hace que los LPS sean más propensos a la detección por kits de prueba de endotoxina convencionales tales como el EndoLISA® de Hyglos GmbH.

Las composiciones que podrían hacerse más propensas a la detección de endotoxinas a menudo contienen

- 5 detergentes que pueden seleccionarse de un detergente aniónico, un detergente catiónico, un detergente no iónico, un detergente anfótero y cualquier combinación de los mismos. Los detergentes preferidos que pueden usarse en tales composiciones pueden seleccionarse de: un detergente aniónico que puede elegirse del grupo que consiste en: alquilsulfatos, preferiblemente laurilsulfato de amonio o laurilsulfato de sodio (SDS); alquil-éter sulfatos, preferiblemente lauril éter sulfato de sodio o miristil éter sulfato de sodio; sulfato de colesterol; sulfonatos, preferiblemente dodecylbencenosulfonato, laurilsulfoacetato de sodio o xilenosulfonato; alquilsulfosuccinatos, preferiblemente laurilsulfosuccinato de disodio; sulfóxidos, preferiblemente dodecilmethylsulfóxido; fosfatos, preferiblemente trilauril éter-4 fosfato; y carboxilatos, preferiblemente estearato de sodio o lauroilsarcosinato de sodio;
- 10 un detergente catiónico que puede elegirse del grupo que consiste en: aminas primarias; aminas secundarias; aminas terciarias; y cationes de amonio cuaternario tales como sales de alquiltrimetilamonio (preferiblemente bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB); o cloruro de cetiltrimetilamonio (CTAC)); cloruro de cetilpiridinio (CPC); detergentes de amonio cuaternario, preferiblemente fosfato de tris[2-(2-hidroxietoxi)etil]-octadecil-amonio (Quaternium 52); y etoxilato de hidroxietilcelulosa, cuaternizado (Polyquaternium-10);
- 15 un detergente no iónico que puede elegirse del grupo que consiste en: ésteres alquílicos de sorbitano de polioxietilenglicol (polisorbatos), preferiblemente polisorbato 20 (Tween-20), polisorbato 40, polisorbato 60 o polisorbato 80 (Tween-80); alquil éteres de polioxietilenglicol; alquil éteres de polioxipropilenglicol; alquil éteres de glucósido; éteres de octilfenol de polioxietilenglicol; éteres de alquilfenol de polioxietilenglicol; ésteres alquílicos de glicerol; ésteres alquílicos de sorbitano; copolímeros de bloque de polietilenglicol y polipropilenglicol; cocamida MEA;
- 20 esterol, preferiblemente colesterol; ciclodextrinas; poloxámeros, preferiblemente polímeros de bloque Pluronic; y cocamida DEA;
- 25 un detergente anfótero que puede elegirse del grupo que consiste en: CHAPS (3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato); sultainas, preferiblemente cocamidopropil-hidroxisultaina; betainas, preferiblemente cocamidopropil-betaína; óxidos de amino, preferiblemente óxido de palmitamina, óxido de laurilamina y óxido de amina de fórmula general $R^3N^+O^-$, en la que R^3 es alquilo C_8-C_{18} , alqueno C_8-C_{18} , alquínilo C_8-C_{18} o lecitina.
- 30 Según una realización preferida adicional, el detergente se selecciona de un polisorbato, preferiblemente polisorbato 20 y polisorbato 80, un poloxámero, preferiblemente poloxámero 188, un octoxinol, preferiblemente un octoxinol 9, un óxido de alquilamina, preferiblemente óxido de laurilamina, una sal de amonio cuaternario, preferiblemente fosfato de tris[2-(2-hidroxietoxi)etil]-octadecil-amonio, un alquil-fosfato, preferiblemente trilauril éter-4-fosfato, y un estearato, preferiblemente estearato de sodio.
- 35 En una composición acuosa preferida, la proteína se elige de un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una hormona, una enzima, una proteína de fusión, un conjugado de proteína y cualquier combinación de los mismos, proteínas que se usan frecuentemente como el principio activo de preparaciones farmacéuticas donde debe tenerse un cuidado específico en que los LPS no queden sin detectarse en el control de calidad de los productos farmacéuticos.
- 40 En una realización preferida adicional, el fragmento de anticuerpo se selecciona de un Fab, un Fab', un F(ab')₂ y un Fv, un anticuerpo de cadena sencilla y cualquier combinación de los mismos.
- 45 En una realización preferida adicional, la composición acuosa, además del principio activo farmacéutico, que puede ser la proteína mencionada anteriormente, puede contener una proteína adicional seleccionada de una albúmina, que es preferiblemente albúmina sérica humana, albúmina sérica bovina y/u ovoalbúmina. La proteína adicional puede ser de ayuda en hacer que una posible contaminación por LPS sea más propensa a la detección por pruebas de endotoxinas convencionales tales como las mencionadas anteriormente.
- 50 En una realización preferida adicional, la composición acuosa puede comprender un agente caotrópico, un catión o una combinación de los mismos. Los mismos componentes también pueden ayudar a llevar una posible contaminación por LPS a una forma que es más propensa a la detección por una prueba de endotoxinas de Hyglos GmbH.
- 55 Según una realización preferida adicional, el agente caotrópico se selecciona de urea, cloruro de guanidinio, butanol, etanol, perclorato de litio, acetato de litio, cloruro de magnesio, fenol, propanol y tiourea.
- Según una realización preferida adicional, el catión es un catión divalente, preferiblemente seleccionado de Ca²⁺, Mg²⁺, Sr²⁺ y Zn²⁺.
- Según una realización preferida adicional, la proteína adicional, que puede ser una albúmina, está presente en una concentración en el intervalo de desde 0,1-20 mg/ml, preferiblemente en el intervalo de desde 1-10 mg/ml, más preferiblemente en una cantidad de 10 mg/ml.
- En una realización preferida adicional, el compuesto alifático está presente en la concentración de desde 0,01-100 mM, preferiblemente en una concentración de desde 0,1-10 mM. Este intervalo de concentración se prefiere en particular para un 1-alcohol, preferiblemente 1-dodecanol.

En una realización preferida adicional, el detergente está presente en una concentración de desde el 0,001-1,0% en peso, preferiblemente el 0,05-0,5% en peso, preferiblemente desde el 0,02-0,2% en peso.

En una realización preferida adicional, el agente caotrópico está presente en una concentración de desde 1 mM-1 M, preferiblemente desde 25-200 mM, preferiblemente desde 10 mM-100 mM.

- 5 En una realización preferida adicional, el catión divalente está presente en una concentración de desde 1-400 mM, preferiblemente en una concentración de desde 10-200 mM, más preferiblemente en una concentración de desde 50-100 mM.

En una realización preferida adicional, el pH de la composición está en el intervalo de desde 2-12, preferiblemente en el intervalo de desde pH 5-10.

- 10 En una realización preferida adicional, la composición contiene proteína de factor C, que es un componente usado en ensayos de endotoxinas convencionales.

En una realización preferida, la proteína de factor C es una proteína de factor C recombinante.

- 15 Una composición acuosa muy preferida comprende una proteína, preferiblemente un anticuerpo, en combinación con un 1-alcánol, preferiblemente 1-dodecanol en un intervalo de concentración de desde 0,1-10 mM, un detergente según la reivindicación 8 en un intervalo de concentración de desde el 0,002-0,2% en peso, un catión divalente, preferiblemente Ca²⁺, en un intervalo de concentración de desde 10-200 mM, y un pH de desde 5 hasta 10.

Una composición acuosa muy preferida adicional es tal como se expuso anteriormente en el párrafo inmediatamente anterior, y que comprende además un agente caotrópico, preferiblemente cloruro de guanidinio, en el intervalo de concentración de desde 10 mM-100 mM.

- 20 En las composiciones anteriores, los LPS, si están presentes, serán propensos a la detección por ensayos de endotoxinas convencionales tales como el EndoLISA de Hyglos GmbH.

- 25 Tal como se mencionó anteriormente, una divulgación se refiere a un método de desenmascaramiento de una endotoxina en una composición, preferiblemente una composición farmacéutica, que comprende un enmascarador de endotoxinas y se sospecha que comprende dicha endotoxina, comprendiendo dicho método la etapa de añadir a dicha composición un modulador que puede desenmascarar dicha endotoxina, por ejemplo mediante la liberación de dicha endotoxina, si está presente, de un complejo entre dicha endotoxina y dicho enmascarador de endotoxinas. La composición farmacéutica será en la mayoría de los casos una composición acuosa.

- 30 Una divulgación adicional se refiere a un método de detección de una endotoxina en una composición, preferiblemente una composición farmacéutica, que comprende un enmascarador de endotoxinas y se sospecha que comprende dicha endotoxina, comprendiendo dicho método las etapas de: añadir a dicha composición un modulador que puede desenmascarar dicha endotoxina, por ejemplo mediante la liberación de dicha endotoxina, si está presente, de un complejo entre dicha endotoxina y dicho enmascarador de endotoxinas; y detectar dicha endotoxina por medio de un método de detección. La composición farmacéutica será en la mayoría de los casos una composición acuosa.

35 Endotoxina

- El término "endotoxina" se refiere a una molécula producida sobre la superficie de bacterias, en particular de bacterias Gram negativas, que son bacterias que, debido a su delgada capa de peptidoglucano intercalada entre una membrana celular interna y una membrana externa bacteriana, no retienen la tinción de cristal violeta usada en el método de tinción de Gram de diferenciación bacteriana y por tanto eluden la detección positiva por este método. Específicamente, las endotoxinas son sustancias biológicamente activas presentes en la membrana externa de bacterias Gram negativas. Una clase común de endotoxinas son los lipopolisacáridos (LPS). Para los fines de la presente solicitud, los términos "endotoxina" y "LPS" se usan de manera intercambiable. Sin embargo, tal como se comenta en otra parte en el presente documento, se entiende que existen tipos diferentes de LPS, por ejemplo derivados de diferentes fuentes, y que se pretende que los términos "endotoxina" y "LPS" engloben estos tipos diferentes de LPS. Las endotoxinas se ubican sobre la superficie de las bacterias y, junto con las proteínas y los fosfolípidos, forman la membrana bacteriana externa. Generalmente, los LPS están compuestos por dos partes con diferentes propiedades químicas y físicas; un dominio de azúcar hidrófilo (el polisacárido) y un dominio de lípido hidrófobo (lípido A). Pueden reconocerse dos regiones distintas en el polisacárido: el oligosacárido de núcleo y el polisacárido O-específico (M.A. Freudenberg, C. Galanos, Bacterial Lipopolysaccharides: Structure, Metabolism and Mechanisms of Action, Intern. Rev. Immunol. 6, 1990).

- El lípido A es altamente hidrófobo y es la parte endotóxicamente activa de la molécula. Normalmente el lípido A está compuesto por un disacárido beta-D-GlcN-(1-6)-alfa-D-GlcN que porta dos grupos fosforilo. A esta estructura se unen hasta cuatro cadenas de acilo. Estas cadenas pueden estar sustituidas a su vez por ácidos grasos adicionales, que pueden variar de manera bastante considerable entre especies en su naturaleza, número, longitud, orden y saturación. Unido covalentemente al lípido A está la sección de núcleo de la molécula que puede dividirse

formalmente por sí mismo en el núcleo interno y el externo. El núcleo interno es proximal al lípido A y contiene azúcares inusuales como el ácido 3-desoxi-D-mano-octulosónico (KDO). El núcleo externo se extiende adicionalmente desde la superficie bacteriana y lo más probable es que consista en azúcares más comunes tales como hexosas y hexosaminas. Sobre este se une, en la mayoría de los casos, un polímero de subunidades de repetición de sacárido denominado el O-polisacárido, también compuesto normalmente por azúcares comunes. Sin embargo, este O-polisacárido no es ubicuo, ya que se observa que está truncado o falta en varias cepas de Gram negativas. Además, determinadas cepas portan mutaciones en el locus, por lo demás bien conservado, y se denominan “mutantes rugosos” para diferenciarlas de las cepas “lisas” silvestres que expresan LPS que portan O-polisacárido (C. Erridge, E. Bennett-Guerrero, I. Poxton, Structure and function of lipopolysaccharides, Microbes and Infection, 2002). Puede encontrarse abundante información relacionada con las endotoxinas, por ejemplo los LPS, así como su impacto sobre la salud, en el libro “Endotoxin in Health and Disease”, editado por Helmut Brade, Steven M. Opal, Stefanie N. Vogel y David C. Morrison, 1999, publicado por Marcel Dekker, Inc., ISBN 0-8247-1944-1.

Tal como se mencionó anteriormente, las endotoxinas pueden derivarse de diferentes fuentes bacterianas. La naturaleza química de las endotoxinas puede variar ligeramente de una fuente a otra. Por ejemplo, las endotoxinas derivadas de diferentes fuentes bacterianas pueden diferir ligeramente en la longitud de las cadenas alifáticas en las amidas alifáticas y los ésteres de ácidos alifáticos del dominio de lípido A. Sin embargo, pese a las ligeras variaciones en la estructura de las endotoxinas de una fuente a otra, se aplica la misma estructura básica tal como se describió anteriormente en el presente documento para la mayoría, sino todas, las endotoxinas, lo que implica un modo de acción similar, y de manera correspondiente uno modo similar de influir en el comportamiento de las endotoxinas independientemente de la especie bacteriana de origen. Los ejemplos de endotoxinas conocidas incluyen las derivadas por ejemplo de *E. coli*, por ejemplo *E. coli* 055:B5 (tales como las disponibles de Sigma como el número de producto L2637-5MG) o *E. coli* K 12; *S. abortus equi* (tales como las disponibles de Acila como el número de producto 1220302); *Klebsiella pneumoniae*; *Morganella morganii*; *Yersinia enterocolitica*; *Serratia marcescens*; *Neisseria*, por ejemplo *Neisseria meningitidis*; *Acinetobacter baumannii*; *Enterobacter cloacae*, por ejemplo la endotoxina que se produce de manera natural (NOE); *Pseudomonas*, por ejemplo *Pseudomonas aeruginosa*; *Salmonella*, por ejemplo *Salmonella enteric*; *Shigella*; *Haemophilus influenzae*; *Bordetella pertussis*; y *Vibrio cholerae*. Se entiende que esta lista es meramente a modo de ejemplo y en ningún modo limita el término “endotoxina” tal como se usa en el presente documento.

Enmascarador de endotoxinas

El término “enmascarador de endotoxinas” se refiere a una sustancia que, en disolución con la endotoxina, hace que la endotoxina sea indetectable por los métodos de detección disponibles, por ejemplo por las pruebas de lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL). Normalmente, las endotoxinas son detectables cuando existen en disolución en forma agregada, es decir en una forma en la que múltiples restos, o al menos dos restos de endotoxina, se mantienen unidos entre sí en proximidad espacial mediante interacciones no covalentes tales como interacciones electrostáticas, interacciones hidrófobas, interacciones de Van der Waals o cualquier combinación de las mismas. Sin embargo, las endotoxinas son significativamente menos activas (indetectables) cuando se miden mediante sistemas de detección comunes, es decir, están enmascaradas, cuando su estado de agregación activo cambia de manera que las endotoxinas se solubilizan como moléculas de endotoxina individuales. Puede suponerse que las entidades moleculares diferenciadas de las endotoxinas se estabilizan, por ejemplo, por detergentes presentes en la disolución. Se supone que tales detergentes estabilizan restos de endotoxina individuales formando micelas de detergente en las que los restos de endotoxina individuales quedan incrustados y ya no pueden reaccionar con el factor C en ensayos de endotoxinas disponibles comercialmente. Determinadas proteínas también pueden efectuar o contribuir a la estabilización de las endotoxinas en la forma soluble indetectable. Por ejemplo, tales proteínas pueden presentar las endotoxinas con hendiduras de unión ofreciendo a las moléculas de endotoxina individuales un entorno adecuado para la unión estable, rompiendo de ese modo los agregados de endotoxinas de otro modo detectables y/o impidiendo que las moléculas de endotoxina interactúen con el factor C en los ensayos de endotoxina disponibles.

Se supone que al menos dos moléculas de endotoxina, es decir al menos dos moléculas de LPS, deben formar un agregado con el fin de ser detectables por pruebas de endotoxinas disponibles comercialmente tales como el kit de prueba EndoLisa® disponible de Hyglos GmbH y las pruebas basadas en LAL.

De hecho, varias publicaciones muestran que los agregados de endotoxina son de manera significativa más activos biológicamente que las endotoxinas desagregadas (M. Mueller, B. Lindner, S. Kusumoto, K. Fukase, A. B. Schromm, U. Seydel, Aggregates are the biologically active units of endotoxin, The Journal of Biological Chemistry, 2004; A. Shnyra, K. Hultenby, A. Lindberg, Role of the physical state of Salmonella Lipopolysaccharide in expression of biological and endotoxic properties, Infection and Immunity, 1993). Además, la activación del factor C, descrito por Tan *et al.* (N. S. Tan, M. L. P. NG, Y. H Yau, P. K. W. Chong, B Ho, J. L. Ding, Definition of endotoxin binding sites in horseshoe crab Factor C recombinant sushi proteins and neutralization of endotoxin by sushi peptides, The FASEB Journal, 2000), se indica como un mecanismo de unión cooperativa. En este caso, tal como se mencionó anteriormente, se requieren al menos dos moléculas de LPS para la activación del factor C, que es el factor clave en los métodos de detección basados en *Limulus* tales como el kit EndoLisa disponible de Hyglos GmbH.

Los ejemplos de enmascaradores de endotoxinas que son detergentes incluyen detergentes aniónicos, detergentes

catiónicos, detergentes no iónicos y detergentes anfóteros, y cualquier combinación de los mismos.

Los ejemplos de detergentes aniónicos que pueden funcionar como enmascaradores detergentes de endotoxinas en el sentido de la invención incluyen alquilsulfatos tales como por ejemplo laurilsulfato de amonio o laurilsulfato de sodio (SDS); alquil-éter sulfatos tales como por ejemplo lauril éter sulfato de sodio o miristil éter sulfato de sodio; sulfato de colesterol; sulfonatos tales como por ejemplo dodecylbencenosulfonato, laurilsulfoacetato de sodio o xilenosulfonato; alquilsulfosuccinatos tales como por ejemplo laurilsulfosuccinato de disodio; sulfóxidos tales como por ejemplo dodecilmetil sulfóxido; fosfatos tales como por ejemplo trilauril éter-4-fosfato; y carboxilatos tales como por ejemplo estearato de sodio o lauroilsarcosinato de sodio.

Los ejemplos de detergentes catiónicos que pueden funcionar como enmascaradores de endotoxinas en el sentido de la invención incluyen aminas primarias; aminas secundarias; aminas terciarias; y cationes de amonio cuaternario tales como por ejemplo sales de alquiltrimetilamonio (por ejemplo bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) o cloruro de cetiltrimetilamonio (CTAC)); cloruro de cetilpiridinio (CPC); detergentes de amonio cuaternario tales como por ejemplo fosfato de tris[2-(2-hidroxietoxi)etil]-octadecil-amonio (Quaternium 52); y etoxilato de hidroxietilcelulosa, cuaternizado (Polyquaternium-10).

Los detergentes no iónicos que pueden funcionar como enmascaradores detergentes de endotoxinas en el sentido de la invención incluyen ésteres alquílicos de sorbitano de polioxietilenglicol (polisorbatos) tales como por ejemplo polisorbato 20 (Tween-20), polisorbato 40, polisorbato 60 o polisorbato 80 (Tween-80); alquil éteres de polioxietilenglicol; alquil éteres de polioxipropilenglicol; alquil éteres de glucósido; éteres de octilfenol de polioxietilenglicol; éteres de alquilfenol de polioxietilenglicol; ésteres alquílicos de glicerol; ésteres alquílicos de sorbitano; copolímeros de bloque de polietilenglicol y polipropilenglicol; cocamida MEA; esteroleos tales como por ejemplo colesterol; ciclodextranos; poloxámeros tales como por ejemplo polímeros de bloque Pluronic (por ejemplo HO-(CH₂CH₂O)_{n/2}-(CH₂CH(CH₃)O)_m-(CH₂CH₂O)_{n/2}-H, con n=200 y m=65 para F127 y n=4,5 y m=31 para F61) y cocamida DEA.

Los detergentes anfóteros que pueden funcionar como enmascaradores detergentes de endotoxinas en el sentido de la invención incluyen CHAPS (3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato); sultainas, tales como por ejemplo cocamidopropil-hidroxisultaína; betaínas, tales como por ejemplo cocamidopropil-betaína; óxidos de amina tales como por ejemplo óxido de palmitamina, óxido de laurilamina y óxido de amina de fórmula general R³N⁺O⁻, en la que R³ es alquilo C₈-C₁₈, alquenilo C₈-C₁₈ o alquinilo C₈-C₁₈; y lecitina. Específicamente, R³ en la fórmula general R³N⁺O⁻ anterior puede ser cualquiera de alquilo C₈, alquilo C₉, alquilo C₁₀, alquilo C₁₁, alquilo C₁₂, alquilo C₁₃, alquilo C₁₄, alquilo C₁₅, alquilo C₁₆, alquilo C₁₇ o alquilo C₁₈; o alquenilo C₈, alquenilo C₉, alquenilo C₁₀, alquenilo C₁₁, alquenilo C₁₂, alquenilo C₁₃, alquenilo C₁₄, alquenilo C₁₅, alquenilo C₁₆, alquenilo C₁₇ o alquenilo C₁₈; o alquinilo C₈, alquinilo C₉, alquinilo C₁₀, alquinilo C₁₁, alquinilo C₁₂, alquinilo C₁₃, alquinilo C₁₄, alquinilo C₁₅, alquinilo C₁₆, alquinilo C₁₇ o alquinilo C₁₈.

Alternativamente o además de cualquiera de los enmascaradores de endotoxinas indicados anteriormente (solos o en combinación), el enmascarador de endotoxinas también puede ser un principio activo farmacéutico (API). Este API puede existir en disolución junto con o sin ninguno de los enmascaradores detergentes de endotoxinas indicados anteriormente. Si el API existe junto con un enmascarador detergente de endotoxinas en disolución, el efecto de enmascaramiento puede ser más pronunciado, y pueden ser necesarias medidas más rigurosas para liberar la endotoxina enmascarada del enmascarador de endotoxinas, tal como se comenta en mayor detalle a continuación. Los API que pueden generar o aumentar especialmente el enmascaramiento de las endotoxinas presentes en la disolución son los API proteicos, por ejemplo un anticuerpo; un fragmento de anticuerpo; una hormona; una enzima; una proteína de fusión; un conjugado de proteína; y cualquier combinación de los mismos. Cuando el API proteico es un fragmento de anticuerpo, el fragmento de anticuerpo puede elegirse preferiblemente del grupo que consiste en: un Fab; un Fab'; un F(ab')₂; un Fv; un anticuerpo de cadena sencilla; y cualquier combinación de los mismos. Cuando el API proteico es un anticuerpo, el anticuerpo puede elegirse preferiblemente del grupo que consiste en: un anticuerpo completamente humano; un anticuerpo anti-idiotipo; un anticuerpo humanizado; un anticuerpo biespecífico; un anticuerpo quimérico; un anticuerpo con injerto de CDR; un anticuerpo monoclonal; un anticuerpo policlonal; y cualquier combinación de los mismos. Alternativamente o además de lo anterior, el API también puede ser una molécula orgánica pequeña. El experto entiende lo que quiere decirse mediante el término "molécula orgánica pequeña" o "molécula pequeña". Se trata de una molécula con un peso molecular de no más de 300 g/mol, 400 g/mol, 500 g/mol, 600 g/mol, 700 g/mol, 800 g/mol, 900 g/mol o, preferiblemente, 1000 g/mol.

Generalmente, un enmascarador de endotoxinas, ya sea un detergente o una proteína, tendrá la característica de desplazar el equilibrio entre las endotoxinas solubilizadas y agregadas en la dirección de las endotoxinas solubilizadas que no son detectables por los ensayos de endotoxinas disponibles. Este desplazamiento de las endotoxinas hacia una forma indetectable es lo que se denomina "enmascaramiento" en el presente documento. Tal como se mencionó anteriormente, la forma en la que las endotoxinas se solubilizan puede incluir por ejemplo endotoxinas a) que se incrustan en la capa lipídica de una micela formada por un detergente; b) que se unen sobre o en una proteína, por ejemplo en una hendidura de unión adecuada del entorno estérico y electrostático apropiado formada sobre la superficie de un agente activo farmacéutico, por ejemplo una proteína; o c) que participan en una combinación de estas dos posibilidades. Independientemente de la forma en la que las endotoxinas se solubilizan

para desfavorecer energéticamente la forma agregada, sin embargo, el efecto neto es que las moléculas de endotoxina individuales que de otra forma se agregan y se hacen por tanto detectables, se estabilizan individualmente y, en esta forma individualizada (solubilizada), se hacen y permanecen indetectables, es decir, enmascaradas.

5 Sin embargo, aunque indetectables, tales moléculas de endotoxina estabilizadas en disolución pueden no obstante generar y/o contribuir a las clases de reacciones pirogénicas y/o tóxicas explicadas resumidamente antes cuando se administran a los sujetos. Este peligro se agudiza especialmente en las formulaciones farmacéuticas, puesto que las formulaciones farmacéuticas a menudo contienen un detergente para solubilizar un API, por ejemplo un API proteico, que sin el detergente, sería insoluble a las concentraciones proporcionadas en la formulación farmacéutica.

10 Al hacer que el API, por ejemplo un API proteico, sea soluble incluyendo un detergente, entonces a menudo se destruye inadvertidamente la agregación de la endotoxina que es necesaria para la detección de esta endotoxina. Por tanto, cuando el enmascarador de endotoxinas es un detergente, la misma medida empleada para formular el API, por ejemplo el API proteico, en una forma y concentración aceptables también tiene la posibilidad de enmascarar las endotoxinas en disolución.

15 Tal como se mencionó anteriormente, el enmascarador de endotoxinas también puede ser una proteína, por ejemplo el propio API. Este supuesto puede surgir conjuntamente con la presencia de un enmascarador detergente de endotoxinas o, en el caso de que no esté presente detergente, también puede surgir en ausencia de un enmascarador detergente de endotoxinas. En este último caso, el API, en particular un API proteico, puede ofrecer a la endotoxina un entorno suficiente para unirse de manera estable sobre o en tal proteína de manera que la

20 endotoxina queda enmascarada por el API solo, es decir sin que sea necesario ningún detergente para enmascarar la endotoxina, que se hace indetectable. En el caso de que el enmascarador de endotoxinas sea una proteína, esta proteína puede ser el propio API, o puede ser alternativa o adicionalmente una proteína en disolución que es diferente del API. Generalmente, cualquier proteína que tenga un entorno estérico y electrostático apropiado para estabilizar moléculas de endotoxina individuales, por ejemplo moléculas de LPS individuales, podría efectuar o

25 contribuir potencialmente al enmascaramiento de endotoxinas.

Una característica distintiva de la invención es que cuando el enmascarador de endotoxinas es una proteína, o bien sola o junto con un enmascarador de endotoxinas adicional tal como por ejemplo un enmascarador detergente de endotoxinas, el desenmascaramiento de la endotoxina deja al enmascarador de endotoxinas proteico químicamente inalterado tras el desenmascaramiento. En particular, el desenmascaramiento de la endotoxina no escinde ni

30 degrada de otro modo el enmascarador de endotoxinas proteico (por ejemplo API proteico).

En supuestos del tipo descrito anteriormente, las moléculas de endotoxina individuales que de otro modo permanecerían en agregados y por tanto serían detectables, se estabilizan en una o más de tales ubicaciones de superficie sobre o en dicha proteína. Como es el caso para las micelas de detergente, una estabilización de este tipo desplaza el equilibrio existente entre las endotoxinas solubilizadas (indetectables) y agregadas (detectables) en la

35 dirección de las endotoxinas solubilizadas (indetectables). Tal como se mencionó anteriormente, puede imaginarse que un desplazamiento de este tipo en el equilibrio hacia la forma solubilizada (indetectable) es especialmente pronunciado en el caso de que una solución comprenda tanto detergente como una o más proteínas con las características anteriores, puesto que en tales casos la estabilización de moléculas de endotoxina individuales fuera de su forma de agregado por el enmascarador de endotoxinas puede producirse tanto en la forma de estabilización

40 en micelas así como sobre la superficie de las proteínas. En tales supuestos, pueden requerirse medidas más rigurosas para desplazar dicho equilibrio hacia la forma de endotoxina agregada que entonces es detectable. Estas se comentan en más detalle en el contexto de supuestos ilustrativos más adelante (figuras 1-6).

Modulador

El término "modulador" tal como se usa en el presente documento se refiere a uno o más compuestos que, solos o

45 de manera conjunta, hace(n) que una endotoxina enmascarada sea propensa a la detección por un ensayo de endotoxinas (tal como el ensayo de detección EndoLisa® disponible de Hyglos GmbH). El término "modulador" tal como se usa en el presente documento puede englobar tanto componentes individuales así como múltiples que logran este fin. En algunos casos en el presente documento a continuación, se hace referencia a un "sistema modulador", aunque el término "modulador" se usa en ocasiones para designar múltiples sustancias moduladoras que se pretende que funcionen de manera conjunta. Esto se refiere a un modulador de múltiples componentes que comprende múltiples sustancias que actúan de manera conjunta para hacer que una endotoxina enmascarada sea detectable por un ensayo de endotoxinas. Los diferentes componentes de un sistema modulador pueden incorporarse por diferentes motivos, es decir para aprovechar las diferentes funciones de las sustancias moduladoras que afectan a la estabilidad de un complejo entre endotoxina y enmascarador de endotoxinas de

50 diferentes modos. Para facilidad de consulta, puede hacerse referencia por ejemplo a diferentes tipos de moduladores que pueden emplearse solos o juntos para desenmascarar endotoxinas:

- "Modulador de alteración": Un "modulador de alteración" es un modulador que rompe completa o parcialmente un complejo entre un enmascarador de endotoxinas y una endotoxina. Cuando el enmascarador de endotoxinas es un detergente, y la endotoxina está enmascarada en forma solubilizada insertada en la capa lipídica de una micela de detergente de enmascaramiento, entonces un modulador que
- 60

altera una micela de detergente de este tipo para liberar la endotoxina se denominará modulador de alteración. Tal como se comenta en mayor detalle a continuación, 1-dodecanol es un modulador de alteración de este tipo. Un modulador de alteración, por ejemplo 1-dodecanol, ácido 1-decanoico u octilsulfato de sodio (SOS) puede usarse ventajosamente en un intervalo de concentración de 0,01-100 mM, preferiblemente en un intervalo de concentración de 0,1-10 mM, preferiblemente a una concentración de 10 mM en el procedimiento de enmascaramiento. En algunos casos, el modulador de alteración también puede funcionar simultáneamente como un modulador de reconfiguración, descrito a continuación.

- “Modulador de adsorción”: Un “modulador de adsorción” es un modulador que tiene la capacidad de unirse a sustancias que de lo contrario estabilizarían la endotoxina en forma solubilizada y por tanto indetectable. Por ejemplo, cuando el enmascarador de endotoxinas es un detergente tal como por ejemplo el contenido en algunas composiciones farmacéuticas, entonces un modulador que se une a las moléculas del detergente y de este modo contribuye a la rotura de las micelas de estabilización de endotoxinas se denominará modulador de adsorción. Tal como se comenta en mayor detalle a continuación, BSA es un modulador de adsorción de este tipo. Un modulador de adsorción, por ejemplo BSA, puede usarse ventajosamente en un intervalo de concentración de 0,1-20 mg/ml, preferiblemente en un intervalo de concentración de 1-10 mg/ml, preferiblemente a una concentración de 10 mg/ml en el procedimiento de enmascaramiento.
- “Modulador de desplazamiento”: Un “modulador de desplazamiento” es un modulador que tiene la capacidad de desplazar completa o parcialmente una molécula de endotoxina de su posición de unión estable en o sobre un enmascarador de endotoxinas. Por ejemplo, cuando el enmascarador de endotoxinas es una proteína, y la endotoxina están unida en o sobre una proteína que estabiliza la endotoxina en forma indetectable, entonces un modulador que tiene la capacidad de reemplazar la endotoxina en o sobre la proteína, por ejemplo por medio de interacciones hidrófobas, se denominará modulador de desplazamiento. Tal como se comenta en mayor detalle a continuación, SDS es un modulador de desplazamiento de este tipo. Un modulador de desplazamiento, por ejemplo SDS, puede usarse ventajosamente en un intervalo de concentración del 0,01-1%, preferiblemente en un intervalo de concentración del 0,05-0,5%, preferiblemente a una concentración del 0,1% en el procedimiento de enmascaramiento.
- “Modulador de reconfiguración”: Un “modulador de reconfiguración” es un modulador que tiene la capacidad de estabilizar de manera transitoria la endotoxina tras su liberación del enmascarador de endotoxinas (por ejemplo por un modulador de alteración o modulador de desplazamiento, tal como se comentó anteriormente), ayudando así a la endotoxina liberada, solubilizada (indetectable) a adoptar una forma agregada (detectable). Con la ayuda del modulador de reconfiguración, la endotoxina solubilizada llega a reconfigurarse como endotoxina agregada. Tal como se comenta en mayor detalle a continuación, 1-dodecanol es un modulador de reconfiguración de este tipo. Un modulador de reconfiguración, por ejemplo 1-dodecanol, ácido 1-decanoico u octilsulfato de sodio (SOS) puede usarse ventajosamente en un intervalo de concentración de 0,01-100 mM, preferiblemente en un intervalo de concentración de 0,1-10 mM en el procedimiento de enmascaramiento. En algunos casos, el modulador de reconfiguración también puede funcionar simultáneamente como modulador de alteración, descrito anteriormente.

Tal como quedará claro a continuación en el presente documento, los tipos de moduladores anteriores no son excluyentes entre sí; es decir, es posible que una sustancia dada tenga funcionalidad como los diferentes tipos de moduladores anteriores. Un ejemplo es 1-dodecanol, que puede clasificarse tanto como modulador de alteración (que rompe una micela de detergente) así como modulador de reconfiguración (que estabiliza de manera transitoria la endotoxina liberada de la micela de modo que puede agregarse y llegar a ser detectable). De manera similar, el SDS puede clasificarse como modulador de alteración (que rompe micelas existentes de otro detergente distinto de SDS) y como modulador de desplazamiento (que libera la endotoxina de los sitios de unión en o sobre cualquier proteína de enmascaramiento que pueda estar presente). La clasificación en cuanto al tipo de modulador depende de la función que desempeña una sustancia en cuestión en una composición particular. Sin embargo, puesto que se supone que generalmente se requerirá la reconfiguración de la endotoxina de la forma solubilizada a la agregada con el fin de hacer que la endotoxina sea detectable, el modulador normalmente comprenderá al menos un componente que se califica como “modulador de reconfiguración”.

Como ejemplo adicional, una sustancia que funciona como “modulador de desplazamiento” cuando el enmascarador de endotoxinas es una proteína puede funcionar en algunos casos como “modulador de alteración” cuando el enmascarador de endotoxinas es un detergente. El SDS es un ejemplo de una sustancia de este tipo, cuya clasificación en cuanto al tipo de componente de modulador depende de las condiciones prevalentes. Por ejemplo, cuando el enmascarador de endotoxinas es una proteína, el SDS funcionará generalmente como un modulador de desplazamiento, puesto que ayuda a desplazar la endotoxina unida en o sobre la proteína de enmascaramiento. Sin embargo, cuando el enmascarador de endotoxinas es un detergente, entonces el SDS, solo o junto con otro componente modulador, puede funcionar más como un modulador de alteración, puesto que en este caso promueve la liberación de la endotoxina de la capa lipídica de las micelas de detergente alterando las micelas.

Un modulador puede contener una o más sustancias dentro de las clasificaciones anteriores. Por ejemplo, un

modulador de un único componente puede comprender sólo un modulador de alteración tal como 1-dodecanol. Un modulador de dos componentes puede comprender una mezcla de un modulador de alteración tal como 1-dodecanol (que también funciona posiblemente como modulador de reconfiguración) y, dependiendo de la naturaleza del complejo de enmascaramiento entre la endotoxina y el enmascarador de endotoxinas, uno de un modulador de adsorción tal como BSA o un modulador de desplazamiento tal como SDS. Un modulador de múltiples componentes puede comprender una mezcla de un modulador de alteración tal como 1-dodecanol (que también funciona posiblemente como modulador de reconfiguración) y, dependiendo de la naturaleza del complejo de enmascaramiento entre la endotoxina y el enmascarador de endotoxinas, uno de cada uno de un modulador de adsorción tal como BSA y un modulador de desplazamiento tal como SDS. Tal como se comentará en detalle a continuación, la complejidad del sistema modulador elegido dependerá de la naturaleza del complejo entre la endotoxina y el enmascarador de endotoxinas, y de las condiciones de la disolución circundante que contribuyen a la estabilidad de ese complejo. A partir de lo anterior, está claro que cada nueva composición que va a analizarse para determinar la presencia de endotoxinas puede requerir su propia composición moduladora personalizada con el fin de hacer que la endotoxina enmascarada sea susceptible a la detección. Sin embargo, la identificación de un modulador adecuado para una composición o formulación dada que va a someterse a una prueba puede llevarse a cabo mediante experimentación de rutina, tal como se mostrará adicionalmente a continuación.

Tal como se mencionó anteriormente, en su sentido más general, se supone que el modulador desestabiliza un complejo entre la endotoxina y un enmascarador de endotoxinas y promueve la liberación de la endotoxina del enmascarador de endotoxinas. De este modo, el modulador o el sistema modulador desplaza eficazmente el equilibrio desde un estado solubilizado (indetectable) hacia un estado agregado (detectable).

Los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que la endotoxina que está presente pero es indetectable en disolución sigue siendo indetectable porque, tal como se supone, la endotoxina permanece solubilizada de manera estable en micelas de detergente y/o unida a estructuras de superficie de proteínas presentes en la disolución. Estabilizadas de manera individual de esta forma, las moléculas de endotoxina eluden la detección. Sin embargo, los presentes inventores han encontrado que pueden manipularse las condiciones de disolución de manera que se hace que la endotoxina solubilizada esté en una forma que puede detectarse. En algunos casos, pueden requerirse múltiples manipulaciones de las condiciones de disolución para alcanzar este fin y la rigurosidad de la medida o medidas adoptadas para efectuar el desplazamiento en el equilibrio hacia un estado agregado variará dependiendo del grado en que el enmascarador de endotoxinas estabiliza la endotoxina en forma solubilizada, tal como se mencionó anteriormente. Pero en general, las manipulaciones realizadas según la invención tal como se describe en el presente documento deben entenderse en el contexto del objetivo global del desplazamiento del equilibrio de la endotoxina desde un estado solubilizado hasta un estado agregado, de manera que puede detectarse.

Con el fin de llevar a cabo lo anterior, el "modulador" incluirá generalmente una molécula anfífila que compite por la unión entre el componente lipídico de la endotoxina y el enmascarador de endotoxinas, debilitando así la interacción entre la primera y el segundo. Una unión competitiva de este tipo se llevará a cabo generalmente proporcionando al menos un componente del sistema modulador en una forma que es estructuralmente similar al componente lipídico (anfífilo) de la endotoxina, de manera que el primero puede desplazar al segundo en su interacción estabilizada con el enmascarador de endotoxinas.

Por ejemplo, en el caso de que el enmascarador de endotoxinas sea un detergente, un modulador de alteración adecuado generalmente incluirá un compuesto anfífilo que puede insertarse de manera estable, es decir entre las moléculas de detergente anfífilas y de manera similar, la parte lipídica anfífila de la endotoxina. Cuando el enmascarador de endotoxinas es un detergente, un modulador de alteración anfífilo provocará por tanto varios efectos en paralelo que conducen a un desplazamiento global en el equilibrio desde una forma solubilizada hacia una agregada de la endotoxina. En primer lugar, proporcionar un sistema modulador que comprende al menos un modulador de alteración anfífilo altera las interacciones lipófilas que subyacen a las micelas de detergente de manera que estas micelas se rompen. Puesto que la endotoxina se solubilizó anteriormente (y por tanto se enmascaró) mediante la inserción de su componente lipídico en la capa lipídica de las micelas de detergente, la rotura de las micelas elimina esta fuerza de estabilización y da como resultado la liberación de la endotoxina incrustada anteriormente. El papel del modulador de alteración en el caso de que el enmascarador de endotoxinas sea o incluya un detergente es por tanto romper las micelas de detergente.

Además, el carácter anfífilo del modulador de alteración también puede permitir asociarse con el componente lipídico de la endotoxina, una vez que la endotoxina se libera de sus micelas de detergente tal como se describió anteriormente. Esta interacción entre el modulador de alteración anfífilo y el componente lipídico de la endotoxina tiene el efecto de unir a chaperona la endotoxina en disolución acuosa tras su liberación de las micelas de detergente de estabilización. En este caso, el modulador de alteración tendría una doble función como modulador de reconfiguración. Cuando el modulador de alteración es de carácter anfífilo, no se excluye que pueda formar micelas por sí mismo. Sin embargo, el efecto de enmascaramiento generalmente será mayor cuando el modulador de alteración anfífilo no forma micelas por sí mismo, lo que podría simplemente intercambiar un estado de endotoxina solubilizado y por tanto enmascarado por otro. Un papel clave del modulador de reconfiguración es por tanto estabilizar de manera transitoria la endotoxina liberada (aunque menos que en su complejo anterior con el enmascarador de endotoxinas), uniendo eficazmente a chaperona la endotoxina para dar un estado agregado y por

tanto detectable.

La endotoxina liberada, unida a chaperona temporalmente de ese modo en disolución, es entonces libre de agregarse para dar una forma que es detectable y por tanto “desenmascarada”. Si es necesaria o no manipulación adicional de las condiciones de disolución más allá de la adición del modulador o el sistema modulador para desplazar el equilibrio hacia esta forma agregada, detectable, dependerá generalmente de las condiciones que prevalecen en la disolución y de la estabilidad inicial de la endotoxina cuando se compleja con el enmascarador de endotoxinas.

En otro supuesto ya contemplado anteriormente, el enmascarador de endotoxinas no es, o no es sólo, un detergente, sino que también puede ser o comprender una proteína con hendiduras de unión en su superficie adecuadas para unirse de manera estable a restos individuales de endotoxina de manera que no puedan detectarse. En este caso, se aplican consideraciones similares referentes al modulador tal como se expuso anteriormente. Por ejemplo, el uso de un modulador de alteración (anfífilo) y/o un modulador de desplazamiento en el caso de que la endotoxina sea o comprenda una proteína tiene el efecto de que el modulador altera las interacciones lipófilas que existen entre cadenas laterales de aminoácidos lipófilas de la proteína (enmascarador de endotoxinas) y el componente lipídico de la endotoxina. Dado que el modulador de alteración y/o modulador de desplazamiento es probable que sea(n) de carácter anfífilo, el/los modulador(es) también podrá(n) alterar las interacciones electrostáticas que existen entre cadenas laterales polares y/o ionizadas dentro de la proteína (enmascarador de endotoxinas) y grupos polares dentro de las regiones de núcleo y/o de polisacárido de O-antígeno de la endotoxina. Con estas interacciones estabilizantes alteradas, la endotoxina que estaba previamente enmascarada mediante un enmascarador de endotoxinas proteico se desplaza así de su complejo previo con la proteína, y se une a chaperona en disolución en un estado agregado mediante asociación con un modulador de reconfiguración tal como se describió anteriormente.

Tal como se describió anteriormente para el caso en el que el enmascarador de endotoxinas es un detergente en ausencia de un enmascarador de endotoxinas proteico, la endotoxina unida a chaperona-modulador de la reconfiguración y liberada está entonces libre para agregarse para dar una forma que es detectable y por tanto “desenmascarada”. Si es necesaria o no una manipulación adicional de las condiciones de disolución más allá de la adición de los componentes del sistema modulador para desplazar el equilibrio hacia esta forma de endotoxina agregada, detectable, dependerá generalmente de las condiciones prevalentes en disolución y la estabilidad inicial de la endotoxina complejada con el enmascarador de endotoxinas.

El modulador, por ejemplo el modulador de alteración, el modulador de desplazamiento y/o el modulador de reconfiguración pueden comprender en determinadas realizaciones un primer compuesto alifático sustituido con heteroátomo, en el que la cadena principal del primer compuesto alifático sustituido con heteroátomo comprende de 8 a 16 átomos de carbono. Tal como se usa en el presente documento, el término “cadena principal” se refiere a la cadena más larga del primer compuesto alifático sustituido con heteroátomo que comprende de 8 a 16 átomos de carbono, tal como se numera mediante la nomenclatura de la IUPAC convencional. Específicamente, la cadena principal del primer compuesto alifático sustituido con heteroátomo puede comprender 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16 átomos de carbono. Tal como se usa en el presente documento, el término “heteroátomo” se refiere a cualquier átomo distinto de carbono, al que un átomo de carbono en el primer compuesto alifático sustituido con heteroátomo está covalentemente unido. Los heteroátomos representativos incluyen átomos de oxígeno, nitrógeno y azufre. En una realización preferida adicional, el compuesto alifático sustituido con oxígeno es un alcohol alifático, en particular, 1-dodecanol, que es la molécula proporcionada por la fórmula $\text{HO}-(\text{CH}_2)_{11}-\text{CH}_3$. Tal como se mencionó anteriormente, 1-dodecanol es especialmente muy adecuado en muchos casos como modulador de alteración así como, en la mayoría si no en todos los casos, como modulador de reconfiguración.

Se supone que el modulador de reconfiguración desempeña un papel especialmente importante, si no indispensable, en la promoción de una forma agregada, detectable, de endotoxina. El modulador de reconfiguración puede ser un compuesto alifático sustituido con heteroátomo que comprende 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16 átomos de carbono en su cadena principal. El término “cadena principal” se refiere a la cadena más larga del modulador de reconfiguración, tal como se numera mediante la nomenclatura de la IUPAC convencional. Tal como se usa en el presente documento, el término “heteroátomo” se refiere a cualquier átomo distinto de carbono, al que un átomo de carbono en el primer compuesto alifático sustituido con heteroátomo está covalentemente unido. Los heteroátomos representativos incluyen átomos de oxígeno, nitrógeno y azufre. Es especialmente adecuado cuando el heteroátomo es oxígeno. Además, el modulador de reconfiguración puede estar ramificado o no ramificado, comprendiendo las variantes ramificadas sustituciones a lo largo de la “cadena principal” tal como se definió anteriormente. Dichas sustituciones pueden ser por ejemplo metilo, etilo, propilo y/o butilo. Se prefiere una cadena no ramificada. El modulador de reconfiguración puede estar saturado en diversos grados, y puede comprender por ejemplo un resto alquilo C_8 , alquilo C_9 , alquilo C_{10} , alquilo C_{11} , alquilo C_{12} , alquilo C_{13} , alquilo C_{14} , alquilo C_{15} o alquilo C_{16} ; o un resto alquenilo C_8 , alquenilo C_9 , alquenilo C_{10} , alquenilo C_{11} , alquenilo C_{12} , alquenilo C_{13} , alquenilo C_{14} , alquenilo C_{15} o alquenilo C_{16} ; o un resto alquinilo C_8 , alquinilo C_9 , alquinilo C_{10} , alquinilo C_{11} , alquinilo C_{12} , alquinilo C_{13} , alquinilo C_{14} , alquinilo C_{15} o alquinilo C_{16} . Además, el modulador de reconfiguración puede contener cualquier mezcla de enlaces carbono-carbono sencillos, dobles y triples. Moduladores de reconfiguración especialmente adecuados están saturados, es decir comprenden alquilo C_8 , alquilo C_9 , alquilo C_{10} , alquilo C_{11} , alquilo C_{12} , alquilo C_{13} , alquilo C_{14} , alquilo C_{15} o alquilo C_{16} . Moduladores de reconfiguración especialmente adecuados comprenden alquilo C_{12} .

Además, el heteroátomo puede estar en diversos estados de oxidación. Por ejemplo, cuando el heteroátomo es oxígeno, el oxígeno puede estar en la forma de un alcohol, un aldehído o un ácido carboxílico. Especialmente adecuadas como moduladores de reconfiguración son moléculas en alcoholes no ramificados, en particular 1-alcoholes no ramificados. Entre estos, son especialmente adecuados alcoholes C₁₂, especialmente 1-dodecanol que tiene la fórmula HO-(CH₂)₁₁-CH₃.

En realizaciones adicionales, el sistema modulador puede incluir otros componentes además de dicho primer compuesto alifático sustituido con heteroátomo que comprende de 8 a 16 átomos de carbono. Por ejemplo, el sistema modulador puede comprender adicionalmente un segundo compuesto alifático sustituido con heteroátomo, por ejemplo como modulador de alteración, modulador de desplazamiento y/o modulador de reconfiguración, en el que la cadena principal de dicho segundo compuesto alifático sustituido con heteroátomo comprende de 8 a 16 átomos de carbono. La "cadena principal" del segundo compuesto alifático sustituido con heteroátomo se define tal como se describió anteriormente para el primer compuesto alifático sustituido con heteroátomo. Específicamente, la cadena principal del segundo compuesto alifático sustituido con heteroátomo puede comprender 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16 átomos de carbono. El primer compuesto alifático sustituido con heteroátomo que comprende de 8 a 16 átomos de carbono es diferente del segundo compuesto alifático sustituido con heteroátomo que comprende de 8 a 16 átomos de carbono. En una realización preferida, el segundo compuesto alifático sustituido con heteroátomo que puede ser parte del modulador es un compuesto alifático sustituido con oxígeno. En determinadas realizaciones preferidas, este compuesto alifático sustituido con oxígeno es un sulfato alifático, en el que se prefiere especialmente que este sulfato alifático sea dodecilsulfato de sodio (SDS). Por tanto, en una realización particularmente preferida de la invención, el sistema modulador incluye un primer compuesto alifático sustituido con heteroátomo que es 1-dodecanol (por ejemplo como modulador de alteración y/o modulador de reconfiguración), y un segundo compuesto alifático sustituido con heteroátomo que es SDS (como modulador de alteración adicional y/o modulador de desplazamiento).

En una realización adicional, el sistema modulador tal como se describió anteriormente puede comprender además una proteína que puede unirse a un detergente de modo que rompe las micelas formadas por dicho detergente. Generalmente, el detergente unido será el enmascarador de endotoxinas (cuando dicho enmascarador de endotoxinas es o comprende un detergente), y el principio mediante el cual la proteína que puede unirse a un detergente se une al detergente es análogo al principio descrito anteriormente, según el cual una proteína que funciona como enmascarador de endotoxinas secuestra porciones de la molécula de endotoxina en o sobre su superficie. En la presente realización, la proteína que puede unirse a un detergente, cuando se usa como parte del modulador, también lleva sobre su superficie zonas de compatibilidad estérica y electrostática con una porción o porciones de moléculas de detergente presentes en disolución, que son suficientes para unirse a o secuestrar moléculas de detergente, haciendo por tanto que no estén disponibles para su participación en micelas y rompiendo así cualquier micela de detergente que pueda ser un refugio de endotoxina, o que puede servir para desplazar el equilibrio alejándose de una forma agregada de endotoxina.

Los inventores han encontrado que moléculas de albúmina son excepcionalmente buenas en la unión a detergente. Por tanto, se contempla que además del primer compuesto alifático sustituido con heteroátomo solo, o además del primer compuesto alifático sustituido con heteroátomo en combinación con el segundo compuesto alifático sustituido con heteroátomo, el modulador puede comprender adicionalmente una proteína (modulador de adsorción) que puede unirse a un detergente para romper las micelas formadas por dicho detergente. En determinadas realizaciones, el componente proteico del modulador puede ser una albúmina, preferiblemente albúmina sérica humana (HSA), albúmina sérica bovina (BSA) u ovoalbúmina (OVA).

Se contempla adicionalmente que el modulador puede contener uno o más de cada uno del primer compuesto alifático sustituido con heteroátomo que comprende de 8 a 16 átomos de carbono, dicho segundo compuesto alifático sustituido con heteroátomo que comprende de 8 a 16 átomos de carbono y dicha proteína que puede unirse a un detergente para romper las micelas formadas por dicho detergente. En una realización preferida de la invención, el modulador comprende 1-dodecanol solo. En una realización preferida adicional de la invención, el modulador comprende 1-dodecanol y SDS. En una realización preferida adicional de la invención, el modulador comprende 1-dodecanol, SDS y HSA. En una realización preferida adicional de la invención, el modulador comprende 1-dodecanol, SDS y BSA.

Composición

Tal como se usa en el presente documento, el término "composición" se refiere a una mezcla que comprende (al menos) un enmascarador de endotoxinas. La endotoxina, aunque esté presente y enmascarada, sigue siendo indetectable en la composición. La composición es preferiblemente una composición farmacéutica, por ejemplo una composición que comprende un principio activo farmacéutico, o API. El término "composición" puede ser por ejemplo un extracto; una vacuna; cualquier composición adecuada para administración parenteral, es decir parentalia; cualquier composición adecuada para administración intraperitoneal, transdérmica, subcutánea o tópica; un hemoderivado; una disolución de terapia celular, por ejemplo células vivas, intactas, por ejemplo, células T que pueden luchar contra células cancerosas; una disolución de terapia génica, por ejemplo una disolución que puede administrar un polímero de ácido nucleico al interior de las células de un paciente como fármaco para tratar una enfermedad; un implante o dispositivo médico; o una composición que resulta del aclarado o la limpieza de la

superficie de un objeto, siendo dicho objeto por ejemplo un dispositivo médico, un implante o una máquina de llenado.

Método de detección

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “método de detección” se refiere a un método que es adecuado para detectar endotoxina en disolución. Por ejemplo, métodos adecuados en este sentido son métodos de detección basados en *Limulus*, o es un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Los métodos de *Limulus* pueden realizarse de manera clásica usando lisado derivado natural (J. Jorgensen, R. Smith, Preparation, Sensitivity, and Specificity of Limulus Lysate for Endotoxin Assay, Applied Microbiology, 1973) o factor C preparado de manera recombinante (J. L. Ding, B. Ho, A new era in pyrogen testing, Trends in Biotechnology, 2001). Los más
10 prometedores de tales métodos son ensayos de afinidad-adsorción ligados a enzimas, usando una fase sólida para la captura de endotoxinas y detección posterior mediante una versión recombinante de una proteína en el ensayo de LAL, el factor C. El kit EndoLisa® es uno de tales ensayos de afinidad-adsorción (H. Grallert, S. Leopoldseeder, M. Schuett, P. Kurze, B. Buchberger, EndoLISA®: a novel and reliable method for endotoxin detection, Nature Methods, 2011). El sistema de detección EndoLisa® se describe por ejemplo en el libro “Pharmazeutische Mikrobiologie -
15 Qualitätssicherung, Monitoring, Betriebshygiene” de Michael Rieth, octubre de 2012, Wiley-VCH, Weinheim, ISBN 978-3-527-33087-4.

Agente que influye en la estabilidad de los enlaces de hidrógeno en disolución

20 Según una realización adicional de la invención, los métodos anteriores de desenmascaramiento de una endotoxina y/o el método de detección de una endotoxina pueden comprender además la etapa de añadir a dicha composición un agente que influye en la estabilidad de los enlaces de hidrógeno en disolución. Generalmente, tal como se usa en el presente documento, un agente que influye en la estabilidad de los enlaces de hidrógeno en disolución modifica las condiciones de disolución para desestabilizar el complejo en el que una molécula individual o múltiples moléculas de endotoxina se solubilizan y por tanto se enmascaran.

25 No todos los complejos entre endotoxina y enmascarador de endotoxinas son iguales. En particular, los mínimos de energía que gobiernan la estabilización de endotoxinas en determinados complejos de enmascaramiento son diferentes de los que gobiernan la estabilización de endotoxinas en otros complejos de enmascaramiento. Siendo todo lo demás igual, cuanto menor es el mínimo de energía que gobierna la estabilización de una endotoxina en un complejo dado con un enmascarador de endotoxinas, más difícil será, es decir más riguroso debe ser el modulador para, liberar la endotoxina de su estado solubilizado. Sin embargo, tal como se mencionó anteriormente, tal liberación es una etapa importante en la agregación final de endotoxina para dar una forma detectable, es decir desenmascarada. Por tanto, cuanto más estable es el complejo entre endotoxina y enmascarador de endotoxinas, más rigurosas deben ser las medidas adoptadas para desenmascarar en última instancia la endotoxina.

35 En casos en los que el complejo entre endotoxina y enmascarador de endotoxinas es especialmente estable, la adición de un modulador de un único o incluso de múltiples componentes puede no ser suficiente algunas veces para desestabilizar el complejo de enmascaramiento y liberar la endotoxina. En tales casos puede ser útil promover la liberación de endotoxinas de su complejo con enmascarador de endotoxinas ajustando las condiciones de disolución para desestabilizar el complejo de endotoxina-enmascarador de endotoxinas.

40 Tal como se mencionó anteriormente, un agente que influye en la estabilidad de los enlaces de hidrógeno en disolución puede ayudar en este objetivo. Parte, sino la mayoría de la estabilización de la endotoxina en complejo con un enmascarador de endotoxinas surge normalmente de interacciones no covalentes entre el resto de endotoxina y el enmascarador de endotoxinas. Estas interacciones pueden por ejemplo adoptar la forma de interacciones hidrófobas, iónicas, de enlaces de hidrogeno y/o de Van der Waals entre regiones de la molécula de endotoxina y regiones en la molécula o moléculas del enmascarador de endotoxinas. Puesto que la fuerza de estas interacciones de endotoxina-enmascarador de endotoxinas se ve influida por la red de enlaces de hidrógeno
45 circundante en disolución, se deduce a la inversa que la influencia en la estabilidad de los enlaces de hidrógeno en disolución modulará la fuerza de estas interacciones. La adición de un agente que influye en la estabilidad de los enlaces de hidrógeno en disolución puede ayudar por tanto a debilitar las interacciones de unión no covalente entre endotoxina y enmascarador de endotoxinas, elevando esencialmente la energía libre del complejo y volviéndolo así más propenso a la alteración por el modulador de modo que la endotoxina se libera y se vuelve detectable.

50 Además del efecto de desestabilización comentado anteriormente, un agente que influye en la estabilidad de los enlaces de hidrógeno en disolución también puede tener un efecto adicional en la promoción del desenmascaramiento de endotoxinas. Al alterar la estabilidad de los enlaces de hidrógeno en disolución, el agente también puede fomentar la agregación de los restos de endotoxina una vez liberados de su complejo con enmascarador de endotoxinas. Generalmente existirá un equilibrio entre endotoxina en formas solubilizada y agregada. El agente que influye en la estabilidad de los enlaces de hidrógeno en disolución puede ser útil en el desplazamiento de este equilibrio hacia el estado agregado (y por tanto detectable). Sustancias adecuadas son las que tenderán a disminuir la estabilidad de los enlaces de hidrógeno en disolución que rodean a los restos de endotoxina unidos a chaperona, y/o compuestos que tienden a aumentar la fuerza iónica de la disolución, dirigiendo así los restos de endotoxina unidos a chaperona-modulador de reconfiguración juntos para dar un agregado lipófilo.

5 Debe indicarse que puede no ser necesario siempre añadir un agente que influye en la estabilidad de los enlaces de hidrógeno en disolución. Si está indicada o no la adición de un agente de este tipo dependerá, por ejemplo, de la estabilidad de endotoxina en complejo con el enmascarador de endotoxinas y/o de la posición de equilibrio entre las formas solubilizada, unida a chaperona y agregada de restos de endotoxina una vez liberados del enmascarador de endotoxinas. Por ejemplo, en disoluciones que contienen concentraciones superiores de sal, puede concebirse que el complejo de la endotoxina y el enmascarador de endotoxinas puede ser ya lo suficientemente inestable como para romperse mediante el modulador de alteración solo, y que los restos de endotoxina presentes en disolución tras la liberación del enmascarador de endotoxinas son lo suficientemente inestables como para formar agregados sin ninguna ayuda adicional. En tales situaciones, puede no requerirse un agente que influye en la estabilidad de los enlaces de hidrógeno en disolución para lograr el desenmascaramiento.

10 Por otra parte, pueden existir situaciones, por ejemplo en disoluciones que contienen concentraciones inferiores de sal, en las que el complejo de endotoxina-enmascarador de endotoxinas puede tener una estabilidad tan grande que un modulador de alteración solo no puede romperlo para liberar la endotoxina, o en las que, aunque se libere mediante el modulador de alteración solo, el equilibrio entre endotoxina solubilizada y agregada se encuentra hacia la forma solubilizada de modo que no se produce la agregación necesaria para la detección. En tales situaciones, la incorporación de un agente que influye en la estabilidad de los enlaces de hidrógeno en disolución puede ayudar a influir en la energía de complejación y/o agregación para favorecer la endotoxina en forma detectable.

15 En general, puede decirse que el grado de desestabilización del complejo entre la endotoxina y el enmascarador de endotoxinas dependerá de la cantidad de sal en disolución, desestabilizándose este complejo hasta un punto directamente proporcional a la cantidad de sal presente en disolución. Sin embargo, como regla general, puede hacerse referencia a la serie de Hofmeister, según la cual cuanto más caotrópica es una sal, menor es la cantidad de una sal de este tipo que se necesitará para desestabilizar un complejo entre endotoxina y enmascarador de endotoxinas hasta un punto dado. Meramente como ejemplo ilustrativo, con el fin de lograr aproximadamente el mismo grado de desestabilización de un complejo entre endotoxina y enmascarador de endotoxinas que puede lograrse, por ejemplo, con CaCl_2 100 mM, puede ser necesario usar, por ejemplo, NaCl 500 mM. En este ejemplo, CaCl_2 es más caotrópico que NaCl, de modo que se requerirá menos CaCl_2 para lograr el mismo grado de desestabilización.

20 En determinadas realizaciones de la invención, el agente que influye en la estabilidad de los enlaces de hidrógeno en disolución puede ser un agente caotrópico, un catión o una combinación de los mismos. En determinadas realizaciones, el agente caotrópico puede elegirse del grupo que consiste en urea, cloruro de guanidinio, butanol, etanol, perclorato de litio, acetato de litio, cloruro de magnesio, fenol, un propanol (por ejemplo 1-propanol o 2-propanol, es decir isopropanol) y tiourea. En determinadas realizaciones, el catión es un catión divalente, por ejemplo Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} y/o Zn^{2+} . Un catión divalente especialmente preferido es Ca^{2+} .

25 El agente que influye en la estabilidad de los enlaces de hidrógeno en disolución, por ejemplo CaCl_2 , puede usarse ventajosamente en un intervalo de concentración de 1-400 mM, preferiblemente en un intervalo de concentración de 10-200 mM, preferiblemente en un intervalo de concentración de 50-100 mM en el procedimiento de enmascaramiento.

30 Sin querer restringirse a la teoría, y meramente para ilustrar los principios y posibles mecanismos que los presentes inventores creen que subyacen al efecto ventajoso observado del desenmascaramiento de endotoxina en disolución, volviendo detectable de ese modo una endotoxina previamente enmascarada e indetectable, lo siguiente describe varios mecanismos de interacción entre endotoxina y componentes adicionales de una composición dada que contiene al menos un enmascarador de endotoxinas. Para ilustrar estos mecanismos, se hace referencia a las figuras 1-6.

35 Desenmascaramiento de endotoxina enmascarada por un enmascarador detergente con un modulador de un único componente, en el que el único componente funciona como modulador de alteración y como modulador de reconfiguración

40 La figura 1 representa el supuesto en el que la endotoxina se encuentra en disolución junto con un detergente que está enmascarándola en una forma individualizada en una micela de detergente. El panel (a) de la figura 1 muestra un único resto de endotoxina que está insertado en la capa lipídica de una micela de detergente de este tipo por medio de su cola lipídica. Las moléculas de detergente que constituyen la capa lipídica de la micela de detergente se simbolizan con círculos blancos en el panel (a). Debido a que este único resto de endotoxina está insertado de manera estable en forma individual en la capa lipídica de la micela en vez de en forma multimérica, agregada, elude la detección usando métodos de detección disponibles (por ejemplo el ensayo EndoLisa® de Hyglos GmbH). Si la disolución mostrada en el panel (a) de la figura 1 fuese una formulación farmacéutica que contuviese adicionalmente un API, parecería estar libre de endotoxinas y por tanto ser segura para su administración, aun cuando hay endotoxinas presentes en la disolución. La administración de una formulación aparentemente libre de endotoxinas de este tipo a un paciente correría por tanto el riesgo de provocar involuntariamente los tipos respuestas tóxicas e inmunológicas peligrosas mencionadas anteriormente.

Por encima de las flechas de equilibrio entre los paneles (a) y (b) de la figura 1, se observa la adición de un

modulador de alteración y reconfiguración que puede liberar la endotoxina de un complejo entre la endotoxina y el enmascarador de endotoxinas. En el supuesto mostrado en la figura 1, este "complejo" es la endotoxina incrustada, por medio de su componente lipídico, en la capa lipídica de una micela de detergente. El modulador de alteración y reconfiguración mostrado en este caso (una molécula anfífila usada como modulador de un único componente que tiene capacidad como modulador tanto de reconfiguración como de alteración) presenta las propiedades dobles de rotura de la micela de detergente para liberar moléculas de endotoxina insertadas, así como de estabilización de la endotoxina una vez liberada de su complejo con el enmascarador de endotoxinas. Esta última característica se representa esquemáticamente en la porción superior del panel (b) de la figura 1, que muestra una molécula de endotoxina estabilizada por el modulador de alteración y reconfiguración de manera que la molécula de endotoxina puede existir en forma unida a chaperona fuera de las micelas una vez que estas se rompen mediante el modulador. La porción inferior del panel (b) deja claro que el modulador de alteración existe en equilibrio, asociado tanto con el resto de endotoxina liberada como con el detergente que constituía previamente la capa lipídica de la micela de detergente antes de la alteración de las micelas por el modulador de alteración (y reconfiguración).

Tal como se mencionó anteriormente, en una realización de la presente invención, el modulador de alteración y/o reconfiguración puede ser 1-dodecanol, que porta un resto alcohol polar, seguido por una cola hidrocarbonada saturada de 12 átomos de carbono. Tanto la configuración estérica como la electrostática de la configuración de 1-dodecanol es por tanto similar a la de los restos lipídicos de la endotoxina, de modo que 1-dodecanol puede interaccionar eficazmente con, y por tanto estabilizar, la endotoxina tras haberse liberado de la micela de detergente.

Otro motivo por el que 1-dodecanol es especialmente adecuado para su uso como modulador de alteración y/o reconfiguración es que el 1-dodecanol, aunque es anfífilo, no forma micelas. Por tanto, una vez que la micela de detergente representada en el panel (a) de la figura 1 se rompe por 1-dodecanol, no vuelven a formarse nuevas micelas de modulador, lo que podría volver a enmascarar de lo contrario la endotoxina desplazando el equilibrio alejándose de su forma agregada. La característica de que el modulador no forma micelas por sí mismo contribuye por tanto a la estabilización de la endotoxina en disolución, ayudada por el modulador, tal como se representa en el panel (b) de la figura 1. En el supuesto representado en la figura 1, las condiciones de disolución prevalentes hipotéticas son tales que el equilibrio entre los restos de endotoxina unidos a chaperona mostrados en el panel (b) y la endotoxina agregada mostrada en el panel (c) ya se encuentra en el sentido del agregado del panel (c). Al estar favorecida la forma de agregado de la endotoxina, la endotoxina ya está, o está predominantemente, en una forma agregada que es propensa a detección por medios conocidos, por ejemplo el kit de prueba EndoLisa® de Hyglos GmbH.

Entonces, globalmente, la figura 1 muestra la transición de restos de endotoxina individuales (solubilizados) que están insertados de manera estable en, y por tanto enmascarados por, micelas de detergente a un supuesto en el que los restos de endotoxina individuales se han agregado de modo que se hacen detectables. La endotoxina previamente enmascarada en el panel (a) se ha desenmascarado en el panel (c), permitiendo de ese modo determinar que una disolución que se pensaba previamente que estaba libre de endotoxinas contiene realmente este contaminante.

Desenmascaramiento de endotoxina enmascarada por un enmascarador detergente con un modulador de dos componentes que comprende un modulador de alteración y reconfiguración y un modulador de adsorción (proteína)

El supuesto inicial representado en la figura 2 es muy parecido al representado en la figura 1: una única molécula de endotoxina se inserta en una micela de detergente (simbolizada por un anillo de círculos blancos que representan las moléculas de detergente individuales) y, así individualizada de manera estable, se enmascara de manera que elude la detección. Entre los paneles (a) y (b), se observa la adición de un sistema de modulador de dos componentes que comprende tanto un componente no proteico que funciona simultáneamente como modulador de alteración y reconfiguración como un componente proteico que funciona como modulador de adsorción. El modulador de alteración y reconfiguración puede ser tal como se describió anteriormente para la figura 1, por ejemplo 1-dodecanol, que ayuda a alterar la micela de detergente y estabilizar/reconfigurar la endotoxina liberada, sin formar micelas por sí mismo. El modulador de adsorción puede añadirse por ejemplo como parte del modulador con el fin de promover la alteración de micelas de detergente que son más estables que las representadas en la figura 1, y para las que un modulador de alteración solo puede no ser suficiente para lograr la alteración deseada.

Tal como se explicó anteriormente, el modulador de adsorción puede ser por ejemplo albúmina sérica bovina (BSA) o albúmina sérica humana (HSA), entre otras cosas. Tales proteínas tienen la capacidad de actuar como "esponjas moleculares" que adsorben sobre su superficie moléculas de detergente que formaba micelas previamente. Por supuesto, en el caso de que se emplee un modulador de adsorción de este tipo, existirá un determinado equilibrio entre otras moléculas de tipo detergente en disolución, tales como el modulador de alteración y reconfiguración. Se esperará que esto produzca un equilibrio tal como se muestra en el panel (b), en el que el modulador de alteración y reconfiguración existe en formas unidas a endotoxina liberada (porción derecha del panel (b)), unidas a detergente que constituía previamente la micela de detergente, así como unidas a la superficie del modulador de adsorción, junto con detergente adicional de la micela de detergente (ahora alterada).

En las condiciones de disolución prevalentes en el supuesto mostrado en la figura 2, la endotoxina que se ha liberado de la micela de detergente de desenmascaramiento se combina para dar agregados detectables, mostrados en

el panel (c). De hecho, el uso de un modulador de adsorción tal como se muestra en la figura 2 puede promover tal formación de agregados. Se supone que esto se debe a que el modulador de adsorción se une a moléculas del modulador de alteración y reconfiguración sobre su superficie, eliminando de ese modo estas especies de lo contrario estabilizantes de endotoxinas de la disolución de manera que el equilibrio se dirige a la derecha hacia el agregado del panel (c).

Entonces, globalmente, la figura 2 muestra la transición de restos de endotoxina individuales que están incrustados en micelas de detergente y, debido a su individualización en estas micelas, permanecen enmascarados, a un supuesto en el que los restos de endotoxina individuales se han forzado a agregarse para hacerse detectables. Es decir, la endotoxina previamente enmascarada en el panel (a) se ha desenmascarado en el panel (c), permitiendo de ese modo determinar que una disolución que se pensaba previamente (en el panel (a)) que estaba libre de endotoxinas contiene realmente este contaminante (panel (c)).

Desenmascaramiento de endotoxina enmascarada por un enmascarador detergente con un sistema modulador de múltiples componentes en combinación con un agente que influye en la estabilidad de los enlaces de hidrógeno en disolución

En los supuestos representados en la figuras 1 y 2, las condiciones de disolución eran tales que el uso de un sistema modulador solo es suficiente para alterar micelas de detergente de enmascaramiento. Visto de otro modo, ninguna de las micelas de enmascaramiento de detergente mostradas en la figuras 1 y 2 han sido tan estables como para resistir la alteración usando un modulador de alteración solo. Además, las condiciones en la figuras 1 y 2 también han sido tales que los equilibrios entre las formas solubilizada y agregada de endotoxina se encuentran hacia la forma agregada, de modo que la detección de esta forma agregada era posible en las condiciones de disolución mostradas sin que fuera necesario adoptar ninguna medida adicional.

Las condiciones que subyacen al supuesto mostrado en la figura 3 son ahora diferentes. En este caso, se insertan moléculas de endotoxina individuales en la capa lipídica de micelas de detergente (de nuevo simbolizadas por un anillo de círculos blancos que representan las moléculas de detergente individuales), pero ya sea debido a las condiciones de disolución, la naturaleza de la interacción del detergente de enmascaramiento con la endotoxina o una combinación de estas cosas, la endotoxina insertada en la micela de detergente en el panel (a) es más estable, y por tanto menos resistente a la alteración con modulador de alteración, que cualquiera de las situaciones iniciales en la figuras 1 y 2. Se requieren medidas adicionales para desestabilizar el complejo de detergente-endotoxina de modo que, una vez desestabilizado, el sistema modulador pueda alterar la micela y liberar la endotoxina insertada.

Para este fin, el supuesto mostrado en la figura 3 conlleva el uso de un agente que influye en la estabilidad de los enlaces de hidrógeno en disolución, simbolizados por cuadrados pequeños añadidos por encima de las flechas de equilibrio entre los paneles (a) y (b), y mostrados en su interacción con el complejo de micela-endotoxina en el panel (b). Tal como se mencionó anteriormente, una sustancia útil como agente que influye en la estabilidad de los enlaces de hidrógeno en disolución es calcio divalente.

Con el complejo entre el enmascarador detergente y la endotoxina enmascarada así desestabilizado, se añade un sistema modulador que comprende tanto un modulador de adsorción como un modulador de desplazamiento (véase por encima de las flechas de equilibrio entre los paneles (b) y (c)) para desplazar la endotoxina de la micela ya desestabilizada de detergente de enmascaramiento. Tal como se mencionó anteriormente, el modulador de desplazamiento puede ser dodecilsulfato de sodio (SDS), por sí mismo un detergente. La posibilidad de que el sistema modulador contenga un componente que es por sí mismo un detergente y que puede formar nuevas micelas por sí mismo, se representa en el panel (c) de la figura 3 mediante un círculo discontinuo, en el que se inserta la endotoxina. Sin embargo, en las condiciones prevalentes en la figura 3, cualquier micela formada por el modulador de desplazamiento no es tan estable como la micela formada por el detergente de enmascaramiento mostrado en el panel (a). Esto se debe al menos parcialmente a que el modulador de adsorción, por ejemplo BSA mostrado en la figura 3 también se une al modulador de desplazamiento sobre su superficie, estableciendo un equilibrio entre poblaciones que forman micelas y unidas a proteína del modulador de desplazamiento que desestabiliza eficazmente cualquier micela formada por el modulador de desplazamiento.

La presencia de un modulador de alteración y reconfiguración, por ejemplo una especie anfífila que no forma micelas tal como 1-dodecanol, se muestra por encima de las flechas de equilibrio entre los paneles (c) y (d) de la figura 3. El resto del esquema mostrado en la figura 3 es análogo a lo que ya se ha comentado en detalle anteriormente en el contexto de las figuras 1 y 2. En resumen, el modulador de alteración y reconfiguración mostrado entre los paneles (c) y (d) de la figura 3 libera y solubiliza endotoxina insertada transitoriamente en micelas formadas por el modulador de desplazamiento, estableciendo al mismo tiempo un equilibrio entre especies de endotoxina solubilizadas (no detectables) y agregadas (detectables). Este equilibrio puede desplazarse a la derecha (hacia la forma agregada) mediante el agente que influye en la estabilidad de los enlaces de hidrógeno en disolución (por ejemplo una sal con un catión, preferiblemente un catión divalente y/o un agente caotrópico).

Globalmente, la figura 3 muestra la liberación de una molécula de endotoxina enmascarada de un complejo estable con una micela de un enmascarador detergente. Usa un agente que influye en la estabilidad de los enlaces de hidrógeno en disolución para desestabilizar este complejo, y un modulador de múltiples componentes que en total

altera este complejo y une a chaperona la endotoxina liberada a través de una serie de mínimos energéticos en el sentido final de un complejo de endotoxina agregado y por tanto detectable.

Desenmascaramiento de endotoxina enmascarada por un enmascarador proteico con un modulador de dos componentes que comprende un modulador de desplazamiento y un modulador de alteración y reconfiguración

5 La figura 4 es una representación esquemática de un supuesto en el que una endotoxina se enmascara por una proteína en disolución. Esto se muestra en el panel (a) de la figura 4. En el supuesto representado en la figura 4, la proteína, que puede ser por ejemplo un API en una formulación farmacéutica, presenta una hendidura de unión que es tanto estérica como electrostáticamente adecuada para unirse de manera estable a endotoxina. De este modo, el enmascarador proteico se une a moléculas de endotoxina, volviéndolas indetectables. La adición de un componente de modulador, simbolizado por el modulador de desplazamiento añadido por encima de las flechas de equilibrio entre los paneles (a) y (b) de la figura 4, desplaza la endotoxina de su sitio de unión sobre el enmascarador proteico. Este modulador de desplazamiento puede ser por ejemplo un “segundo compuesto alifático sustituido con heteroátomo que comprende de 8 a 16 átomos de carbono” tal como se comentó anteriormente. En el caso de que el modulador de desplazamiento sea por ejemplo dodecilsulfato de sodio, este modulador de desplazamiento puede unirse a la superficie de la proteína de enmascaramiento, desplazando la molécula de endotoxina de su posición de unión estable dentro de la hendidura de unión de la proteína. Esto se muestra en la porción izquierda del panel (b) de la figura 4. Además, tal como se simboliza mediante el círculo discontinuo en la porción derecha del panel (b), el componente de modulador de desplazamiento también puede formar micelas transitorias por sí mismo, esencialmente uniendo a chaperona la endotoxina liberada del enmascarador proteico en una forma insertada de manera estable en la capa lipídica de la micela. La posición exacta del equilibrio mostrado en el panel (b) de la figura 4 depende de la eficacia con la que el modulador de desplazamiento se une a la superficie de la proteína de enmascaramiento (porción izquierda del panel (b)), así como la estabilidad de la micela formada (porción derecha del panel (b)).

Independientemente de la posición exacta de este equilibrio, lo importante es que el modulador de desplazamiento representado por encima de las flechas de equilibrio entre los paneles (a) y (b) de la figura 4 tiende a liberar la endotoxina de su posición de unión energéticamente estable en o sobre la proteína de enmascaramiento.

Una vez liberada esta endotoxina de su estado enmascarado en o sobre la proteína de enmascaramiento, un componente de modulador adicional (modulador de alteración y reconfiguración), representado por encima de las flechas de equilibrio entre los paneles (b) y (c) de la figura 4 desplaza la relaciones energéticas prevalentes en disolución de manera que el estado más estable de la endotoxina está en forma libremente solubilizada, unida a chaperona en disolución mediante el modulador de alteración y reconfiguración. Este modulador de alteración y reconfiguración puede ser por ejemplo un “primer compuesto alifático sustituido con heteroátomo que comprende de 8 a 16 átomos de carbono” tal como se comentó anteriormente, que puede ser por ejemplo 1-dodecanol. Tal como se comentó anteriormente, este modulador de alteración y reconfiguración tendrá normalmente la propiedad de alterar las micelas existentes (por ejemplo formadas por el modulador de desplazamiento, y se muestran en la porción derecha del panel (b)), aunque no forma micelas por sí mismo. Con cualquier micela previa del modulador de desplazamiento así alterada, y con el modulador de alteración y reconfiguración que no puede formar micelas correspondientes por sí mismo, la forma más estable energéticamente de la endotoxina pasa a ser la forma solubilizada mostrada en el panel (c) de la figura 4, unida a chaperona por el modulador de alteración y reconfiguración.

El resto de la figura 4 es tal como se comentó anteriormente para la etapa de equilibrio final en las figuras 1 y 3. En resumen, existe un equilibrio entre endotoxina individual, solubilizada (panel (c)) y endotoxina agregada (panel (d)). Hasta el punto de que cualquier población apreciable de endotoxina agregada existe como parte de este equilibrio, la endotoxina se vuelve detectable cuando no lo era previamente, unida de manera estable en o sobre la proteína de enmascaramiento. De manera global, la endotoxina que estaba previamente enmascarada en forma individualizada mediante una proteína se ha desenmascarado y vuelto detectable ajustando las condiciones de disolución de manera que el estado más favorable energéticamente en el que puede encontrarse la endotoxina pasa a ser su forma agregada detectable. Entonces, como en las figuras previas comentadas anteriormente, el “desenmascaramiento” es el resultado de la manipulación de las condiciones de disolución para desplazar el equilibrio de un estado en el que la endotoxina se estabiliza en forma individualizada (“enmascarada”) hacia un estado en el que la endotoxina está agregada y es detectable (“desenmascarada”).

Desenmascaramiento de endotoxina enmascarada por una proteína usando un modulador de múltiples componentes que comprende un modulador de adsorción (proteína), un modulador de desplazamiento y un modulador de alteración/reconfiguración, en combinación con un agente que influye en la estabilidad de los enlaces de hidrógeno

El supuesto inicial mostrado en la figura 5 corresponde al mostrado en la figura 4: se une de manera estable endotoxina en o sobre una proteína presente en la composición. Esta proteína en la composición, que puede ser por ejemplo un API, funciona por tanto como “enmascarador de endotoxinas”. Tal como ya se comentó en el contexto del supuesto representado en la figura 3, la endotoxina está complejada de manera tan estable con el enmascarador de endotoxinas en el panel (a) de la figura 5 que la simple adición de modulador solo no puede liberarla. En la figura

3, comentada anteriormente, el enmascarador de endotoxinas era un detergente, que formó una micela en la que se insertó una única molécula de endotoxina de manera muy estable. Ahora en la figura 5, el enmascarador de endotoxinas es una proteína con un sitio de unión propenso a unión a endotoxina estable. Pero el principio sigue siendo el mismo: ya esté insertada en la capa lipídica de una micela de detergente (figura 3) o resida de manera estable en o sobre una proteína, la endotoxina se estabiliza hasta un punto de que la simple adición de un modulador no puede superarlo y la endotoxina así solubilizada permanece indetectable.

Tal como se explicó anteriormente para la figura 3, este complejo estable entre endotoxina y enmascarador de endotoxina puede desestabilizarse mediante la adición de un agente que influye en la estabilidad de los enlaces de hidrógeno en disolución, por ejemplo una sal o un agente caotrópico, por ejemplo calcio divalente. Este agente que influye en la estabilidad de los enlaces de hidrógeno se simboliza en la figura 5 por cuadrados pequeños que comienzan sobre las flechas de equilibrio entre los paneles (a) y (b). Este agente altera la red de enlaces de hidrógeno que se supone que existe entre la endotoxina y el enmascarador proteico, elevando así la energía libre del complejo hasta un nivel en el que los componentes de modulador, que se muestran por encima de las flechas de equilibrio entre los paneles (b) y (c), pueden romper el complejo hasta tal punto que la endotoxina se desaloja de la proteína de enmascaramiento.

Entonces se supone que el uso de un sistema modulador que comprende tanto un modulador de adsorción (proteína) como un modulador de desplazamiento tal como se muestra en la figura 5, conduce a la situación de equilibrio mostrada en el panel (c). En la porción izquierda del panel (c) está la proteína de enmascaramiento, ahora despojada de la endotoxina previamente unida. Las moléculas del agente que influye en la estabilidad de los enlaces de hidrógeno en disolución así como del modulador de desplazamiento, por ejemplo SDS, se muestran unidas a la superficie de la proteína de enmascaramiento, incluyendo en el sitio de unión en el que estaba previamente unida la endotoxina. Esta representación pretende representar el hecho de que el modulador de desplazamiento desplaza eficazmente la endotoxina de su posición estable en o sobre la proteína de enmascaramiento. La porción central del panel (c) de la figura 5 muestra una micela que podría formarse mediante el modulador de desplazamiento (por ejemplo SDS), con una molécula de endotoxina insertada transitoriamente en la capa lipídica de la micela. Las moléculas del agente que influye en la estabilidad de los enlaces de hidrógeno en disolución también se muestran unidas a endotoxina y micela, y sirven para desestabilizar adicionalmente esta micela, garantizando que la micela permanece de hecho transitoria y no presenta a la endotoxina un mínimo de unión de energía del que no puede desalojarse mediante un modulador de alteración adicional. Finalmente, la porción derecha del panel (c) muestra el modulador de adsorción (proteína) actuando, tal como se describió de manera resumida anteriormente, como "esponja molecular" que adsorbe tanto el agente que influye en la estabilidad de los enlaces de hidrógeno en disolución así como el modulador de desplazamiento sobre su superficie. Esto agota eficazmente estas especies en disolución, desestabilizando la micela transitoria mostrada en la porción central del panel (c) hasta el punto de que se agota el modulador de desplazamiento, al tiempo que la estabiliza hasta el punto de que se agota el agente que influye en la estabilidad de los enlaces de hidrógeno en disolución. Sin embargo, generalmente la cantidad del agente que influye en la estabilidad de los enlaces de hidrógeno en disolución será lo suficientemente alta como para desestabilizar el complejo inicial entre proteína de enmascaramiento y endotoxina de modo que persistirá lo suficiente de este agente en disolución a pesar del agotamiento por el modulador de adsorción, de modo que la micela transitoria mostrada en el panel (c) se desestabilizará tal como se desea.

El uso de un modulador de alteración y reconfiguración, por ejemplo tal como se muestra por encima de las flechas de equilibrio entre los paneles (c) y (d) de la figura 5 (por ejemplo 1-dodecanol), romperá entonces la micela transitoria mostrada en el panel (c) para liberar la molécula de endotoxina insertada. Tal como ya se comentó anteriormente, la endotoxina así solubilizada (panel (d)) entrará entonces en una relación de equilibrio con una forma reconfigurada, agregada, de endotoxina (panel (e)) que puede detectarse tal como se comentó anteriormente.

Desenmascaramiento de endotoxina enmascarada tanto por proteína como por enmascaradores detergentes con un modulador de múltiples componentes que comprende un modulador de adsorción (proteína), un modulador de desplazamiento y un modulador de alteración/reconfiguración, en combinación con un agente que influye en la estabilidad de los enlaces de hidrógeno en disolución

Muchos API proteicos, por ejemplo, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, hormonas, enzimas, proteínas de fusión o conjugados proteicos, se formulan y comercializan a concentraciones tan altas que deben incluirse detergentes en disolución para evitar la agregación no deseada de proteínas. El supuesto inicial mostrado en la figura 6 es por tanto representativo de una de las situaciones más relevantes en el campo de formulación farmacéutica porque están presentes tanto enmascaradores detergentes como proteicos (por ejemplo proteína de API). La molécula de endotoxina se muestra insertada en la capa lipídica de una micela de detergente (de nuevo simbolizada por un anillo de círculos blancos que representan moléculas de detergente individuales) así como unida en o sobre la proteína de enmascaramiento. En realidad, es probable que estas dos especies existan en equilibrio, estando dictada la posición relativa de este equilibrio, hacia una especie de endotoxina unida o bien a micela o bien a proteína, por la estabilidad relativa de los respectivos complejos. Siendo todo lo demás igual, prevalecerá generalmente el complejo de energía libre inferior, y por tanto mayor estabilidad.

La discusión de la figura 6 es análoga a la de la figura 5 anterior, siendo la única diferencia que el panel (b) de la figura 6 muestra la especie de endotoxina unida tanto a proteína como a micela en equilibrio mutuo, cada una

desestabilizada por el agente que influye en la estabilidad de los enlaces de hidrógeno en disolución. El uso de un modulador de adsorción y un modulador de desplazamiento conduce a la situación de equilibrio representada en el panel (c) de la figura 6. La discusión anterior para el panel (c) de la figura 5 se aplica en este caso correspondientemente. El uso de un modulador de alteración y reconfiguración adicional (mostrado por encima de las flechas de equilibrio entre los paneles (c) y (d)) que puede alterar la micela transitoria del panel (c) sin formar micelas por sí mismo, libera la endotoxina de su estado unido transitoriamente en una micela de modulador de desplazamiento (porción central del panel (c)), y produce la relación de equilibrio entre las formas soluble (no detectable) y agregada (detectable) de endotoxina tal como se comentó anteriormente. Tal como se explicó anteriormente para las figuras anteriores, el modulador de alteración y reconfiguración mostrado en el panel (d) se muestra en equilibrio entre estados unidos a la endotoxina liberada (porción superior del panel (d)) y al detergente que constituía previamente la micela de detergente mostrada en el panel (a) (porción inferior del panel (d)).

Debe indicarse que los supuestos anteriores pretenden ilustrar los principios que los presentes inventores creen que subyacen al efecto de desenmascaramiento ventajoso de la presente invención en diferentes situaciones. A partir de las figuras ilustrativas 1-6, quedará claro que los procesos comentados son todos procesos en equilibrio, y que por consiguiente no hay ningún requisito previo para el orden de adición de diferentes componentes del sistema modulador o, si se usa, del agente que influye en la estabilidad de los enlaces de hidrógeno y disolución. Los equilibrios mostrados se establecerán por tanto automáticamente tan pronto como los componentes estén presentes juntos en disolución. El "orden" de adición de estos componentes implicado en la discusión anterior y mostrado en las figuras 2-6 sirve por tanto meramente para ilustrar los mecanismos que los presentes inventores creen que subyacen al efecto técnico ventajoso de la presente invención. Por consiguiente, el desenmascaramiento de una endotoxina previamente enmascarada puede lograrse añadiendo componentes en puntos de tiempo separados tal como se sugiere mediante las figuras 2-6, sin embargo el efecto de desenmascaramiento deseado también puede lograrse cuando los componentes representados en la figuras 2-6 se añaden todos de una vez.

En el sentido más general, los supuestos representados anteriormente en las figuras 1-6 y la discusión correspondiente deben ilustrar los siguientes principios generales, que están previstos como directrices generales para el experto en la implementación de la presente invención. Muchas disoluciones que dan resultados negativos en pruebas para la detección de endotoxinas mediante métodos convencionales contienen realmente endotoxinas en forma enmascarada. Los métodos convencionales detectan endotoxinas en su forma agregada, de modo que el hecho de que existan muchas disoluciones, tales como formulaciones farmacéuticas, que dan resultados negativos en pruebas para la detección de endotoxinas no significa necesariamente que estas disoluciones no contengan endotoxinas, sino más bien que no contienen endotoxinas en forma detectable.

En su forma más general, los métodos de la invención permiten el desenmascaramiento de endotoxinas, por ejemplo desestabilizando complejos entre endotoxinas y enmascaradores de endotoxinas para liberar, y en última instancia agregar, moléculas de endotoxina individuales, haciendo así que endotoxinas previamente indetectables se vuelvan detectables. La liberación de endotoxina de sus complejos enmascarados con enmascaradores de endotoxinas puede resultar directamente del uso de un modulador de alteración y reconfiguración para romper tales complejos o, para complejos especialmente estables, estos pueden desestabilizarse y luego romperse con un modulador de este tipo o con un sistema modulador de múltiples componentes. Independientemente de cómo se libere la endotoxina unida, el efecto neto es que la endotoxina pasa de una forma unida de manera estable a una forma soluble transitoria que entonces puede agregarse. Entonces, en su sentido más amplio, los métodos de la presente invención conllevan ajustar las condiciones de disolución tal como se describió anteriormente para llevar la endotoxina previamente enmascarada a través de una serie de equilibrios, en los que la transición final da como resultado la agregación de endotoxinas en una forma que es detectable.

Puesto que el desenmascaramiento y/o la detección de endotoxina según los métodos descritos en el presente documento dependen de una reconfiguración final de endotoxina liberada en forma solubilizada (indetectable) para dar una forma agregada (detectable), será necesario generalmente un modulador de reconfiguración. Este modulador de reconfiguración (por ejemplo 1-dodecanol) tendrá generalmente la característica de no formar micelas por sí mismo, al tiempo que estabiliza moléculas de endotoxina individuales de manera que estas pueden entrar en un equilibrio con formas agregadas de endotoxina. Tal como queda claro a partir de lo anterior, un modulador de reconfiguración también funcionará algunas veces, pero no necesariamente, como modulador de alteración que puede romper un complejo inicial entre endotoxina y una micela de detergente de enmascaramiento y/o un complejo entre endotoxina y una micela transitoria de modulador de desplazamiento.

Los siguientes ejemplos, incluyendo los experimentos realizados y los resultados logrados, se proporcionan únicamente con fines ilustrativos y no se interpreta que limiten la presente invención.

Ejemplos

Introducción

El enmascaramiento de endotoxinas es un fenómeno común en composiciones farmacéuticas, especialmente

productos farmacológicos biofarmacéuticos. El enmascaramiento de endotoxinas está controlado por varios factores, conduciendo al final a la no detectabilidad o al menos una detectabilidad disminuida de la endotoxina en el producto farmacológico.

- 5 En un supuesto, el enmascaramiento no está provocado por el principio activo farmacéutico (API) en sí, por ejemplo, proteína, sino por los componentes de formulación. Tales componentes son detergentes, que se añaden para impedir la agregación de la proteína, y sustancias tampón como citrato, fosfato, Tris, acetato, histidina, glicina que se añaden para el ajuste del pH del producto.

- 10 Naturalmente, la cinética de enmascaramiento está influida por la temperatura, procediendo el enmascaramiento más rápidamente a mayores temperaturas que a menores temperaturas. A menos que se especifique lo contrario, todos los experimentos descritos a continuación se realizaron a temperatura ambiente. Esta es la temperatura a la que se realizan a menudo las etapas del procedimiento de producción del principio activo farmacéutico (API), y es por tanto, la temperatura más relevante para valorar la aplicabilidad de los métodos de la invención descritos en el presente documento con respecto a procedimientos industriales.

- 15 Ejemplo 1: Desenmascaramiento de endotoxinas a partir de un sistema de enmascaramiento de polisorbato 20/citrato usando un modulador de alteración y reconfiguración (1-dodecanol) solo, y junto con un modulador absorbente adicional (BSA)

- 20 Se eligió un sistema de enmascaramiento de polisorbato 20/citrato para el primer experimento porque a menudo se incluyen citrato y polisorbato 20 en bioformulaciones farmacéuticas. Se pretende que estos experimentos determinen si la endotoxina enmascarada puede liberarse de un complejo con enmascarador de detergente mediante la adición de un modulador de alteración y reconfiguración tal como se describe en el presente documento.

Materiales y métodos

- 25 Se realizó enmascaramiento de endotoxinas tal como sigue. Se preparó 1 ml de alícuotas acuosas de citrato 10 mM pH 7,5 que contenía el 0,05% (p/v) de polisorbato 20 en tubos de ensayo de vidrio libres de endotoxinas. Posteriormente, se añadieron 10 µl de una disolución madre de LPS 10.000 UE/ml (LPS 055 B5, Sigma L2637-5MG), se agitó con vórtex la disolución resultante durante 1 min y se almacenó a temperatura ambiente durante al menos 24 horas. Como control positivo de LPS que contiene LPS no enmascarado, se añadieron 10 µl de una disolución madre de LPS 10.000 UE/ml a 1 ml de agua libre de endotoxinas, se mezcló y se incubó de manera idéntica a las preparaciones de enmascaramiento, pero sin polisorbato 20. El control positivo de LPS-agua se describe en más detalle a continuación.

- 30 Se realizó enmascaramiento de endotoxinas tal como sigue. Se añadieron 100 µl de disoluciones madre de cada uno de 1-dodecanol (modulador de alteración y reconfiguración) disuelto en etanol al 100% y BSA 100 mg/ml (modulador de adsorción) disuelto en agua libre de endotoxinas. Se usan 1-dodecanol y BSA en este caso como los dos componentes de un sistema modulador de dos componentes. Se realizó un experimento de desenmascaramiento separado de manera idéntica a lo anterior, excepto porque se usó un modulador de un único componente. El modulador único en este experimento fue 1-dodecanol solo, es decir, sin BSA. Las concentraciones de las disoluciones madre de 1-dodecanol fueron de 400, 200, 100, 50, 25, 12,5 y 6,25 mM. Para desenmascarar, se añadieron secuencialmente las disoluciones madre de desenmascaramiento de BSA y 1-dodecanol con mezclado de 2 minutos agitando con vórtex tras cada adición. Tras mezclar, se incubaron las muestras durante 30 minutos a temperatura ambiente sin mezclado.

- 40 Se analizó el contenido en endotoxinas usando EndoLISA® (Hyglos GmbH) según las instrucciones del kit. Las diluciones de muestra fueron de 1:10 y 1:100 en agua libre de endotoxinas.

- 45 Se calculó la recuperación de endotoxinas como un porcentaje de recuperación de un control de LPS-agua separado que contenía sólo agua y LPS sin ningún componente de enmascaramiento. En ausencia de cualquier enmascarador de endotoxinas, ningún LPS en este control de LPS-agua debe enmascarse, es decir, todo el LPS presente en este control de LPS-agua debe poder detectarse. De esta manera, el control de LPS-agua actúa como patrón para determinar tanto cualitativamente así como cuantitativamente si el kit de detección EndoLisa® empleado está funcionando de manera adecuada para detectar LPS (control cualitativo), y si todo el LPS que se sabe que está presente en el control es, de hecho, detectado (control cuantitativo).

Resultados

- 50 Los datos de recuperación en la figura 7 y la tabla 1 (a continuación) muestran que mediante la adición de BSA y/o 1-dodecanol en concentraciones de desde 20 hasta 2,5 mM, puede recuperarse endotoxina enmascarada hasta un grado superior al 100%. En ausencia de BSA, no puede lograrse el 100% de recuperación pero, más bien, superior al 50% en el intervalo de 10 a 2,5 mM de 1-dodecanol con una recuperación máxima a 1-dodecanol 5 mM de aproximadamente el 90%.

- 55 En este y los siguientes ejemplos, recuperaciones de superiores al 100% de LPS deben interpretarse en vista de lo siguiente: se ha encontrado que la actividad de LPS depende de tanto la forma de LPS (por ejemplo, el grado y la

orientación de agregación) así como la estructura de LPS estructura (esta estructura varía ligeramente en LPS que se deriva de diferentes especies bacterianas). Los métodos de desenmascaramiento de la invención descritos en el presente documento tienen el potencial de alterar tanto la forma como la orientación de la agregación de LPS (efectivamente, es debido a tal alteración promovida por el modulador, especialmente el modulador de reconfiguración, que es posible el desenmascaramiento de LPS). El cambio en forma y orientación de la agregación de LPS entre el control de LPS-agua (no desenmascarado) y las muestras desenmascaradas puede en algunos casos provocar que la actividad detectada tras el desenmascaramiento exceda la medida en el control positivo de LPS-agua. Esto no significa que realizar los métodos de desenmascaramiento de la invención tal como se describe en el presente documento genere LPS nuevo no presente previamente, sino más bien en algunos casos, realizar los métodos de desenmascaramiento de la invención tal como se describe en el presente documento altera la forma de LPS existente de modo que la actividad medida aparente para una cantidad dada de LPS aumenta.

Tabla 1

1-dodecanol (mM)	BSA (mg/ml)	% de recuperación de LPS
40	--	28
20	--	46
10	--	60
5	--	89
2,5	--	65
1,25	--	31
0,625	--	7
40	10	70
20	10	157
10	10	186
5	10	170
2,5	10	134
1,25	10	71
0,625	10	0

Los resultados demuestran claramente que puede desenmascarse endotoxina enmascarada mediante la adición del modulador 1-dodecanol (modulador de alteración y reconfiguración) solo. Los resultados muestran además que este efecto de desenmascaramiento puede mejorarse mediante la adición de un modulador absorbente adicional (BSA). En este último caso en el que se añadieron 1-dodecanol y BSA como modulador de dos componentes, el BSA ayuda a absorber detergente, desestabilizando así la micela de detergente que enmascara la endotoxina, el modulador 1-dodecanol, puede alterar micelas de detergente (en su capacidad como modulador de alteración) y reconfigurar endotoxina liberada para dar una estructura de agregado (en su capacidad como modulador de reconfiguración). En el caso de polisorbato 20 en ausencia de BSA, es posible una recuperación casi cuantitativa (el 89% a 1-dodecanol 5 mM). Esto puede deberse a la similitud en la longitud de las cadenas de alquilo de 1-dodecanol y el detergente que enmascara LPS polisorbato 20. El desenmascaramiento se mejora mediante la adición de BSA, que se supone que desplaza el equilibrio de LPS desde la forma solubilizada hasta la forma agregada (véase, por ejemplo, la figura 2).

Ejemplo 2: Desenmascaramiento de endotoxina a partir de un sistema de enmascaramiento de polisorbato 20/citrato usando alcoholes de diferente longitud de cadena de alquilo como moduladores de alteración y reconfiguración

Este experimento investiga el uso de diversos alcoholes alquílicos como moduladores de alteración y reconfiguración. Un objetivo de los experimentos descritos en este ejemplo era investigar la relación entre la longitud de la cadena de alquilo en el alcohol y la eficacia de desenmascaramiento. Para este fin, se realizó desenmascaramiento mediante la adición de alcoholes con longitudes de cadena de átomo de carbono de desde C8-C18 en diferentes concentraciones.

Materiales y métodos

Se realizó enmascaramiento de endotoxinas tal como se describió en el ejemplo 1. Se realizó desenmascaramiento mediante la adición de disoluciones madre de 1-alcoholes no ramificados de diferentes longitudes de la cadena de alquilo (C₈, C₁₀, C₁₂, C₁₄, C₁₆, C₁₈) como moduladores (moduladores de alteración y reconfiguración) tal como se describió en el ejemplo 1 para 1-dodecanol (que tenía una cadena de alquilo de 12 carbonos). Se disolvió cada una de las disoluciones madre en etanol al 100%. Al contrario que determinados experimentos descritos anteriormente en el ejemplo 1, no se incluyó ningún otro componente de modulador, por ejemplo BSA, en los presentes experimentos de desenmascaramiento. Se realizó análisis de concentraciones de endotoxinas usando el kit EndoLisa® (Hyglos GmbH), y se expresó el posterior cálculo de recuperación de endotoxinas como un porcentaje del LPS en el control de la muestra de LPS-agua. El control positivo de LPS-agua se explica en detalle en el ejemplo 1, anteriormente.

Resultados

La tabla 2 (a continuación) muestra el porcentaje de endotoxina desenmascarada como dependiente de la concentración de alcohol y la longitud de la cadena de alquilo en el alcohol.

Tabla 2

Conc. (mM)	% de recuperación de LPS					
	1-octanol	1-decanol	1-dodecanol	1-tetradecanol	1-hexadecanol	1-octadecanol
40	0	0	28	10	nd	nd
20	0	0	46	36	1	1
10	0	0	60	44	3	1
5	0	1	89	28	3	0
2,5	0	5	65	16	0	3
1,25	0	1	31	25	0	1
0,625	1	4	7	10	2	1

5 nd = sin datos

Se lograron recuperaciones de endotoxinas de, es decir, desenmascaramiento endotoxina, más del 40% usando 1-dodecanol y 1-tetradecanol. Las recuperaciones usando alcoholes con longitudes de la cadena de alquilo por debajo o por encima de C12 y C14 están por debajo del 10%.

10 Los resultados anteriores implican que la longitud de la cadena de alquilo del alcohol usado como modulador de alteración y reconfiguración debe coincidir idealmente con la longitud de la cadena de alquilo de las cadenas de acilo en la endotoxina lo más estrechamente posible.

En el presente caso, las longitudes de las cadenas de acilo en el componente de lípido A de LPS son de C12 y C14, y fueron los 1-alcoholes que tenían longitudes de la cadena de alquilo en ese intervalo los que, cuando se usan como moduladores de alteración y reconfiguración, desenmascararon de manera más eficaz la endotoxina.

15 Ejemplo 3: Desenmascaramiento de endotoxinas a partir de sistemas de enmascaramiento de diversos tensioactivos no iónicos usando 1-dodecanol como modulador de alteración y reconfiguración solo, y junto con el modulador de adsorción BSA

20 Para investigar la hipótesis de que el desenmascaramiento endotoxina a partir de polisorbato 20 por 1-dodecanol solo está promovido por longitud de la cadena de alquilo equivalente o similar del tensioactivo de enmascaramiento y 1-dodecanol, se diseñaron diversos experimentos usando detergentes de enmascaramiento de diferentes longitudes de cadena y diferente estructura, y estos se desenmascararon usando un modulador de alteración y reconfiguración de longitud de la cadena de alquilo fija (1-dodecanol, con una cadena de alquilo C₁₂). Para este fin, se prepararon muestras enmascaradas en polisorbato 80 y Triton X-100 y estas se desenmascararon posteriormente con 1-dodecanol o BSA/1-dodecanol usando diferentes concentraciones de 1-dodecanol.

25 Materiales y métodos

30 Se realizó enmascaramiento de endotoxinas tal como sigue: se prepararon en tubos de ensayo de vidrio libres de endotoxinas, alícuotas de 1 ml de citrato 10 mM pH 7,5 que contenía el 0,05% de polisorbato 20, polisorbato 80 o Triton X-100. Posteriormente, se añadieron 10 µl de una disolución madre de LPS 10.000 UE/ml (LPS 055 B5, Sigma L2637-5MG), se agitó con vórtex durante 1 min y se almacenó a temperatura ambiente durante al menos 24 horas. Como control positivo de LPS, se añadieron 10 µl de una disolución madre de LPS 10.000 UE/ml a 1 ml de agua libre de endotoxinas, se mezcló y se incubó de manera idéntica a las preparaciones de enmascaramiento. El control positivo de LPS-agua se comenta en detalle anteriormente en el ejemplo 1.

35 Se realizó desenmascaramiento mediante la adición de disoluciones madre de 1-dodecanol (como modulador de alteración y reconfiguración) en diferentes concentraciones tal como se describió en el ejemplo 1. Se disolvieron disoluciones madre de los alcoholes respectivos en el 100% de etanol. Se realizó desenmascaramiento tanto en ausencia como en presencia de BSA 10 mg/ml tal como se describió en el ejemplo 1.

Se realizó análisis de las concentraciones de endotoxinas con el kit EndoLisa® (Hyglos GmbH), con posterior cálculo de recuperación de endotoxina expresado como un porcentaje de la endotoxina en la muestra de control de LPS/agua.

40 Resultados

La tabla 3 (a continuación) muestra las recuperaciones de LPS tras el desenmascaramiento a partir de los respectivos sistemas de enmascaramiento de polisorbato 20/citrato, polisorbato 80/citrato y Triton X-100/citrato como dependientes de la concentración de 1-dodecanol (modulador de alteración y reconfiguración) en ausencia o presencia de BSA (modulador de adsorción).

45 Tabla 3

Dodecanol (mM)	BSA (mg/ml)	% de recuperación de LPS		
		Polisorbato 20	Polisorbato 80	Triton X-100
40	--	28,0	4,9	nd
20	--	46,2	7,5	3,4
10	--	60,5	11,5	nd
5	--	89,1	25,2	0,0
2,5	--	64,9	28,5	nd
1,25	--	31,2	12,1	0,0
0,625	--	7,2	0,0	nd
0,313	--	nd	nd	0,0
40	10	69,7	19,4	nd
20	10	156,8	36,4	2,0
10	10	186,1	69,9	nd
5	10	170,5	86,9	23,0
2,5	10	133,5	94,2	nd
1,25	10	71,3	2,9	0,0
0,625	10	0,0	12,9	nd
0,313	10	nd	nd	0,0

nd = sin datos

5 El desenmascaramiento con 1-dodecanol a partir del sistema de enmascaramiento de polisorbato 80/citrato da como resultado la recuperación de aproximadamente el 30% a una concentración óptima de 1-dodecanol de 2,5 mM. En presencia de BSA puede recuperarse hasta el 90%. Ambos enfoques de desenmascaramiento a partir del sistema de enmascaramiento de Triton X-100 (es decir, con y sin BSA) dan como resultado recuperaciones de LPS por debajo del 20%, independientemente de la concentración de 1-dodecanol.

10 Por tanto, el desenmascaramiento usando 1-dodecanol solo (como modulador de alteración y reconfiguración) es suficiente para desenmascarar LPS a partir de sistemas de enmascaramiento tales como en el sistema de enmascaramiento de polisorbato 20. La adición de BSA (como modulador de adsorción) para adsorber el detergente de enmascaramiento mejora las recuperaciones de desenmascaramiento en los sistemas de enmascaramiento de polisorbato 20 y polisorbato 80. El desenmascaramiento a partir del sistema de Triton X-100 no es altamente eficaz incluso cuando se añade BSA junto con 1-dodecanol. Añadir un componente de modulador adicional tal como por ejemplo SDS (como modulador de desplazamiento) puede ayudar a mejorar la recuperación de LPS a partir de 15 formulaciones de enmascaramiento de Triton-X-100.

Ejemplo 4: Eficacia de desenmascaramiento creciente mediante la adición de un modulador y un agente caotrópico que influye en la estabilidad de los enlaces de hidrógeno

20 La débil recuperación de LPS a partir del sistema de enmascaramiento de Triton X-100 usando el sistema de modulador doble de BSA (modulador de adsorción) y 1-dodecanol (modulador de alteración y reconfiguración) puede deberse a la alta estabilidad del complejo formado por Triton X-100 y LPS. Esta alta estabilidad puede impedir la destrucción deseada de las micelas de enmascaramiento de endotoxinas de Triton X-100 mediante la acción alterante de 1-dodecanol y adsorción del detergente por BSA.

25 Por esta razón, los presentes experimentos investigan la posibilidad de desestabilizar el complejo de enmascaramiento mediante la adición de una sal caotrópica junto con un modulador de múltiples componentes. La esperanza era que desestabilizando una micela de detergente de lo contrario estable, la destrucción de esta micela usando un sistema de modulador de múltiples componentes de 1-dodecanol (como modulador de alteración y reconfiguración), BSA (como modulador de adsorción) y SDS (como modulador de desplazamiento) entonces se volvería posible.

Materiales y métodos

30 Se realizó enmascaramiento de endotoxinas tal como sigue: se prepararon en tubos de ensayo de vidrio libres de endotoxinas, alícuotas de 1 ml de citrato 10 mM pH 7,5 que contenía el 0,05% de Triton X-100. Posteriormente, se añadieron 10 µl de una disolución madre de LPS 10.000 UE/ml (LPS 055 B5, Sigma L2637-5MG), se agitaron con vórtex durante 1 min y se almacenaron a temperatura ambiente durante al menos 24 horas. Como control positivo de LPS, se añadieron 10 µl de una disolución madre de LPS 10.000 UE/ml a 1 ml de agua libre de endotoxinas, se 35 mezclaron y se incubaron de manera idéntica que en las preparaciones de enmascaramiento. El control positivo de LPS-agua se comenta en detalle anteriormente en el ejemplo 1.

Se realizó desenmascaramiento de endotoxinas tal como sigue: se añadieron 100 µl de las siguientes disoluciones madre como único componente o como combinaciones a las muestras enmascaradas de 1 ml: CaCl₂ 1 M (disuelto en agua), BSA 100 mg/ml (disuelto en agua), SDS al 1% (disuelto en agua) y 1-dodecanol 50 mM (disuelto en etanol)

al 100%). En el caso de adición de combinaciones, se añadieron los agentes secuencialmente, con una etapa de agitación con vórtex de 2 minutos entre cada adición. Entonces se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 30 minutos sin agitación.

5 Se analizó el contenido en endotoxinas usando el kit EndoLisa® (Hyglos GmbH) según las instrucciones del kit. Las diluciones de muestra fueron de 1:10 y 1:100 en agua libre de endotoxinas. Se calculó la recuperación de endotoxinas y se expresó como un porcentaje de recuperación del control de LPS-agua. El control positivo de LPS-agua se comenta en detalle anteriormente en el ejemplo 1.

Resultados

10 La figura 8 muestra el porcentaje de recuperación de LPS como dependiente de la adición de combinaciones de CaCl₂ (C), BSA (B; modulador de adsorción), SDS (S; modulador de desplazamiento) y 1-dodecanol (D; modulador de alteración y reconfiguración). 1-Dodecanol como único modulador (de alteración y reconfiguración) no desenmascara eficazmente LPS a partir de un complejo de enmascaramiento de Triton X-100. La adición de BSA (modulador de adsorción) y 1-dodecanol (modulador de alteración y reconfiguración) como sistema de modulador de
15 sal caotrópica tal como CaCl₂ o bien un modulador adicional tal como SDS (modulador de desplazamiento) no da como resultado recuperaciones de LPS superiores al 20%. Sin embargo, la adición de CaCl₂, BSA (modulador de adsorción), SDS (modulador de desplazamiento) y 1-dodecanol (modulador de alteración y reconfiguración) da como resultado recuperaciones de LPS superiores al 100%.

20 Por tanto, adicionalmente a BSA (modulador de adsorción) y 1-dodecanol (modulador de alteración y reconfiguración), una sal caotrópica y un modulador adicional de desplazamiento tal como el detergente SDS ayudan a romper el complejo de enmascaramiento de Triton X-100. De esta manera, la combinación de estos 4 aditivos parece romper el complejo de enmascaramiento y permite la formación de LPS detectable.

Ejemplo 5: Comparación de diferentes enfoques de desenmascaramiento a partir de diversos sistemas de enmascaramiento

25 Se observó un desenmascaramiento eficaz a partir del sistema de enmascaramiento de Triton X-100 usando una combinación de CaCl₂, BSA, SDS y 1-dodecanol, permanece la cuestión de eficacia de desenmascaramiento de este enfoque empezando a partir de sistemas de polisorbato de enmascaramiento. Para resolver esta cuestión, se enmascaró endotoxina en sistemas de enmascaramiento de polisorbato 20, 80 y Triton X-100/citrato y
30 posteriormente se desenmascaró usando 1-dodecanol solo; BSA y 1-dodecanol en combinación; o CaCl₂, BSA, SDS y 1-dodecanol en combinación. En estos experimentos, se usa 1-dodecanol como modulador de alteración y reconfiguración, se usa BSA como modulador de adsorción, se usa SDS como modulador de desplazamiento y se usa CaCl₂ como agente que influye en la estabilidad de los enlaces de hidrógeno en disolución.

Materiales y métodos

35 Se realizó enmascaramiento de endotoxinas tal como sigue: se prepararon en tubos de ensayo de vidrio libres de endotoxinas, alícuotas de 1 ml de citrato 10 mM pH 7,5 que contenían o bien polisorbato 20 al 0,05%, o polisorbato 80 al 0,05% o bien Triton X-100 al 0,05%. Posteriormente, 10 µl de una disolución madre de LPS 10.000 UE/ml (LPS 055 B5, Sigma Aldrich L2637-5MG) se añadieron, se agitaron con vórtex durante 1 min y se almacenaron a temperatura ambiente durante al menos 24 horas. Como control positivo de LPS, se añadieron 10 µl de una
40 disolución madre de LPS 10.000 UE/ml a 1 ml de agua libre de endotoxinas, se mezcló y se incubó de manera idéntica a las preparaciones de enmascaramiento. La función del control positivo de LPS-agua es tal como se describió anteriormente en el ejemplo 1.

Se realizó desenmascaramiento de endotoxinas tal como sigue: se añadieron o bien 100 µl de una disolución madre de 50 mM de 1-dodecanol; o bien 100 µl de BSA 100 mg/ml y 100 µl de una disolución madre de 50 mM de 1-dodecanol; o 100 µl de una disolución de CaCl₂ 1 M, 100 ml de una disolución de BSA 100 mg/ml, 100 µl de una
45 disolución de SDS al 1% y 100 µl de una disolución de 1-dodecanol 50 mM a la disolución que contenía LPS enmascarado. En el caso de adición de combinaciones, se añadieron los agentes secuencialmente con una etapa de agitación con vórtex de 2 minutos entre cada adición. Entonces se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 30 minutos sin agitación.

50 Se analizó el contenido en endotoxinas usando el kit EndoLisa® (Hyglos GmbH) según las instrucciones del kit. Las diluciones de muestra fueron de 1:10 y 1:100 en agua libre de endotoxinas. Se calculó la recuperación de endotoxinas como un porcentaje de recuperación del control de LPS-agua.

Resultados

55 La tabla 4 (a continuación) y la figura 9 muestran los porcentajes de recuperación de LPS usando o bien 1-dodecanol solo; BSA y 1-dodecanol en combinación; o CaCl₂, BSA, SDS y 1-dodecanol en combinación (CBSD) para desenmascarar a partir de diversos sistemas de enmascaramiento de detergente.

Tabla 4

Detergente de enmascaramiento	% de recuperación de LPS		
	1-dodecanol	BSA/1-dodecanol	CBSD
Polisorbato 20	78	170	141
Polisorbato 80	28	94	161
Triton X-100	0	23	168

Se logra desenmascaramiento eficaz (~80%) a partir del sistema de enmascaramiento de polisorbato 20 por 1-dodecanol, BSA 1-dodecanol y CaCl₂/BSA/SDS/1-dodecanol. En el caso de un sistema de enmascaramiento de polisorbato 80, se logra una buena eficacia de desenmascaramiento en presencia de BSA/1-dodecanol y CaCl₂/BSA/SDS/1-dodecanol. En el caso de un sistema de enmascaramiento de Triton X-100, la adición de CaCl₂/BSA/SDS/1-dodecanol da como resultado buena recuperación de LPS.

Por tanto, según la estabilidad del complejo de enmascaramiento, pueden lograrse recuperaciones de endotoxinas eficaces usando diferentes enfoques de desenmascaramiento. Sin embargo, el enfoque de desenmascaramiento que implica la combinación de CaCl₂, BSA, SDS y 1-dodecanol puede ser el método más universal, debido a su capacidad para lograr un desenmascaramiento eficaz, independientemente del sistema de enmascaramiento usado. Como resulta evidente a partir de los experimentos descritos anteriormente en el presente documento, una composición óptima para desenmascarar LPS en cualquier formulación dada puede lograrse fácilmente mediante experimentación de rutina.

Ejemplo 6: Desenmascaramiento de endotoxinas a partir de diferentes fuentes de endotoxina

Se realizaron experimentos de desenmascaramiento de endotoxinas en los ejemplos 1-5 con una preparación de LPS comercialmente disponible, altamente purificada de *E. coli* 055:B5. Como sólo la parte de lípido A conservada de LPS es responsable de la toxicidad y detectabilidad de métodos de detección basados en factor C, puede asumirse que el enfoque de desenmascaramiento descrito anteriormente funcionará igual de bien usando preparaciones de LPS de bacterias distintas de *E. coli* 055:B5. Sin embargo, la bibliografía también describe diferencias en longitud de la cadena de acilo para la parte de lípido A de LPS, así como modificaciones de cadenas laterales. Incluso más, la longitud de las cadenas laterales de O-azúcar de LPS podría potencialmente tener un impacto en el enfoque de desenmascaramiento. Además, no puede excluirse que LPS purificado y endotoxina que se produce de manera natural (NOE) puedan diferir en su comportamiento de desenmascaramiento. Para abordar estos temas, y excluir la posibilidad de que los enfoques de desenmascaramiento son específicos para LPS usado de *E. coli* 055:B5, se enmascararon LPS de diferentes bacterias, diferente longitud de núcleo y cadenas de O-azúcar y diferente pureza en diversos sistemas de enmascaramiento de detergente y posteriormente se desenmascararon usando o bien 1-dodecanol solo, BSA/1-dodecanol o bien CaCl₂/BSA/SDS/1-dodecanol.

Materiales y métodos

Se realizó enmascaramiento de endotoxinas tal como sigue: se añadieron muestras de LPS de diferentes tipos y de diferentes fuentes (aproximadamente 50 UE/ml) a 1 ml de muestras de enmascaramiento que contenían o bien polisorbato 20 al 0,05%, polisorbato 80 al 0,05% o bien Triton X-100 al 0,05% y citrato 10 mM pH 7,5. La fuente, el tipo y el proveedor de LPS se muestran en la tabla 5 (a continuación). Se produjeron NOE a partir de sobrenadante de cultivos bacterianos tras crecimiento hasta fase estacionaria en medios LB mediante esterilización por filtración. Como conservante, se añadió azida de sodio al 0,05%. Se disolvió LPS liofilizado en agua libre de endotoxinas. Las disoluciones de LPS para las que el proveedor en las tablas 5-7 viene indicado como "LMU" fueron cortesía del Dr. A. Wieser de la Universidad de Múnich Ludwig-Maximilian. Se determinó el contenido en endotoxinas de las disoluciones madre usando el kit EndoZyme® (Hyglos GmbH) y se produjeron disoluciones madre de aprox. 5000 UE/ml de LPS en agua libre de endotoxinas. A partir de estas disoluciones, se añadieron 10 µl a muestras de enmascaramiento de 1 ml. Después de eso, se permitió que las muestras enmascararan el LPS respectivo durante 7 días a temperatura ambiente.

Se realizó desenmascaramiento de endotoxinas mediante la adición de 100 µl de o bien una disolución madre de 1-dodecanol 100 mM, o adición de 100 µl de una disolución madre de BSA 100 mg/ml y 100 µl de 1-dodecanol 100 mM o mediante la adición de 100 µl de cada uno de las disoluciones de CaCl₂ 1 M, BSA 100 mg/ml, SDS al 1% y 1-dodecanol 100 mM. Se realizaron desenmascaramiento y determinación de contenido en endotoxinas tal como se describió en los ejemplos 1-5.

Resultados

Las tablas 5-7 (a continuación) muestran el porcentaje de recuperación de LPS tras el enmascaramiento y tras el desenmascaramiento de LPS a partir de diferentes fuentes y tipos de diferentes sistemas de enmascaramiento de detergente. Específicamente, la tabla 5 muestra los resultados obtenidos para un sistema de enmascaramiento de Tween 20/citrato; la tabla 6 muestra los resultados obtenidos para un sistema de enmascaramiento de Tween 80/citrato; y la tabla 7 muestra los resultados obtenidos para un sistema de enmascaramiento de Triton X-100/citrato.

Tabla 5

Sistema de enmascaramiento de Tween 20/citrato	proveedor	Control de enmascaramiento (% de recuperación)	Dodecanol (% de recuperación)	BSA/dodecanol (% de recuperación)	CaCl ₂ /BSA/SDS/dodecanol (% de recuperación)
<i>Klebsiella pneumonia</i>	LMU	0,0	66	128	212
<i>Morganella morganii</i>	LMU	0,0	81	110	120
<i>Yersinia enterocolitica</i>	LMU	0,0	63	174	243
<i>Serratia marcescens</i>	LMU	0,0	128	168	182
<i>Neisseria meningitis</i>	LMU	0,0	9	23	38
<i>Acinetobacter baumannii</i> *	LMU	0,0	0	124	655
<i>Enterobacter cloacae</i> (NOE) *	Hyglos	0,0	55	156	187
<i>Salmonella enterica</i>	Sigma	0,0	42	63	76
<i>E.coli</i> K 12	Invivogen	3,0	78	80	137
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> *	Sigma	0,0	14	5	179

* Cepas que son contaminantes comunes del agua, y por tanto, más probables de estar presentes en procedimientos para la producción de composiciones farmacéuticas

5

Tabla 6

Sistema de enmascaramiento de Tween 80/citrato	proveedor	Control de enmascaramiento (% de recuperación)	Dodecanol (% de recuperación)	BSA/dodecanol (% de recuperación)	CaCl ₂ /BSA/SDS/dodecanol (% de recuperación)
<i>Klebsiella pneumonia</i>	LMU	0,0	12	173	353
<i>Morganella morganii</i>	LMU	15,0	15	39	99
<i>Yersinia enterocolitica</i>	LMU	7,0	22	168	309
<i>Serratia marcescens</i>	LMU	0,0	105	199	326
<i>Neisseria meningitis</i>	LMU	0,0	0	11	42
<i>Acinetobacter baumannii</i> *	LMU	0,0	7	337	511
<i>Enterobacter cloacae</i> (NOE) *	Hyglos	24,2	27	74	183
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> *	Sigma	1,0	1	1	90
<i>Salmonella enterica</i>	Sigma	0,0	18	10	69
<i>E.coli</i> K 12	Invivogen	1,9	85	106	176

* Cepas que son contaminantes comunes del agua, y por tanto, más probables de estar presentes en procedimientos para la producción de composiciones farmacéuticas

Tabla 7

Triton X-100/sistema de enmascaramiento de citrato	proveedor	Control de enmascaramiento (% de recuperación)	Dodecanol (% de recuperación)	BSA/dodecanol (% de recuperación)	CaCl ₂ /BSA/dodecanol (% de recuperación)
<i>Klebsiella pneumonia</i>	LMU	9,8	22	12	162
<i>Morganella morganii</i>	LMU	5,5	35	23	48
<i>Yersinia enterocolitica</i>	LMU	0,0	13	19	236
<i>Serratia marcescens</i>	LMU	3,5	28	20	80
<i>Neisseria meningitis</i>	LMU	0,0	55	14	161
<i>Acinetobacter baumannii</i> *	LMU	7,8	0	57	918
<i>Enterobacter cloacae</i> (NOE) *	Hyglos	0,0	2	26	85
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> *	Sigma	0,0	1	11	25

<i>Salmonella enterica</i>	Sigma	0,0	21	12	234
----------------------------	-------	-----	----	----	-----

* Cepas que son contaminantes comunes del agua y por tanto, más probables de estar presentes en procedimientos para la producción de composiciones farmacéuticas

5 Los datos anteriores muestran claramente que la capacidad de desenmascarar ventajosamente endotoxinas a partir de diversos sistemas de enmascaramiento es independiente de la fuente y tipo de LPS usado. Estos resultados son importantes porque muestran que los métodos de desenmascaramiento de la presente invención representan una enseñanza general aplicable a diversos tipos de endotoxinas a partir de diversas fuentes, con una variedad de condiciones de enmascaramiento.

Ejemplo 7: Desenmascaramiento de endotoxinas a partir de sistemas de enmascaramiento de proteínas

10 Los experimentos anteriores han investigado el desenmascaramiento de LPS a partir de sistemas de enmascaramiento de detergente. Sin embargo, tal como se describe anteriormente en el presente documento, los detergentes no son las únicas sustancias que enmascaran endotoxinas a partir de detección. Las proteínas (por ejemplo, API de proteínas) también pueden enmascarar endotoxinas a partir de detección cuando contienen sitios de unión sobre o dentro de su estructura en la que puede unirse la endotoxina, evadiendo así la detección. Los
15 presentes experimentos por tanto, se refieren al enmascaramiento de endotoxinas (LPS) mediante una proteína en vez de un detergente. Se usó lisozima como proteína de enmascaramiento en estos experimentos por su capacidad de unirse a endotoxinas es conocida (véase, por ejemplo, Ohno & Morrison (1999). J. Biol. Chemistry 264(8), 4434-4441).

Materiales y métodos

20 Se realizó enmascaramiento de endotoxinas tal como sigue: se incubaron 50 UE/ml de LPS (*E. coli* 055:B5) durante siete días en tampón citrato 10 mM, pH 7,5 que contenía lisozima de clara de huevo de gallina 1 mg/ml (Sigma Aldrich) a temperatura ambiente.

25 Se realizó enmascaramiento de endotoxinas tal como sigue: Se realizó desenmascaramiento mediante la adición de reactivos de desenmascaramiento (moduladores tal como se describió en los ejemplos previos y agentes que influyen en la estabilidad de los enlaces de hidrógeno) en diversas combinaciones. Específicamente, se añadieron 100 µl de los siguientes agentes de desenmascaramiento a alícuotas de 1 ml de las muestras enmascaradas: 1-dodecanol, CaCl₂, BSA, SDS. Se disolvieron todas las disoluciones madre en agua excepto 1-dodecanol, que se disolvió en etanol al 100%. Las concentraciones añadidas de las disoluciones madre fueron CaCl₂ 1 M 100 mM, BSA 100 mg/ml y SDS al 1%, respectivamente. Se realizó desenmascaramiento mediante adición secuencial de los
30 diversos componentes con una etapa de agitación con vórtex de dos minutos tras cada adición. Entonces se incubaron las muestras durante 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se diluyeron 1:10 y 1:100 en agua libre de endotoxinas para análisis usando el kit EndoLisa® (Hyglos GmbH).

Resultados

35 La tabla 8 (a continuación) muestra la eficacia de desenmascaramiento de un enmascarador de proteína (lisozima) como dependiente de los componentes añadidos.

Tabla 8

CaCl ₂	BSA	SDS	1-dodecanol	% recuperación de LPS
-	-	-	-	0
+	-	-	-	0
+	+	-	-	4
+	+	+	-	33
+	+	+	+	115
+	+	-	+	15
+	-	+	+	0
+	-	+	-	4
+	-	-	+	2
-	+	-	-	9
-	+	+	-	0
-	+	+	+	1
-	+	-	+	6
-	-	+	-	0
-	-	+	+	0
-	-	-	+	1

En el caso de enmascaramiento mediante lisozima, el uso de 1-dodecanol (modulador de reconfiguración) solo o

junto con un detergente de apoyo (modulador de desplazamiento) como componente adicional del sistema de modulador no desenmascara eficazmente. En este caso, el complejo de enmascaramiento de lisozima-LPS parece ser más estable debido a interacciones electrostáticas entre el LPS cargado negativamente y la lisozima cargada positivamente. Puede lograrse mejora de desenmascaramiento mediante la adición de sal, que altera la interacción electrostática, volviendo así el complejo de lisozima-LPS más lábil y aumentando su susceptibilidad a alteración con modulador. Para este fin, pueden lograrse buenos resultados usando un sistema de modulador de múltiples componentes de BSA (modulador de adsorción), SDS (modulador de desplazamiento) y 1-dodecanol (modulador de reconfiguración), junto con CaCl₂ para reducir la estabilidad del complejo de lisozima-LPS inicial. La combinación de estos componentes puede romper el complejo de enmascaramiento y conducir a estructuras de LPS detectables. Este modelo puede tomarse como modelo general de las medidas que pueden usarse para desenmascarar endotoxina cuando se enmascara, como totalidad o en parte, por una proteína, por ejemplo un API de proteína en una composición farmacéutica.

Ejemplo 8: Sustancias distintas de alcoholes 1-alquílicos como moduladores para desenmascarar

Tal como se describió anteriormente en el presente documento, se ha encontrado que los alcoholes 1-alquílicos (usados como moduladores de reconfiguración) promueven la formación de estructuras detectables de LPS. Por tanto, fue deseable investigar si otros tipos de sustancias distintas de alcoholes 1-alquílicos podrían tener también la capacidad de promover de manera similar formas detectables de LPS. Este ejemplo muestra los resultados de una selección de sustancias distintas de alcoholes 1-alquílicos que podrían apoyar la formación de estructuras detectables de LPS.

Materiales y métodos

Se enmascaró LPS (*E. coli* 055:B5, Sigma) 100 UE/ml en polisorbato 20/citrato durante 24 horas a temperatura ambiente. Se inició el desenmascaramiento mediante la adición secuencial de 1 parte de disoluciones madre de CaCl₂ (a 1 M), BSA (a 100 mg/ml), SDS (al 1%) y sustancia X en 10 partes de una disolución de LPS enmascarado, en la que "sustancia X" representó la sustancia distinta de alcohol 1-alquílico, la capacidad de del cual como modulador de reconfiguración se iba a someter a prueba. Se valoró la sustancia X en diferentes concentraciones. Tras el desenmascaramiento, se diluyeron muestras 1:10 y 1:100 en agua libre de endotoxinas y se analizaron para determinar endotoxinas detectables usando el kit EndoLISA® (Hyglos GmbH).

Resultados

La tabla 9 (a continuación) muestra las recuperaciones máximas de LPS tras el desenmascaramiento como dependientes de la sustancia usada como modulador. Además, se muestran concentraciones adecuadas de disoluciones madre de las respectivas sustancias para desenmascarar.

Tabla 9

Sustancias	% de recuperación de LPS	Concentración de disolución madre óptima de sustancia X
octilsulfato de sodio	20	30 mM
ácido 1-decanoico	57	100 mM

Tal como puede observarse a partir de lo anterior, los alcoholes 1-alquílicos no son la única clase de compuestos que pueden actuar como modulador de reconfiguración para promover la formación de una forma detectable de LPS. Otras sustancias que contienen estados de oxidación superiores de oxígeno (por ejemplo, como en ácido 1-decanoico) así como otros heteroátomos distintos de oxígeno (por ejemplo, como en octilsulfato de sodio (SOS)) también pueden permitir un desenmascaramiento de moderado a bueno.

Los resultados indican que las sustancias que son similares en su estructura a los alcoholes 1-alquílicos también pueden apoyar el desenmascaramiento hasta cierto punto. Parece que los derivados OH de alcanos, preferiblemente alcanos C₈-C₁₆, preferiblemente alcanos C₈-C₁₂, preferiblemente los alcanos C₁₂ actúan mejor para volver LPS susceptible a detección mediante ensayos basados en factor C.

Ejemplo 9: Desenmascaramiento usando albúminas de diferentes fuentes y 1-dodecanol

Como parte de la verificación de la mejora de desenmascaramiento mediante la adición de albúmina sérica bovina (BSA) en muestras enmascaradas que contenían polisorbato 80, se sometieron a prueba albúminas de diferentes fuentes.

Materiales y métodos

Se desenmascararon muestras enmascaradas (1 ml) que contenían 50 UE/ml de LPS (O55:B5) en tampón de polisorbato 80/citrato mediante la adición de 100 µl de disoluciones madre con diferentes concentraciones de albúminas (albúmina sérica bovina (BSA), muy baja endotoxina, Serva GmbH; albúmina sérica humana (HSA, producida de manera recombinante en *Pichia pastoris* (Sigma Aldrich); y ovoalbúmina (Ova), ovoalbúmina

EndoGrade, Hyglos GmbH) y posterior adición de 100 µl de una disolución madre de 1-dodecanol 100 mM). Concentraciones de disoluciones madre de albúmina fueron de 100, 33, 10, 3,3 y 1 mg/ml. Debido a la menor solubilidad de ovoalbúmina en agua, no se preparó una disolución de ovoalbúmina 100 mg/ml.

- 5 Se calcularon recuperaciones de LPS tras la determinación de contenido detectable de LPS usando el kit EndoLisa® (Hyglos GmbH). Para mediciones de EndoLISA® las muestras desenmascaradas se diluyeron 1:10 y 1:100 en agua libre de endotoxinas y se midieron posteriormente según las instrucciones del kit.

Resultados

La tabla 10 (a continuación) muestra la eficacia de desenmascaramiento de un sistema de enmascaramiento de polisorbato 80/citrato, como dependiente de albúminas de diferentes fuentes.

10

Tabla 10

proteína	[disolución madre] (mg/ml)	% de recuperación de LPS
BSA	100	66,0
	33	46,2
	10	38,1
	3,3	28,2
	1	30,9
HSA	100	42,3
	33	94,5
	10	151,6
	3,3	40,4
	1	34,3
ovoalbúmina	--	nd
	33	79,4
	10	59,0
	3,3	33,0
	1	19,6

nd = sin datos

- 15 Los datos muestran que todas las albúminas sometidas a prueba pueden apoyar el desenmascaramiento a partir de un sistema de enmascaramiento de polisorbato 80. Las concentraciones finales adecuadas en las muestras desenmascaradas son 10 mg/ml para BSA, 1 mg/ml para HSA y 3,3 mg/ml para ovoalbúmina. Las diferencias en las concentraciones óptimas pueden ser el resultado de diferentes afinidades de las albúminas con el detergente en la muestra enmascarada.

Ejemplo 10: El efecto de diversas sales caotrópicas en la eficacia de desenmascaramiento

- 20 El desenmascaramiento que usa la combinación de sustancias CaCl₂ (agente que influye en los enlaces de hidrógeno), BSA (modulador de adsorción), SDS (modulador de desplazamiento) y 1-dodecanol (modulador de reconfiguración) (toda esta combinación se denomina "CBSD") se ha demostrado anteriormente que desenmascara eficazmente LPS cuando está enmascarado por, por ejemplo, Triton X-100. Los presentes experimentos investigan el efecto de la naturaleza de la sal caotrópica (agente que influye en la estabilidad de los enlaces de hidrógeno) en la eficacia de desenmascaramiento. Para este fin, los siguientes experimentos emplean sales de propiedades caotrópicas crecientes: Na⁺, Mg²⁺ y Ca²⁺, presentadas en cada caso como la sal de cloruro correspondiente.

Materiales y métodos

- 30 Se realizó enmascaramiento de endotoxinas tal como sigue: se enmascararon 50 UE/ml de *E. coli* LPS 055:B5 permitiendo que se incubara durante 3 días a temperatura ambiente en una disolución de tampón citrato 10 mM (pH 7,5) que contenían Triton X-100 al 0,05%. En este caso, Triton X-100 actuó como enmascarador de detergente.
- 35 Se realizó desenmascaramiento de endotoxinas tal como sigue: se añadieron 300, 100, 30, 10, 3 y 1 µl de o bien una disolución madre de cloruro de sodio 5 M (NaCl), cloruro de magnesio 1 M (MgCl₂) o cloruro de calcio 1 M (CaCl₂) a alícuotas de 1 ml de las muestras enmascaradas y se mezclaron. Posteriormente, se añadieron 100 µl de los demás componentes de modulador (BSA (modulador de adsorción), SDS (modulador de alteración y desplazamiento) y 1-dodecanol (modulador de reconfiguración)) tal como se describió en los ejemplos 1-5.

Resultados

La tabla 11 (a continuación) muestra el porcentaje de recuperación de endotoxinas como dependiente de cada sal

caotrópica y la concentración final más adecuada de cada sal en la muestra desenmascarada.

Tabla 11

sal	% de recuperación de LPS	Concentración (mM)
NaCl	96,7	357
MgCl ₂	139,8	188
CaCl ₂	142,5	72

5 Los datos muestran que todas las sales sometidas a prueba pudieron apoyar el desenmascaramiento eficaz de LPS a partir del detergente de enmascaramiento Triton X-100 en combinación con un sistema de modulador de múltiples componentes que incluye BSA (como modulador de adsorción), SDS (en este caso, como modulador de alteración) y 1-dodecanol (como modulador de alteración y reconfiguración). Además, tal como se describe anteriormente en el presente documento, la cantidad de la sal requerida para lograr un grado comparable de eficacia de desenmascaramiento disminuyó con propiedades caotrópicas crecientes. Estos resultados permiten que se obtengan varias conclusiones generales. En primer lugar, cuando se usa una sal para desestabilizar un complejo enmascarado entre endotoxina y enmascarador de endotoxinas, el carácter caotrópico de esta sal es un factor importante para lograr un desenmascaramiento eficaz. En segundo lugar, la cantidad de sal requerida para lograr un desenmascaramiento eficaz variará generalmente a la inversa con la concentración caotrópica de la sal empleada.

Ejemplo 11: Desenmascaramiento de endotoxinas a partir de muestras que contienen detergente y tampones fosfato

15 La mayoría de formulaciones de fármacos que contienen una proteína (por ejemplo, anticuerpo) como principio activo farmacéutico (API) contienen o bien detergentes no iónicos como polisorbato 20 ó 80 tamponados juntos en o bien citrato o bien fosfato. En tales formulaciones, la concentración de detergente está habitualmente por encima de la respectiva concentración micelar crítica del detergente (CMC). Además, los valores de pH de tales formulaciones se ajustan a menudo con el fin de garantizar la estabilidad óptima del API.

20 Teniendo en cuenta lo anterior, las investigaciones expuestas en este ejemplo pretendieron investigar la influencia del valor de pH en la eficacia de desenmascaramiento. Con el fin de aproximar las condiciones que prevalecen en formulaciones farmacéuticas que contienen un API de proteína lo más estrechamente posible, se usaron los detergentes polisorbato 20 y polisorbato 80 como enmascaradores de endotoxinas, y las disoluciones se tamponaron con fosfato. En vista de los resultados descritos en el presente documento anteriormente, se realizó desenmascaramiento usando una combinación de CaCl₂ (sal caotrópica como agente que influye en la estabilidad de los enlaces de hidrógeno), BSA (modulador de adsorción), SDS (en este caso, como modulador de alteración) y 1-dodecanol (modulador de alteración y reconfiguración). Como Ca²⁺ y PO₄³⁻ forman complejos de calcio-fosfato insolubles, se estabilizó la disolución de cloruro de calcio mediante la adición de un exceso molar de 2 veces de citrato, pH 7,5.

30 Materiales y métodos

Se realizó enmascaramiento de endotoxinas tal como sigue: A muestras de 1 ml, conteniendo cada una 10 mM de tampones fosfato de diversos valores de pH y o bien polisorbato 20 o bien polisorbato 80 al 0,05%, se le añadieron 100 UE/ml de *E. coli* LPS 055:B5. Se permitió que el enmascaramiento procediera incubando estas disoluciones durante 7 días a temperatura ambiente. Se prepararon, se incubaron y se midieron muestras de control que contenían LPS de tampones fosfatos que carecían de detergente en paralelo con las muestras de enmascaramiento.

Se realizó desenmascaramiento de endotoxinas tal como sigue: Se añadió una combinación de CaCl₂, BSA, SDS y 1-dodecanol a cada una de las muestras tal como se describió en los ejemplos previos. Para evitar la precipitación de fosfato de calcio y ajustar el pH de las muestras, se añadió un exceso molar de 2 veces de tampón citrato pH 7,5 a cada muestra antes de la adición de los componentes de desenmascaramiento.

40 Se determinó el contenido en endotoxinas de las muestras enmascaradas usando el kit EndoZyme® de Hyglos GmbH a tiempo cero, y tras 7 días. Se analizó el contenido en endotoxinas de las muestras desenmascaradas usando el kit EndoLisa® de Hyglos GmbH. Se calculó el porcentaje de recuperación de LPS tras 7 días de enmascaramiento y tras desenmascaramiento en referencia a las muestras de control a tiempo cero.

Resultados

45 La tabla 12 (a continuación) y las figuras 10 y 11 muestran el porcentaje de recuperación de LPS tras 7 días de enmascaramiento como dependiente del valor de pH y el porcentaje de recuperación de LPS tras desenmascaramiento de las muestras enmascaradas.

Tabla 12

tampón fosfato (valor)	Enmascarador de polisorbato 20		Enmascarador de polisorbato 80	
	recuperación tras enmascaramiento	recuperación tras desenmascaramiento	recuperación tras enmascaramiento	recuperación tras desenmascaramiento

de pH)	[%]	[%]	[%]	[%]
1,6	81	143	104	188
2,8	146	150	179	189
4,0	156	305	130	206
5,8	4	158	27	237
7,0	1	160	0	221
8,9	0	156	0	187
12,1	3	192	1	128

Los datos muestran que el enmascaramiento en disoluciones de tampones fosfato que contienen detergente dependen fuertemente del pH. A valores de pH por debajo de 4, no se produce enmascaramiento tras una semana de incubación de muestra. A valores de pH por encima de 4, puede observarse un fuerte efecto de enmascaramiento, que da como resultado recuperaciones detectables de LPS menores del 1%.

Los datos muestran también de manera concluyente que el enfoque de desenmascaramiento implementado vuelve el LPS indetectable previamente enmascarado, detectable. Independientemente del valor de pH y el grado de enmascaramiento, puede recuperarse, es decir, detectar el 100% o más de LPS.

Ejemplo 12: Desenmascaramiento usando otros moduladores de desplazamiento distintos de SDS

Tal como se muestra anteriormente en los ejemplos, una combinación de endotoxina desenmascarada eficazmente CaCl_2 /BSA SDS/1-dodecanol que está enmascarada por detergente Triton X-100. Varios de los experimentos descritos anteriormente sugieren la importancia de incluir SDS en este esquema para lograr un desenmascaramiento eficaz. El objetivo de los experimentos descritos en el presente ejemplo es investigar si el componente de modulador SDS (en este caso, como modulador de alteración) puede intercambiarse por otro detergente sin repercutir negativamente en el efecto de desenmascaramiento observado usando SDS.

Materiales y métodos

Se realizó enmascaramiento de endotoxinas tal como sigue: se prepararon alícuotas de 1 ml de citrato 10 mM pH 7,5 que contenían Triton X-100 al 0,05% en tubos de ensayo de vidrio libres de endotoxinas. Posteriormente, se añadieron 10 μl de una disolución madre de 10.000 UE/ml de LPS (LPS 055 B5, Sigma L2637-5MG), se agitaron con vórtex durante 1 min y se almacenaron a temperatura ambiente durante al menos 24 horas. Se preparó un control de LPS positivo en agua tal como sigue: se añadieron 10 μl de una disolución madre de LPS 10.000 UE/ml a 1 ml de agua libre de endotoxinas, se mezcló y se incubó de manera idéntica a las preparaciones de enmascaramiento. Se indican detalles adicionales con respecto al control positivo de LPS-agua en el ejemplo 1.

Se realizó desenmascaramiento de endotoxinas tal como sigue: A disoluciones enmascaradas de LPS, preparadas tal como se indicó anteriormente, se les añadieron CaCl_2 , BSA, detergente X y 1-dodecanol tal como se describió en los ejemplos previos, en los que se varió la identidad y concentración de "detergente X" (modulador de alteración). Se sometieron a prueba los siguientes detergentes: sal de dioctilsulfosuccinato de sodio (AOT), dodecibencenosulfonato de sodio (SDBS), sal de potasio de 4-nonilfenil-3-sulfopropil éter de polietilenglicol (PENS) e hidrato de ácido p-xileno-2-sulfónico (XSA). Se realizó desenmascaramiento tal como se describió en los ejemplos anteriores, se determinó el contenido en endotoxinas usando el kit EndoLisa® de Hyglos GmbH, y se calculó el porcentaje de recuperación de LPS con referencia al control positivo de LPS-agua. Se describen detalles adicionales respecto al control positivo de LPS-agua en el ejemplo 1 anterior.

Resultados

La tabla 13 muestra el porcentaje de recuperación de LPS tras desenmascaramiento usando detergentes distintos que el SDS en el enfoque de desenmascaramiento de CaCl_2 /BSA/[detergente X]/1-dodecanol.

Tabla 13

Detergente	Concentración óptima	Recuperación de LPS [%]
AOT	0,01%	24
SDBS	0,01%	34
PENS	0,10%	23
XSA	0,05%	26

Los datos muestran que otros detergentes además de SDS pueden apoyar el desenmascaramiento como modulador de alteración en un enfoque de desenmascaramiento de CaCl_2 /BSA/[detergente X]/1-dodecanol. Además, en ausencia de 1-dodecanol, ningún detergente, podía desenmascarar LPS a partir de Triton X-100. Tal como se mencionó anteriormente, esto sugiere que 1-dodecanol puede tener un papel importante (al menos) como modulador de reconfiguración que puede ser crucial para mediar en la transición de endotoxina desde un estado solubilizado (indetectable) hasta uno agregado (detectable).

Ejemplo 13: Desenmascaramiento a partir de composiciones de anticuerpo tamponadas como dependiente del detergente de enmascaramiento

Las formulaciones más comúnmente usadas de productos farmacológicos a base de proteínas contienen tampones fosfato y detergentes no iónicos tales como polisorbato 20 o polisorbato 80. Además, los anticuerpos constituyen uno de los productos proteicos farmacéuticos más frecuentemente formulados. Teniendo esto en cuenta, se pretendió confirmar si los enfoques anteriores de desenmascaramiento para sistemas de enmascaramiento de detergentes o proteínas son adecuados para desenmascarar endotoxinas en sistemas que contienen tanto detergentes como proteínas, donde la proteína es un anticuerpo tamponado en fosfato. Se eligieron polisorbato 20 y 80 como detergentes de enmascaramiento en estos experimentos porque estos dos detergentes son los detergentes más comúnmente usado en formulaciones de fármaco proteicas.

Materiales y métodos

Se realizó enmascaramiento de endotoxinas tal como sigue: se añadieron 50 UE/ml de endotoxina (*E. coli* 055:B5; Sigma L2637-5MG) a alícuotas de 1 ml de una disolución de anticuerpos que contenía 10 mg/ml de una preparación de anticuerpo bovino de IgG policlonal, disuelto en fosfato de sodio 10 mM pH 7,5 y NaCl 50 mM. Posteriormente, se añadieron o bien polisorbato 20 o bien polisorbato 80 a una concentración final del 0,05%, y se incubaron las disoluciones durante 3 días a temperatura ambiente para permitir que se produjera enmascaramiento. Además, se prepararon y se trataron controles que contenían la disolución tampón sin detergente o anticuerpo, así como la disolución tampón que contenía o bien el anticuerpo o bien el polisorbato respectivo como las muestras de enmascaramiento. Cada uno de los controles contenía la misma cantidad de LPS.

Se realizó desenmascaramiento tal como sigue: se realizó desenmascaramiento mediante la adición de o bien 1-dodecanol o BSA/1-dodecanol o bien CaCl₂/BSA/SDS/1-dodecanol. Se añadieron 100 µl de las siguientes disoluciones madre a 1 ml de disolución de muestra: CaCl₂ (1 M), BSA (100 mg/ml), SDS (1%) y 1-dodecanol (100, 10 ó 1 mM). Además, antes de la adición de cloruro de calcio a una muestra, se estabilizó la muestra frente a la precipitación de fosfato de calcio mediante la adición de una concentración final de citrato de sodio 200 mM pH 7,5. Se añadieron secuencialmente todas las disoluciones madre con etapas de mezclado de dos minutos tras cada adición. Tras la adición y el mezclado de del último componente, se incubaron las muestras durante al menos 30 minutos a temperatura ambiente. Después de eso, se diluyeron las muestras 1:10 y 1:100 en agua libre de endotoxinas y se analizaron para determinar el contenido en endotoxinas usando el kit EndoLisa (Hyglos GmbH). Se calculó el porcentaje de recuperación de LPS con referencia al contenido en endotoxinas determinado en el control de tampón (comentado en más detalle en el ejemplo 1).

Resultados

La tabla 14a (a continuación) muestra el porcentaje de recuperación de LPS del control de agua, el tampón sin detergente, el tampón que contiene anticuerpo o detergente y el tampón que contiene anticuerpo y detergente tras 3 días de incubación a temperatura ambiente.

Tabla 14a

tipo de muestra	componentes	polisorbato 20 recuperación de LPS (%)	polisorbato 80 recuperación de LPS (%)
control de agua	agua	100	100
tampón	tampón sin detergente	102	99
control de enmascaramiento	tampón + anticuerpo	31	44
control de enmascaramiento	tampón + polisorbato	0	2
control de enmascaramiento	tampón + polisorbato + anticuerpo	0	9

La tabla 14b (a continuación) muestra el porcentaje de recuperación de LPS a partir de una disolución de anticuerpos tras desenmascaramiento que contiene o bien polisorbato 20 o bien polisorbato 80. Además, muestra las concentraciones de las disoluciones madre añadidas.

Tabla 14b

[CaCl ₂] (M)	[BSA] (mg/ml)	[SDS] (%)	[1-dodecanol] (mM)	polisorbato 20 recuperación de LPS (%)	polisorbato 80 recuperación de LPS (%)
-	-	-	100	16,6	9,1
-	-	-	10	19,9	6,8
-	-	-	1	0,0	5,0
-	100	-	100	40,8	11,2
-	100	-	10	2,6	6,3
-	100	-	1	1,6	11,5

1	100	1	100	4,8	3,0
1	100	1	10	15,9	23,1
1	100	1	1	67,3	90,8

Los datos muestran que las disoluciones tampón sin polisorbato 20 ó 80 no enmascaran el LPS añadido. Las disoluciones tampón que contienen anticuerpo pero no polisorbato enmascaran del ~ 55% al 70% del LPS, lo que sugiere que la proteína de anticuerpo contribuye a un efecto de enmascaramiento de por sí. Las recuperaciones de LPS a partir de disoluciones tampón que contienen polisorbato o polisorbato y anticuerpo están por debajo del 10% cuando no se toman medidas de desenmascaramiento. Por tanto, no sólo el detergente sino también el anticuerpo es responsable del enmascaramiento de LPS.

Las recuperaciones de LPS tras desenmascaramiento a partir de los complejos de enmascaramiento que contienen LPS, detergente y anticuerpo son bajas usando 1-dodecanol solo (el 9 y el 17% para polisorbato 80 y 20, respectivamente). Usar una combinación de BSA (modulador de adsorción) y 1-dodecanol (modulador de alteración y reconfiguración) permitió recuperaciones moderadas de LPS del 11 y el 41% para polisorbato 80 y 20, respectivamente. El desenmascaramiento usando una combinación de CaCl₂, BSA (modulador de adsorción), SDS (modulador de desplazamiento) y 1-dodecanol (modulador de alteración y reconfiguración), da como resultado recuperaciones del 67% y el 91% del LPS enmascarado para polisorbato 20 y 80, respectivamente. De manera interesante, se logró desenmascaramiento usando una disolución madre de 1-dodecanol con una concentración tan baja como de 1 mM. Además, al contrario que el desenmascaramiento a partir de sistemas de detergente que carecen de proteínas, usar 1-dodecanol (modulador de alteración y reconfiguración) o BSA (modulador de adsorción) y 1-dodecanol (modulador de alteración y reconfiguración) no enmascara con mayor eficacia del 50%. Tal como se mostró para la lisozima anteriormente, sólo se logró desenmascaramiento eficaz en presencia de CaCl₂, BSA, SDS y 1-dodecanol.

Ejemplo 14: Desenmascaramiento a partir de composiciones que contienen anticuerpo y polisorbato 20 como dependiente de la sustancia tampón

Se determinó en el ejemplo 14 anterior que los enfoques de desenmascaramiento de la invención descritos en el presente documento son adecuados para desenmascarar composiciones que contienen tanto detergente como proteína tamponada (anticuerpo). En vista de esto, se deseó entonces investigar la influencia del tampón en la eficacia de desenmascaramiento. Para este fin, se eligieron tampones citrato 10 mM o fosfato 10 mM de pH 7,5, porque son los tampones más comúnmente usados en formulaciones de fármaco proteicas.

Materiales y métodos

Se realizó enmascaramiento de endotoxinas tal como sigue: se añadieron 50 UE/ml de endotoxina (*E. coli* 055:B5; Sigma L2637-5MG) a alícuotas de 1 ml de una disolución de anticuerpos que contenía 10 mg/ml de una preparación de anticuerpo bovino de IgG policlonal, disuelta en o bien fosfato de sodio 10 mM que contenía cloruro de sodio 50 mM o bien citrato de sodio 10 mM pH 7,5 que contenía cloruro de sodio 150 mM. Posteriormente, se añadió polisorbato 20 a una concentración final del 0,05% y se enmascararon las muestras durante 3 días a temperatura ambiente. Además, se prepararon y se trataron controles positivos que contienen la disolución tampón sin detergente o anticuerpo, así como la disolución tampón que contiene o bien el anticuerpo o bien el polisorbato respectivo como las muestras de enmascaramiento. Cada uno de los controles positivos contenía la misma cantidad de LPS.

Se realizó enmascaramiento de endotoxinas tal como sigue: Se realizó desenmascaramiento mediante la adición de o bien 1-dodecanol o bien una combinación de BSA (modulador de adsorción) y 1-dodecanol (modulador de alteración y reconfiguración) o CaCl₂, BSA (modulador de adsorción), SDS (modulador de desplazamiento) y 1-dodecanol (modulador de alteración y reconfiguración). Se añadieron secuencialmente 100 µl de cada una de las siguientes disoluciones madre a 1 ml de disolución de muestra: CaCl₂ (1 M), BSA (10 mg/ml), SDS (1%) y 1-dodecanol (100, 10 ó 1 mM). Además, antes de la adición de cloruro de calcio a una muestra que contenía tampones fosfato, se estabilizó esta muestra frente a la precipitación de fosfato de calcio mediante la adición de una concentración final de citrato de sodio 200 mM pH 7,5. Se añadieron secuencialmente todas las disoluciones madre con etapas de mezclado de dos minutos tras cada adición. Tras la adición y el mezclado del último componente se incubaron las muestras durante al menos 30 minutos a temperatura ambiente. Después de eso, se diluyeron las muestras 1:10 y 1:100 en agua libre de endotoxinas y se analizaron para determinar el contenido en endotoxinas usando el kit EndoLisa (Hyglos GmbH). Se calculó el porcentaje de recuperación de LPS con referencia al contenido determinado en endotoxinas en el control positivo (comentado en más detalle en el ejemplo 1).

Resultados

La tabla 15 (a continuación) muestra el porcentaje de recuperación de LPS a partir de una disolución de anticuerpos tras enmascaramiento y desenmascaramiento que contiene o bien citrato o bien fosfato como sustancia tampón.

Tabla 15

tipo de muestra	componente	tampón citrato		tampón fosfato	
		recuperación de LPS (%)		recuperación de LPS (%)	
control de agua	agua	100		100	
control de enmascaramiento	tampón + anticuerpo	40		31	
control de enmascaramiento	tampón + polisorbato 20	0		0	
control de enmascaramiento	tampón + polisorbato 20 + anticuerpo	1		0	
tipo de muestra	enfoque de desenmascaramiento /componentes	recuperación de LPS (%)	[1-dodecanol] (mM)	recuperación de LPS (%)	[1-dodecanol] (mM)
muestra desenmascarada *	1-dodecanol	26	100	17	100
muestra desenmascarada *	BSA/1-dodecanol	49	100	41	100
muestra desenmascarada *	CaCl ₂ /BSA/SDS/1-dodecanol	87	100	67	1

* Las muestras “desenmascaradas” contenían anticuerpo.

5 Los datos muestran que las disoluciones tampón que contenían anticuerpo pero no polisorbato, enmascaran del 60% al 70% del LPS (basándose en la recuperación del 40% y aproximadamente el 30% de LPS para tampones citrato y fosfato, respectivamente). Las recuperaciones de LPS a partir de disoluciones tampón que contienen polisorbato o polisorbato y anticuerpo están por debajo del 1%. En estos casos, el enmascaramiento es independiente del tampón presente.

10 Las recuperaciones de LPS tras desenmascaramiento a partir de las composiciones que contienen LPS, detergente y anticuerpo son bajas usando 1-dodecanol solo (el 17% y el 26% para fosfato y citrato, respectivamente) y moderadas usando una combinación de BSA (modulador de adsorción) y 1-dodecanol (modulador de alteración y reconfiguración) (el 41% y el 49% para fosfato y citrato, respectivamente). El desenmascaramiento usando una combinación de CaCl₂, BSA (modulador de adsorción), SDS (modulador de desplazamiento y 1-dodecanol (modulador de alteración y reconfiguración) da como resultado recuperaciones del 67% y el 87% del LPS enmascarado para fosfato y citrato, respectivamente. De manera interesante, la concentración necesaria de disolución madre de 1-dodecanol para desenmascaramiento eficaz difiere en gran medida entre los sistemas de 15 disolución usados (100 mM para anticuerpo/detergente/citrato y 1 mM para anticuerpo/detergente/fosfato). Los datos muestran claramente que puede lograrse desenmascaramiento eficaz de endotoxina en composiciones que comprenden tanto proteína (anticuerpo) como detergente mediante el ajuste de la concentración de 1-dodecanol.

20 Ejemplo 15: Enmascaramiento y desenmascaramiento de una disolución de anticuerpos que contenía LPS a partir de una fuente desconocida

25 Para mostrar que no sólo es posible desenmascaramiento de disoluciones que contienen LPS a partir de una fuente conocida, se sometió a prueba un anticuerpo monoclonal de ratón disponible comercialmente para uso diagnóstico que contiene una contaminación de LPS, donde la fuente del LPS es desconocida. Además, se disolvió este anticuerpo en una composición tampón que corresponde a la formulación del producto farmacológico de anticuerpo conocido Rituximab (MabThera®, Rituxan®).

Materiales y métodos

30 Determinación de contaminación de endotoxina: se disolvió un anticuerpo monoclonal de ratón (MAB 33, Roche Diagnostics) en una disolución que contenía citrato y cloruro de sodio de pH 6,5 y se almacenó a 4°C. Las concentraciones finales de citrato, cloruro de sodio y anticuerpo fueron de 25 mM, 150 mM y 10 mg/ml, respectivamente. Directamente tras la solubilización del anticuerpo, se analizó el contenido en endotoxinas usando los kits de detección EndoZyme® y EndoLISA® (Hyglos GmbH). El contenido determinado en endotoxinas fue de 11 EU/mg de anticuerpo.

35 Se inició el enmascaramiento de LPS añadiendo polisorbato 80 hasta una concentración final del 0,07% y aumentando la temperatura hasta condiciones ambientales (22°C). Después de eso, se incubaron alícuotas de 1 ml de las muestras a temperatura ambiente durante 3 días para permitir que la endotoxina presente se enmascare.

Se realizó desenmascaramiento tal como sigue: Se realizó desenmascaramiento mediante la adición de o bien 1-

5 dodecanol (modulador de alteración y reconfiguración); o bien una combinación de BSA (modulador de adsorción) y 1-dodecanol (modulador de alteración y reconfiguración); o una combinación de CaCl₂, BSA (modulador de adsorción), SDS (modulador de desplazamiento) y 1-dodecanol (modulador de alteración y reconfiguración). Se añadieron secuencialmente 100 µl de cada una de las siguientes disoluciones madre a 1 ml de disolución de muestra: CaCl₂(1 M), BSA (10 mg/ml), SDS (1%) y 1-dodecanol (100, 10 ó 1 mM). Se añadieron secuencialmente todas las disoluciones madre con etapas de mezclado de dos minutos tras cada adición. Tras la adición y el mezclado del último componente se incubaron las muestras durante al menos 30 minutos a temperatura ambiente.

10 Después de eso, se diluyeron las muestras 1:10 y 1:100 en agua libre de endotoxinas y se analizaron para determinar el contenido en endotoxinas usando EndoLISA® (Hyglos GmbH). Se calculó el porcentaje de recuperación de LPS con referencia al contenido determinado en endotoxinas a tiempo cero.

Resultados

La tabla 16 (a continuación) muestra el porcentaje de recuperación de endotoxinas como dependiente del tiempo de enmascaramiento, la presencia o ausencia de polisorbato 80 y el desenmascaramiento de una disolución de anticuerpo/polisorbato 80.

15 Tabla 16

tipo de muestra	componentes	recuperación de LPS (%)	
control (0)	tampón + anticuerpo	100	
control de enmascaramiento (3 días)	tampón + anticuerpo	57	
control de enmascaramiento (3 días)	tampón + polisorbato 80	0	
control de enmascaramiento (3 días)	tampón + polisorbato 80 + anticuerpo	3	
tipo de muestra	enfoque de desenmascaramiento /componentes	recuperación de LPS (%)	[1-dodecanol] (mM)
muestra desenmascarada *	1-dodecanol	45	100
muestra desenmascarada *	BSA/1-dodecanol	68	100

* Las muestras “desenmascaradas” contenían anticuerpo.

20 Los datos muestran que la disolución tampón que contenía anticuerpo pero no polisorbato enmascara el 40% del LPS en el plazo de 3 días de incubación a temperatura ambiente. Sin embargo, la incubación en tampón que contiene o bien polisorbato 80 o bien anticuerpo y polisorbato 80, da como resultado recuperaciones de endotoxinas menores del 4%.

25 El desenmascaramiento a partir de las muestras anticuerpo/detergente da como resultado recuperaciones del 45% usando 1-dodecanol (modulador de alteración y reconfiguración); el 68% usando una combinación de BSA (modulador de adsorción) y 1-dodecanol (modulador de alteración y reconfiguración); y el 179% usando una combinación de CaCl₂, BSA (modulador de adsorción), SDS (modulador de desplazamiento) y 1-dodecanol (modulador de alteración y reconfiguración). En el último caso, se logra la mejor recuperación usando una disolución madre de 1-dodecanol 1 mM.

30 Los experimentos descritos en este ejemplo muestran que, cuando está presente, puede detectarse endotoxina que se produce de manera natural (NOE) mediante un sistema de detección de endotoxinas adecuado. Además, estos experimentos muestran que tal NOE puede enmascarse de la manera descrita en el presente documento anteriormente, es decir, el riesgo de enmascaramiento se aplica no sólo a endotoxina purificada, sino también a NOE. La capacidad de los métodos de la invención tal como se describe en el presente documento para desenmascarar tal NOE demuestran además su aplicabilidad a situaciones en las que se ha enmascarado NOE, demostrado su eficacia de los métodos de la invención para desenmascarar NOE enmascarada. Estos hallazgos son relevantes para las condiciones que prevalecen en la industria, donde los procedimientos de producción a menudo empiezan con una proteína expresada en presencia de NOE, y la última se enmascara mediante incorporación de detergente para impedir la agregación no deseada de proteínas. En general, entonces, los resultados de los experimentos descritos en este ejemplo demuestran que los métodos de la invención pueden desenmascarar endotoxinas en condiciones de relevancia para la industria farmacéutica.

40 Estos datos también muestran claramente que el desenmascaramiento es independiente de la fuente y la pureza del LPS.

En los tres casos de enmascaramiento en disoluciones de anticuerpo (ejemplos 13, 14 y 15), puede observarse que

5 el enmascaramiento no se debe sólo al componente de detergente en la composición sino también en cierto punto al anticuerpo en sí. El enfoque de desenmascaramiento más eficaz es usar una combinación de CaCl₂, BSA (modulador de adsorción), SDS (modulador de desplazamiento) y 1-dodecanol (modulador de alteración y reconfiguración) para desenmascarar la endotoxina. En este caso, pueden observarse analogías con el caso de la lisozima (comentado en el ejemplo 7 anteriormente), en el que la proteína en sí tiene un papel como enmascarador de endotoxinas. De manera interesante, en todos los casos, la concentración de 1-dodecanol debe optimizarse para un desenmascaramiento eficaz.

Ejemplo 16: Evaluación general del enfoque de desenmascaramiento tal como se aplica a una nueva composición en cuestión

10 Tal como se muestra en los ejemplos anteriores, la elección del enfoque tomado para desenmascarar endotoxinas que se sospecha que están presentes, pero enmascaradas en una composición dependerá de varios factores. Por ejemplo, tal como han mostrado los ejemplos precedentes, a veces es posible lograr un desenmascaramiento eficaz usando un modulador de un único componente que sirve como modulador de alteración y modulador de reconfiguración, tal como se define anteriormente en el presente documento. Por otra parte, en algunos casos, el
15 modulador debe ser un sistema de modulador con dos o más componentes, por ejemplo, un modulador de desplazamiento y/o un modulador de adsorción, según qué medidas son necesarias para desestabilizar y alterar el complejo de endotoxina/enmascarador de endotoxinas de manera suficiente para que la endotoxina se libere y puede medirse en una forma agregada que puede detectarse.

20 Los ejemplos anteriores empiezan desde condiciones de disolución controladas y conocidas con el fin de ilustrar los conceptos subyacentes de la presente invención. Sin embargo, en un caso real en el que los métodos de la invención van a aplicarse a una nueva composición en cuestión, es necesario en primer lugar evaluar el enfoque de los métodos de la invención antes de que puedan obtenerse resultados significativos. El presente ejemplo aborda tal validación, estableciendo un esquema genérico mediante el cual pueden calibrarse los métodos de la invención para una nueva composición en cuestión. Para este fin, es necesario un enfoque de desenmascaramiento iterativo,
25 empezando con una selección inicial del enfoque de desenmascaramiento más adecuado seguido por etapas de mejora posteriores para el ajuste de las concentraciones de componentes de desenmascaramiento óptimas.

Descripción general de un procedimiento de evaluación para una composición dada

En general, la figura 12 muestra un esquema que establece de manera esquemática las etapas que se tomarían normalmente para la evaluación de los métodos de la invención para una nueva composición desconocida.

30 Tal como resultará evidente a partir de lo anterior, la detección definitiva de endotoxina inicialmente enmascarada depende de la capacidad para convertir esta endotoxina desde forma unida de manera estable (enmascarada) hasta una forma agregada de la que se desenmascara y, por tanto, es detectable. El componente del modulador responsable de esta conversión final es el modulador de reconfiguración. La primera etapa de la figura 12 refleja esto, en que especifica una primera etapa de determinación de una concentración óptima de modulador de reconfiguración (por ejemplo, 1-dodecanol). Entonces, la etapa 2 optimiza la concentración de modulador de
35 adsorción, si se incluye este modulador. Entonces, la etapa 3 optimiza la concentración de modulador de desplazamiento, si se incluye este modulador.

40 Debe enfatizarse que no siempre serán necesarias las tres etapas. Si ya se observa que una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, en cuestión contiene cantidades significativas de endotoxina tras la etapa uno, entonces esta respuesta puede ser ya suficiente para concluir que la composición que se pensaba que estaba libre de endotoxinas, no lo estaba realmente.

Descripción específica del procedimiento de evaluación para una composición dada

45 La figura 13 muestra las combinaciones y concentraciones de disoluciones madre para seleccionar y optimizar el procedimiento de desenmascaramiento. Los enfoques de desenmascaramiento se dividen en diferentes casos posibles A, B y C, según qué sustancia o combinación de sustancias se usa en el desenmascaramiento. El enfoque de desenmascaramiento A describe un enfoque de desenmascaramiento en el que sólo se usa 1-dodecanol como modulador. El enfoque de desenmascaramiento B describe un enfoque de desenmascaramiento en el que el sistema de modulador está compuesto por 1-dodecanol y BSA. El enfoque de desenmascaramiento C describe un enfoque de desenmascaramiento en el que el sistema de modulador está compuesto por 1-dodecanol, BSA y SDS,
50 y se realiza en presencia de CaCl₂.

Procedimiento

55 Añadir 100 µl de las disoluciones madre de componente de desenmascaramiento a 1 ml de muestra enmascarada. Tras la adición de un componente, mezclar la muestra concienzudamente agitando con vórtex durante 2 minutos. Entonces, añadir el siguiente componente y mezclar. Tras la adición de todos los componentes y posterior mezclado, incubar las muestras durante > 30 minutos a temperatura ambiente. Después de eso, analizar las muestras para determinar el contenido en endotoxinas usando un método de prueba de endotoxinas adecuado, por ejemplo el kit EndoLisa® de Hyglos GmbH.

Ejemplo 17: Detección de endotoxina desenmascarada usando un ensayo de factor C recombinante

Este experimento investiga el efecto de desenmascaramiento de endotoxina usando un modulador de múltiples componentes que comprende CaCl₂, BSA, SDS y dodecanol. Se determinó el contenido en endotoxinas de las muestras enmascaradas y desenmascaradas usando el kit EndoZyme® de Hyglos GmbH. Se realizó el experimento con el fin de mostrar que la detección de endotoxinas desenmascaradas puede lograrse usando diferentes ensayos de detección.

Materiales y métodos

Se enmascaró endotoxina (*E. coli* 055:B5, Sigma L2637-5MG) en disoluciones que contenían polisorbato 80 al 0,05% en peso tamponado con 1 x PBS o polisorbato 20 al 0,05% en peso tamponado con 1 x PBS durante 3 días a temperatura ambiente.

Se realizó desenmascaramiento tal como sigue: Se realizó desenmascaramiento mediante una combinación de citrato de sodio, CaCl₂, BSA, SDS y 1-dodecanol. Se añadieron 150 µl de citrato de sodio y 100 µl de cada una de las siguientes disoluciones madre a 1 ml de disolución de muestra: citrato de sodio (1,375 M pH 7,5), CaCl₂ (1 M), BSA (10 mg/ml), SDS (1%) y 1-dodecanol (1 mM). Se solubilizó 1-dodecanol en EtOH al 70%. En un control de enmascaramiento diferente, no se realizó desenmascaramiento.

Se añadieron secuencialmente todas las disoluciones madre con etapas de mezclado de dos minutos tras cada adición. Tras la adición y el mezclado del último componente se incubaron las muestras durante al menos 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se diluyeron gradualmente muestras enmascaradas (control de enmascaramiento) y desenmascaradas 1:10 y 1:5 en agua despirogenada (dilución final 1:50). Se usó un ensayo de factor C recombinante (EndoZyme®) para la detección de endotoxinas.

Resultados

La tabla 17 (a continuación) muestra el porcentaje de recuperación, medido usando un ensayo de factor C recombinante (EndoZyme®), de endotoxina recuperada a partir de los dos sistemas de enmascaramiento especificados en este ejemplo.

Tabla 17

Detección de endotoxina desenmascarada usando factor C recombinante

Muestra	Factor C recombinante	
	PBS + P80	PBS + P20
	[UE/ml]	[UE/ml]
Control positivo	9,3	6,8
	Recuperación [%]	Recuperación [%]
Control de enmascaramiento	0	0
Tras desenmascaramiento	65	66

El control de enmascaramiento no mostró recuperación de endotoxinas en ninguna muestra. El desenmascaramiento de endotoxinas en polisorbato 80 o polisorbato 20 dio como resultado una recuperación de endotoxinas del 65% y el 66%, respectivamente, con referencia al control positivo (contenido en endotoxinas en agua despirogenada). Los resultados indican la revelación eficaz de endotoxinas usando un modulador de múltiples componentes que comprende citrato de sodio, CaCl₂, BSA, SDS y dodecanol tal como se detecta mediante un sistema de detección de factor C recombinante (EndoZyme®). Este experimento demuestra que la detección de endotoxinas desenmascaradas es independiente del sistema de detección de endotoxinas usado. Por consiguiente, pueden detectarse endotoxinas desenmascaradas usando el sistema de detección de endotoxinas empleado en los ejemplos previos, pero también puede detectarse usando un sistema de detección de endotoxinas que difiere del usado en los ejemplos previos.

Ejemplo 18: Detección de endotoxina desenmascarada usando un ensayo de lisado de amebocitos de *Limulus* (LAP)

Este experimento investiga la detección de endotoxina desenmascarada usando un ensayo de detección diferente del ensayo de factor C recombinante (EndoZyme®), es decir, el ensayo de lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL). Se realizó el experimento con el fin de corroborar adicionalmente que detección del desenmascaramiento de endotoxinas no depende del ensayo de detección.

Materiales y métodos

Se enmascaró endotoxina (*E. coli* 055:B5, Sigma L2637-5MG) en disoluciones que contenían polisorbato 80 al 0,05% en peso tamponado con 1 x PBS o polisorbato 20 al 0,05% en peso tamponado con 1 x PBS durante 3 días a temperatura ambiente.

Se realizó desenmascaramiento tal como sigue: Se realizó desenmascaramiento mediante una combinación de citrato de sodio, CaCl₂, BSA, SDS y 1-dodecanol. Se añadieron 150 µl de citrato de sodio y 100 µl de cada una de las siguientes disoluciones madre a 1 ml de disolución de muestra: citrato de sodio (1,375 M pH 7,5), CaCl₂(1 M), BSA (10 mg/ml), SDS (1%) y 1-dodecanol (1 mM). Se solubilizó 1-dodecanol en EtOH al 70%.

- 5 Se añadieron secuencialmente todas las disoluciones madre con etapas de mezclado de dos minutos tras cada adición. Tras la adición y el mezclado del último componente se incubaron las muestras durante al menos 30 minutos a temperatura ambiente.

- 10 Posteriormente, se diluyeron gradualmente muestras enmascaradas (control de enmascaramiento) y desenmascaradas 1:10 y 1:5 en agua despirogenada (dilución final 1:50). Se usó un ensayo cromogénico basado en LAL de cinética (kinetic-QCL®, Lonza) para la detección de endotoxina. El control de enmascaramiento refleja el contenido en endotoxinas detectable sin desenmascaramiento. En un control de enmascaramiento diferente, no se realizó desenmascaramiento.

Resultados

- 15 La tabla 18 (a continuación) muestra el porcentaje de recuperación, medido usando un ensayo de LAL (kinetic QCL®, Lonza), de endotoxina recuperada a partir de los dos sistemas de enmascaramiento especificados anteriormente en este ejemplo.

Tabla 18

Desenmascaramiento usando un ensayo de LAL

Muestra	LAL	
	PBS + P80 [UE/ml]	PBS + P20 [UE/ml]
Control positivo	11,6	7,2
	Recuperación [%]	Recuperación [%]
Control de enmascaramiento	3	0
Tras desenmascaramiento	96	47

- 20 El control de enmascaramiento no mostró recuperación de endotoxinas en ninguna muestra. El desenmascaramiento de endotoxinas en polisorbato 80 o polisorbato 20 dio como resultado una recuperación de endotoxinas del 96% y el 47%, respectivamente, con referencia al control positivo (contenido en endotoxinas en agua despirogenada). Los datos demuestran claramente que puede detectarse desenmascaramiento de endotoxinas con el ensayo de detección de LAL y que la detección de desenmascaramiento de endotoxinas no depende del
25 ensayo de detección.

Ejemplo 19: Variación de alcoholes (alcoholes alifáticos) como moduladores para desenmascarar usando un modulador de múltiples componentes

- 30 Este experimento investiga el desenmascaramiento de diferentes endotoxinas usando diferentes alcoholes. Se realizó el experimento con el fin de investigar la eficacia de desenmascaramiento de diferentes compuestos de alcohol en el modulador de múltiples componentes.

Materiales y métodos

Se enmascararon endotoxinas de *E. coli* 055:B5 (Sigma L2637-5MG), *S. abortus equi* (Acila 1220302) y *K. pneumoniae* (LMU) en disoluciones que contenían citrato de sodio 10 mM y polisorbato 20 al 0,05% en peso durante tres días a temperatura ambiente.

- 35 Se realizó desenmascaramiento tal como sigue: Se realizó desenmascaramiento mediante una combinación de Na Citrato, CaCl₂, BSA, SDS y 1-dodecanol. Se añadieron 150 µl de citrato de sodio y 100 µl de cada una de las siguientes disoluciones madre a 1 ml de disolución de muestra: citrato de sodio (1,375 M pH 7,5), CaCl₂ (1 M), BSA (10 mg/ml), SDS (1%) y una determinada concentración de 1-dodecanol. Se solubilizaron los alcoholes y mezclas de
40 alcoholes usados en los sistemas de modulador de múltiples componentes en EtOH; se enumeran las concentraciones en la tabla 19a (a continuación). En un control de enmascaramiento separado, no se realizó desenmascaramiento.

Se añadieron secuencialmente todas las disoluciones madre con etapas de mezclado de dos minutos tras cada adición. Tras la adición y el mezclado del último componente se incubaron las muestras durante al menos 30 minutos a temperatura ambiente.

45 Tabla 19a

Enfoque de	Alcoholes (tamaño)	Concentración [mM]
------------	--------------------	--------------------

desenmascaramiento		
1	Octanol (C8)	1,0
2	Decanol (C10)	1,0
3	Dodecanol (C12)	1,0
4	Tetradecanol (C14)	1,0
5	Hexadecanol (C16)	1,0
6	Octanol (C8)	0,3
	Decanol (C10)	0,3
	Dodecanol (C12)	0,3
7	Decanol (C10)	0,3
	Dodecanol (C12)	0,3
	Tetradecanol (C14)	0,3
8	Dodecanol (C12)	0,3
	Tetradecanol (C14)	0,3
	Hexadecanol (C16)	0,3

Después de eso, se diluyeron las muestras 1:10 y 1:100 en agua libre de endotoxinas y se analizaron para determinar el contenido en endotoxinas usando EndoLISA® (Hyglos GmbH). Se calculó el porcentaje de recuperación de LPS con referencia al contenido determinado en endotoxinas a tiempo cero (resumido en la tabla 19b, a continuación).

Resultados

La tabla 19b (a continuación) muestra el porcentaje de recuperación tras enmascaramiento (control de enmascaramiento) y tras desenmascaramiento usando el ensayo EndoLISA® (Hyglos) a partir del sistema de enmascaramiento anterior mediante diversos enfoques de desenmascaramiento que emplean diferentes alcanoles (alcoholes alifáticos) o mezclas de alcanoles (mezclas de alcohol alifático) tal como se especifica en la tabla 19a.

Tabla 19b

Desenmascaramiento de diferentes endotoxinas usando Ca, BSA, SDS y alcanoles variables, tal como se detecta mediante el ensayo EndoLISA®

	Endotoxina		
	<i>K. pneumoniae</i> * [UE/ml]	<i>S. abortus equi</i> [UE/ml]	<i>E. coli</i> O55:B5 [UE/ml]
Control positivo	191	51	68
	Recuperación [%]	Recuperación [%]	Recuperación [%]
Control de enmascaramiento	0	0	0
Enfoque de desenmascaramiento (tamaño de alcohol)			
1 (C8)	75	0	2
2 (C10)	52	0	0
3 (C12)	147	62	76
4 (C14)	94	108	71
5 (C16)	99	83	22
6 (C8, C10, C12)	60	14	6
7 (C10, C12, C14)	126	108	43
8 (C12, C14, C16)	126	173	43

* Para el desenmascaramiento de *K. pneumoniae* se añadieron 150 µl de CaCl₂.

Los resultados anteriores indican que se logró el desenmascaramiento de *K. pneumoniae* con octanol (recuperación del 75%), dodecanol (147%), tetradecanol (94%) y hexadecanol (99%), así como con diferentes combinaciones de alcanoles (véanse, por ejemplo, los enfoques de desenmascaramiento 7 y 8). Sin embargo, el desenmascaramiento con decanol fue menos eficaz (52%). El desenmascaramiento del LPS de *S. abortus equi* fue el más eficaz usando tetradecanol (108%), hexadecanol (82%), dodecanol (62%), o diferentes combinaciones de alcanoles. Se observó desenmascaramiento eficaz de *E. coli* O55:B5 para dodecanol (76%) y tetradodecanol (71%). No se observó recuperación de endotoxinas para los controles de enmascaramiento.

Estos resultados indican que se logró el desenmascaramiento más eficaz (independientemente de la naturaleza de la endotoxina) usando dodecanol o tetradecanol, o usando combinaciones de dodecanol y tetradecanol con un alcohol adicional (por ejemplo, decanol en la revelación 7). Estos resultados también indican que todos los sistemas de modulador de múltiples componentes con alcoholes alifáticos C₁₂, C₁₄ y/o C₁₆ presentaron un desenmascaramiento eficaz de endotoxina.

El intervalo de longitud de la cadena de alquilo de los alcoholes grasos para un desenmascaramiento eficaz parece depender de la fuente de endotoxinas. Las diferencias en las eficacias de desenmascaramiento pueden depender hasta cierto punto de la heterogeneidad en la longitud de las cadenas de acilo de los ácidos grasos β-hidroxilo que están presentes en la porción de lípido A de endotoxina. Entre y dentro de las especies bacterianas, estas cadenas de acilo pueden variar en longitud de desde C10 hasta C28 (Endotoxin in health and disease, editado por H. Brade (1999), pág. 98 ss.: "Chemical structure of Lipid A: Recent advances in structural analysis of biologically active molecules"; Marcel Dekker Inc, Nueva York). Sin embargo, los ácidos graso β-hidroxilo más comunes con longitudes de cadena de C14 y C16 se añaden a la diglucosamina del lípido A. Por tanto, el desenmascaramiento es, en todos los casos, más eficaz en presencia de alcoholes grasos con longitud de la cadena de alquilo entre C12 y C14, aunque también se observa desenmascaramiento de endotoxina para otras longitudes de la cadena de alquilo en el intervalo de C8-C16.

Ejemplo 20: Variación de alcanoles (alcoholes alifáticos) como moduladores para desenmascarar usando un modulador de un único componente

Se realizó este experimento para investigar el efecto de diversos alcanoles (alcoholes alifáticos) en el desenmascaramiento en ausencia de componentes de modulador adicionales. Por tanto, el experimento investiga la eficacia de desenmascaramiento de endotoxinas usando diversos alcanoles (alcoholes alifáticos) como moduladores de un único componente.

Materiales y métodos

Se enmascaró endotoxina de *E. coli* 055:B5 (Sigma L2637-5MG) en disoluciones que contenían citrato de sodio 10 mM y polisorbato 20 al 0,05% en peso durante 3 días a temperatura ambiente.

Con el fin de desenmascarar las muestras, se mezclaron muestras (1 ml) con 100 µl del alcohol particular (es decir, alcohol alifático). Se solubilizaron los alcanoles usados en los sistemas de modulador de un único componente en EtOH. Se muestran las concentraciones en la tabla 20a (a continuación).

Tabla 20a

Variación de alcanoles (alcoholes alifáticos)

Enfoque de desenmascaramiento	Alcanoles (tamaño)	Concentración [mM]
1	Dodecanol (C12)	50 mM
2	Tridecanol (C13)	50 mM
3	Tetradecanol (C14)	50 mM

Tras la adición de agentes desenmascaramiento, se incubaron las muestras durante 30 minutos y se diluyeron 1:10 así como 1:100 en agua despirogenada. Se detectaron endotoxinas en ambas diluciones y la recuperación declarada refleja la recuperación media de ambas diluciones. El control de enmascaramiento refleja la muestra no tratada tras enmascaramiento, es decir, la disolución no está desenmascarada. Se usó el ensayo EndoLisa® para la detección de endotoxinas.

Resultados

La tabla 20b (a continuación) muestra el porcentaje de recuperación, medido usando el ensayo EndoLisa® (Hyglos), de endotoxinas recuperadas a partir del sistema de enmascaramiento anterior mediante diversos enfoques de desenmascaramiento empleando diferentes alcanoles (alcoholes alifáticos) en diferentes enfoques de desenmascaramiento usando sistemas de modulador único tal como se especificó anteriormente en la tabla 20a.

Tabla 20b

Desenmascaramiento usando diferentes alcanoles (EndoLISA®)

Endotoxina	<i>E. coli</i> O55:B5 (gel) [UE/ml]
Control positivo	111
	Recuperación [%]
Control de enmascaramiento	0
Enfoque de desenmascaramiento (tamaño de alcohol)	
1 (C12)	56
2 (C13)	41
3 (C14)	22,6

5 Los resultados indican que un modulador de un único componente que consiste en dodecanol (enfoque de desenmascaramiento 1) fue más eficaz en el desenmascaramiento de *E. coli* 055:B5 (56% de recuperación), mientras que los moduladores de único componente que consisten en tridecanol (enfoque de desenmascaramiento 2) o tetradecanol (enfoque de desenmascaramiento 3) dieron como resultado menos recuperación de *E. coli* 055:B5 (41% y 22,6%, respectivamente). Tal como se esperaba, los controles de enmascaramiento no mostraron recuperación de endotoxinas. En resumen, los datos demuestran que el alcohol más eficaz (alcohol alifático) para el desenmascaramiento de *E. coli* 055:B5, cuando se usa como sistema de modulador de un único componente, es dodecanol, seguido por tridecanol y tetradecanol.

REIVINDICACIONES

1. Composición acuosa que comprende una proteína, un compuesto alifático con C8-C16 como cadena principal y LPS, en la que el compuesto alifático es un alcohol.
- 5 2. Composición acuosa según la reivindicación 1, en la que el alcohol es un 1-alcohol no ramificado, preferiblemente 1-dodecanol.
3. Composición acuosa según la reivindicación 1, en la que el alcohol es un compuesto ramificado con al menos una sustitución en la cadena principal seleccionada de un grupo metilo, etilo, propilo y butilo.
- 10 4. Composición acuosa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende un detergente seleccionado de un detergente aniónico, un detergente catiónico, un detergente no iónico, un detergente anfótero y cualquier combinación de los mismos.
- 15 5. Composición acuosa según la reivindicación 4, en la que dicho detergente aniónico se elige del grupo que consiste en: alquilsulfatos, preferiblemente laurilsulfato de amonio o laurilsulfato de sodio (SDS); alquil-éter sulfatos, preferiblemente lauril éter sulfato de sodio o miristil éter sulfato de sodio; sulfato de colesterol; sulfonatos, preferiblemente dodecilbencenosulfonato, laurilsulfoacetato de sodio o xilenosulfonato; alquilsulfosuccinatos, preferiblemente laurilsulfosuccinato de disodio; sulfóxidos, preferiblemente dodecilmethylsulfóxido; fosfatos, preferiblemente trilauril éter-4-fosfato; y carboxilatos, preferiblemente estearato de sodio o lauroilsarcosinato de sodio.
- 20 6. Composición acuosa según la reivindicación 4, en la que dicho detergente catiónico se elige del grupo que consiste en: aminas primarias; aminas secundarias; aminas terciarias y cationes de amonio cuaternario tales como sales de alquiltrimetilamonio (preferiblemente bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB); o cloruro de cetiltrimetilamonio (CTAC)); cloruro de cetilpiridinio (CPC); detergentes de amonio cuaternario, preferiblemente fosfato de tris[2-(2-hidroxietoxi)etil]-octadecil-amonio (Quaternium 52); y etoxilato de hidroxietilcelulosa, cuaternizado (Polyquaternium-10).
- 25 7. Composición acuosa según la reivindicación 4, en la que dicho detergente no iónico se elige del grupo que consiste en: ésteres alquílicos de sorbitano de polioxietilenglicol (polisorbatos), preferiblemente polisorbato 20 (Tween-20), polisorbato 40, polisorbato 60 o polisorbato 80 (Tween-80); alquil éteres de polioxietilenglicol; alquil éteres de polioxipropilenglicol; alquil éteres de glucósido; éteres de octilfenol de polioxietilenglicol; éteres de alquilfenol de polioxietilenglicol; ésteres alquílicos de glicerol; ésteres alquílicos de sorbitano; copolímeros de bloque de polietilenglicol y polipropilenglicol; cocamida MEA; esteroides, preferiblemente colesterol; ciclodextrinas; poloxámeros, preferiblemente polímeros de bloque Pluronic; y cocamida DEA.
- 30 8. Composición acuosa según la reivindicación 4, en la que dicho detergente anfótero se elige del grupo que consiste en: CHAPS (3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato); sultaínas, preferiblemente cocamidopropil-hidroxisultaína; betaínas, preferiblemente cocamidopropil-betaína; óxidos de amino, preferiblemente óxido de palmitamina, óxido de laurilamina y óxido de amina de fórmula general $R^3N^+O^-$, en la que R^3 es alquilo C₈-C₁₈, alquenilo C₈-C₁₈, alquinilo C₈-C₁₈ o lecitina.
- 35 9. Composición acuosa según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en la que el detergente se selecciona de polisorbato 20 (Tween 20), polisorbato 80 (Tween 80), poloxámero 188 (Pluronic F68), octoxinol 9 (Triton X-100), óxido de laurilamina, fosfato de tris[2-(2-hidroxietoxi)etil]-octadecil-amonio (Quaternium 52), trilauril éter-4-fosfato y estearato de sodio.
- 40 10. Composición acuosa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la proteína se elige de un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una hormona, una enzima, una proteína de fusión, un conjugado de proteína y cualquier combinación de los mismos.
- 45 11. Composición acuosa según la reivindicación 10, en la que el fragmento de anticuerpo se selecciona de un Fab, un Fab', un F(ab')₂ y un Fv, un anticuerpo de cadena sencilla y cualquier combinación de los mismos.
12. Composición acuosa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que contiene una proteína adicional que es una albúmina, preferiblemente albúmina sérica humana, albúmina sérica bovina y/u ovoalbúmina.
13. Composición acuosa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende un agente caotrópico, un catión o una combinación de los mismos.
- 50 14. Composición acuosa según la reivindicación 13, en la que el agente caotrópico se selecciona de urea, cloruro de guanidinio, butanol, etanol, perclorato de litio, acetato de litio, cloruro de magnesio, fenol, propanol y tiourea.
15. Composición acuosa según cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14, en la que el catión es un catión divalente.

16. Composición acuosa según la reivindicación 15, en la que el catión divalente se selecciona de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} y Zn^{2+} .
- 5 17. Composición acuosa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en la que la proteína adicional está presente en una concentración de desde 0,1-20 mg/ml, preferiblemente desde 1-10 mg/ml; el compuesto alifático está presente en la concentración de desde 0,01-100 mM, preferiblemente desde 0,1-10 mM; el detergente está presente en una concentración de desde el 0,001 - 1,0% en peso, preferiblemente desde el 0,05 - 0,5% en peso, preferiblemente desde el 0,02 - 0,2% en peso; y el catión divalente está presente en la concentración de desde 1 - 400 mM, preferiblemente desde 10 - 200 mM, más preferiblemente desde 50 - 100 mM.
- 10 18. Composición acuosa según la reivindicación 17, que comprende además un agente caotrópico en una concentración de desde 1 mM - 1 M, preferiblemente desde 10 mM - 200 mM.
19. Composición acuosa según cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en la que el pH está en el intervalo de desde pH 2-12, preferiblemente desde pH 5-10.
- 15 20. Composición acuosa según cualquiera de las reivindicaciones 1-19, que contiene además proteína de factor C, preferiblemente proteína de factor C recombinante.

Figura 1

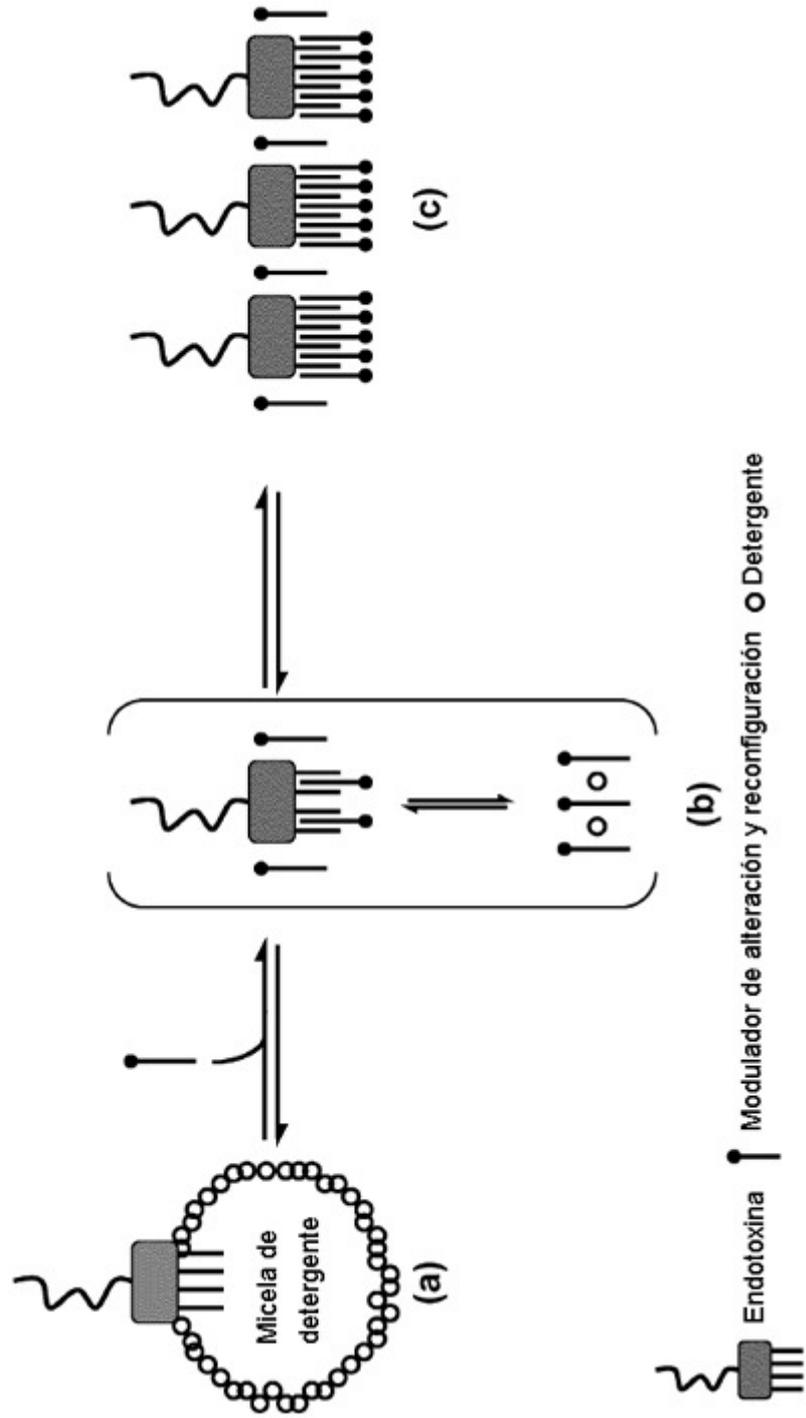


Figura 2

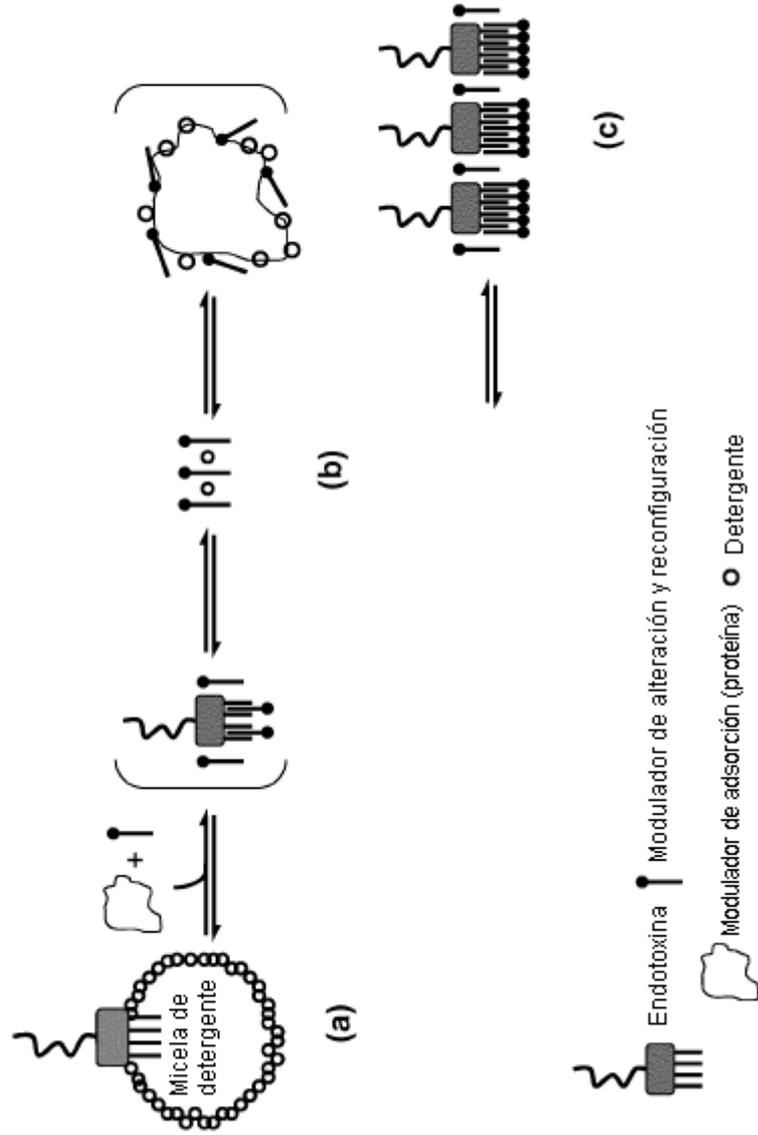


Figura 3

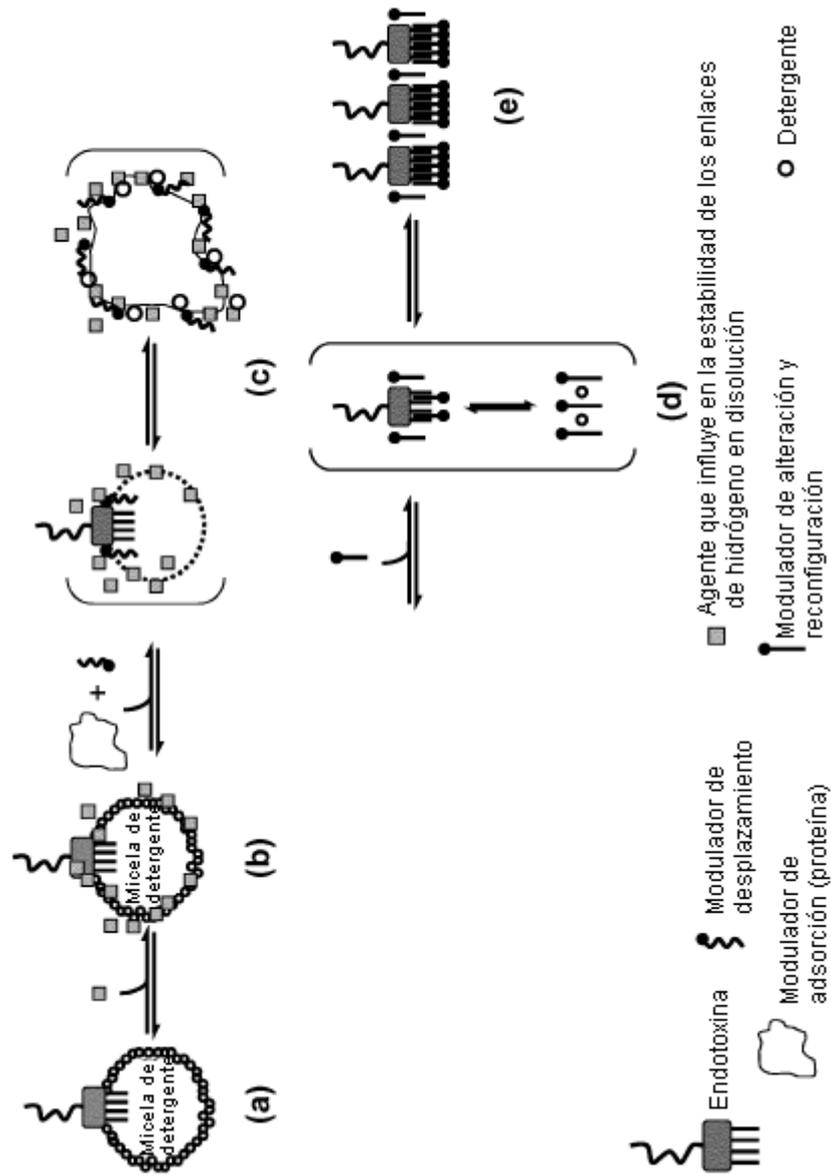


Figura 4

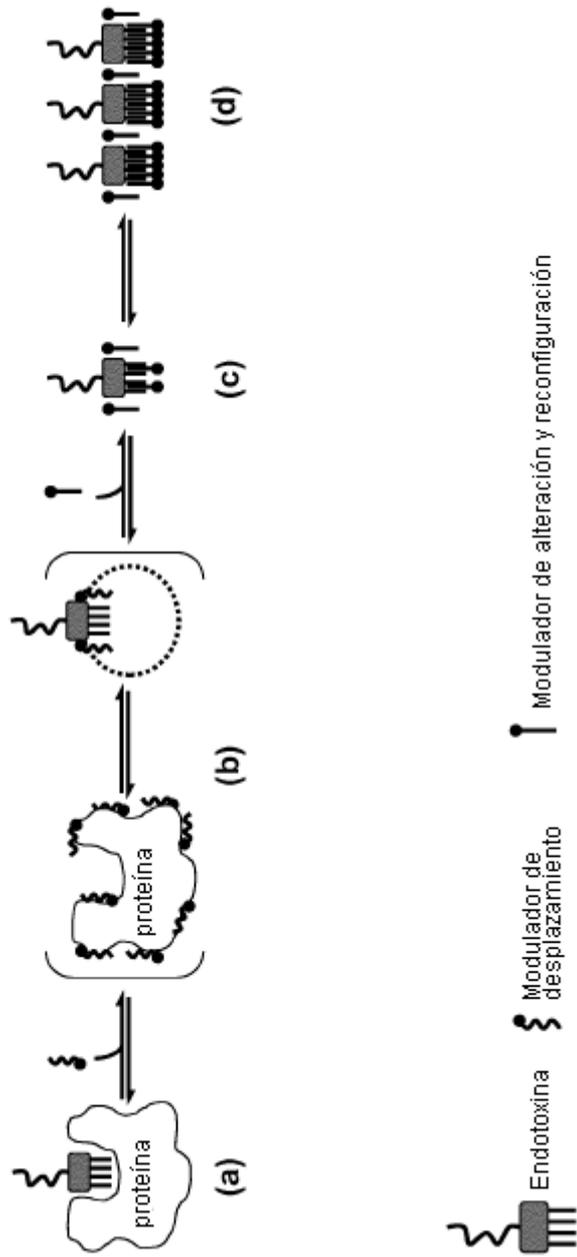
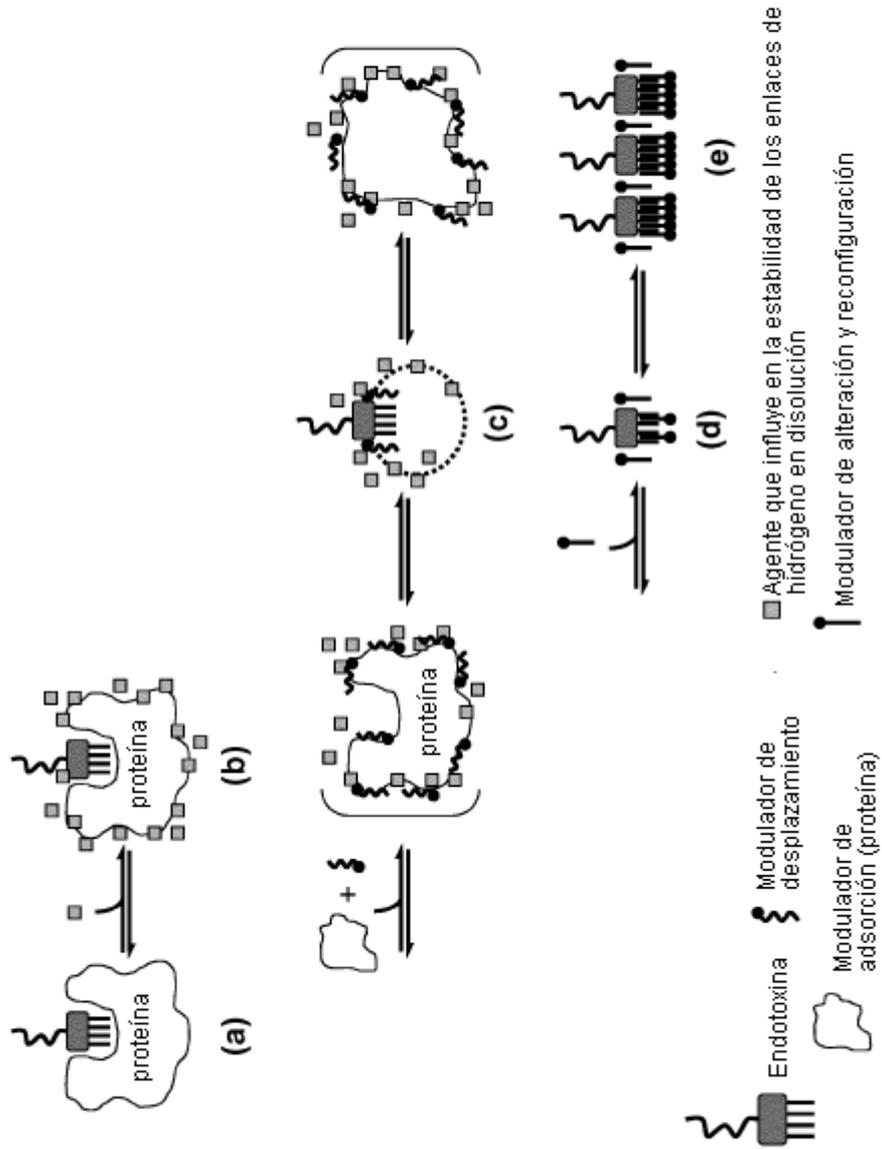


Figura 5



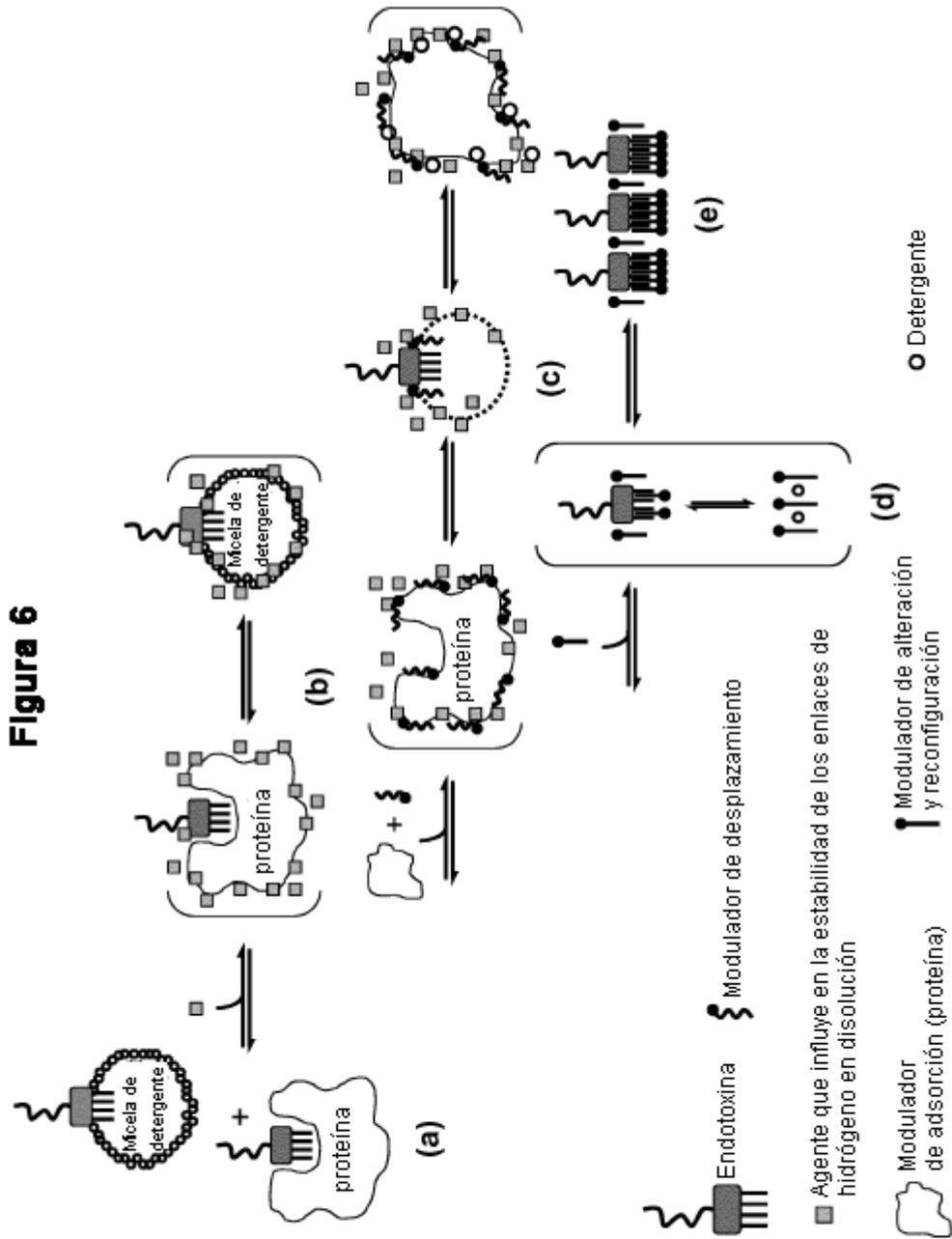
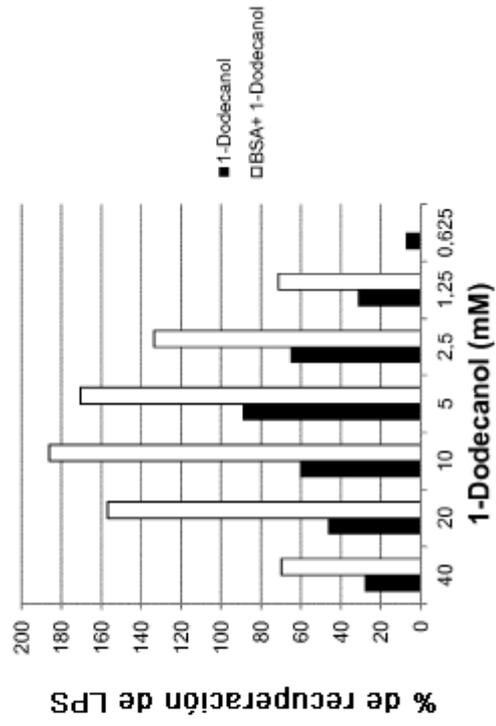


Figure 7



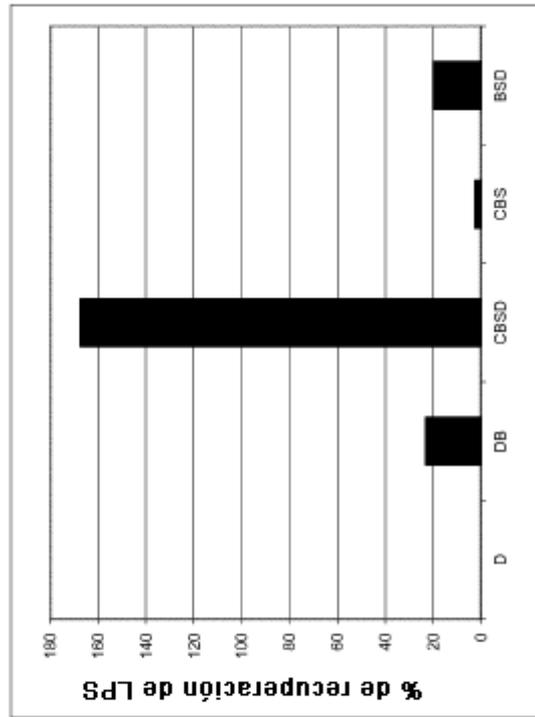


Figura 8

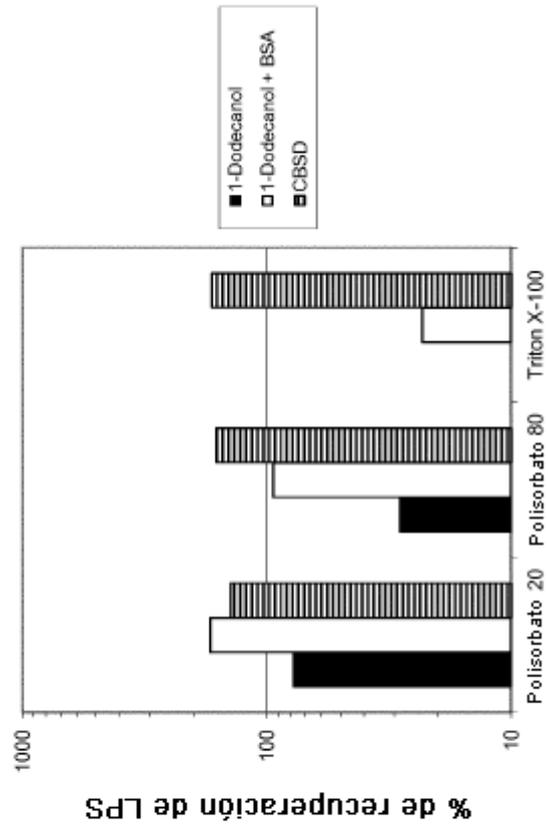


Figura 9

Figura 10

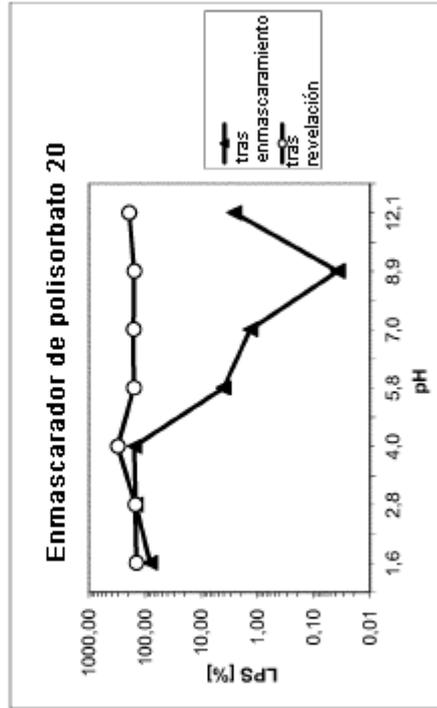
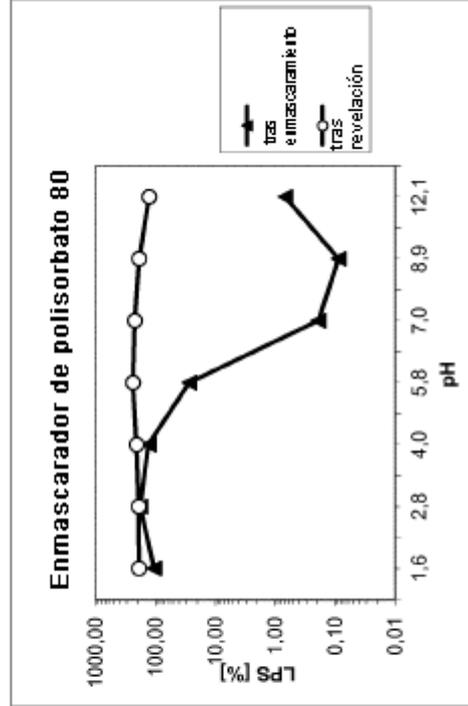


Figura 11



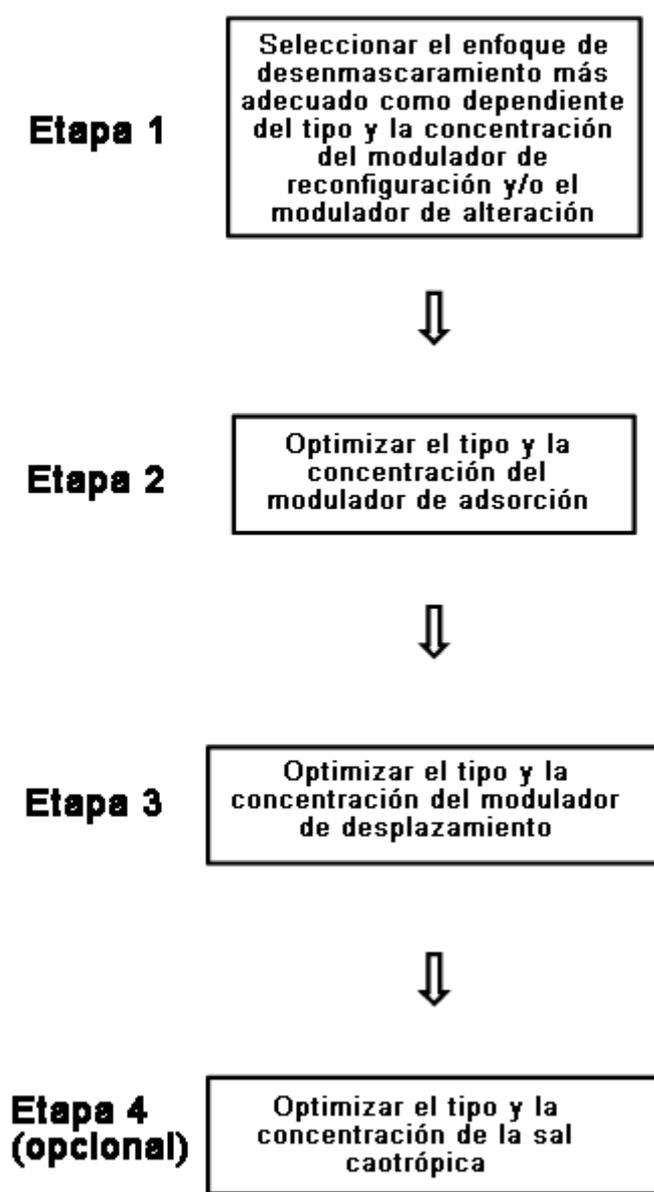


Figura 12

Figura 13

Etapas 1

Enfoque de desensamblamiento	Sal caotrópica [CaCl ₂] (M)	Modulador de adsorción [BSA] (mg/ml)	Modulador de desplazamiento [SDS] (%)	Modulador de reconfiguración [1-Dodecano] (mM)
A	-	-	-	100
A	-	-	-	10
A	-	-	-	1
B	-	100	-	100
B	-	100	-	10
B	-	100	-	1
C	1	100	1	100
C	1	100	1	10
C	1	100	1	1



Etapas 2

Enfoque de desensamblamiento	Modulador de adsorción [BSA] (mg/ml)
B o C	100
B o C	10
B o C	1

Etapas 3

Enfoque de desensamblamiento	Modulador de desplazamiento [SDS] (%)
C	1
C	0,1
C	0,01



Etapas 4

Enfoque de desensamblamiento	Agente de influencia en los enlaces de H [CaCl ₂] (mM)
C	1000
C	100
C	10

Figura 14

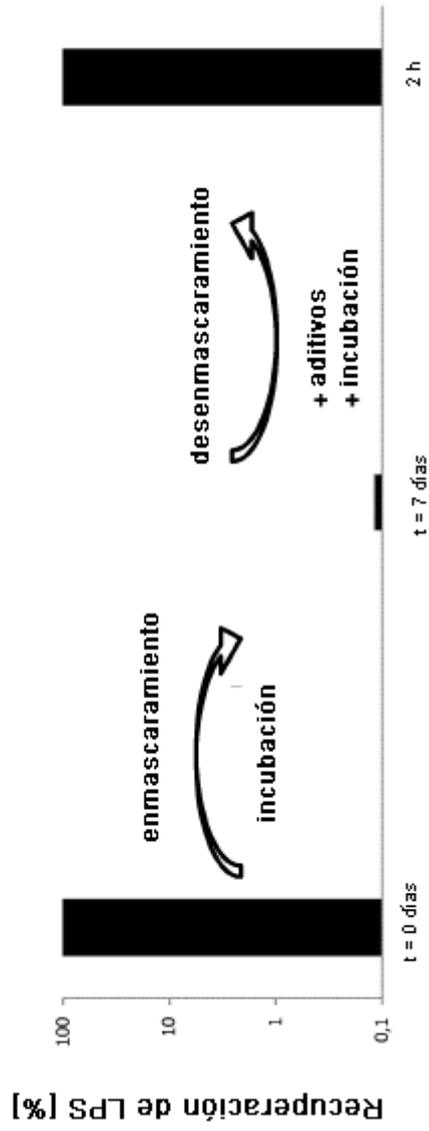


Figura 15

