

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 736 024**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2014** **E 14172151 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019** **EP 2955518**

54 Título: **Desenmascarar endotoxinas en solución**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.12.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

REICH, JOHANNES y
GRALLERT, HOLGER

74 Agente/Representante:

MILTENYI , Peter

ES 2 736 024 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

Desenmascarar endotoxinas en solución

5 La presente invención se refiere a desenmascarar endotoxinas en composiciones, preferentemente en composiciones farmacéuticas, de tal manera que las endotoxinas presentes pero indetectables se vuelvan detectables. Específicamente, la invención se refiere a un método de desenmascarar una endotoxina en una composición. La invención se refiere además a un método de detectar una endotoxina en una composición. La solicitud desvela además un kit para desenmascarar una endotoxina en una composición. La invención se refiere además al uso de un modulador capaz de desenmascarar una endotoxina, por ejemplo, liberando una endotoxina de un complejo entre dicha endotoxina y un enmascarador de endotoxina, para desenmascarar una endotoxina en una composición.

Antecedentes de la invención

15 La presencia de endotoxinas en composiciones acuosas es un problema intratable que amenaza y/o limita la aplicación de muchas composiciones, en particular si se pretenden para su uso farmacéutico. Esto es especialmente cierto para composiciones que comprenden productos proteicos, por ejemplo, productos de proteínas recombinantes. Las endotoxinas de origen natural, especialmente endotoxinas que pertenecen a la clase de compuestos caracterizados como lipopolisacáridos (LPS) son moléculas producidas por ciertos tipos de bacterias, por ejemplo bacterias gramnegativas. En general, las endotoxinas tales como el LPS comprenden un antígeno O de polisacárido extendido, un polisacárido de antígeno núcleo que incluye un componente de núcleo externo y un componente de núcleo interno 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 gramnegativas, donde contribuyen a la integridad estructural bacteriana escudando 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 los sistemas inmunes animales normales, por ejemplo, humanos, porque el suero normal contiene receptores de lipoligosacárido (LOS) que normalmente dirigen los efectos citotóxicos del sistema inmune contra los patógenos bacterianos invasores que portan tales endotoxinas.

30 Cuando está presente en la sangre humana en una forma de forma disociada de sus bacterias de origen, las endotoxinas tales como el LPS pueden provocar endotoxemia que en casos graves puede dar lugar a choque séptico. Esta reacción se debe al componente de lípido A de la endotoxina, que puede provocar la activación descontrolada del sistema inmune de mamíferos, en algunos casos produciendo mediadores inflamatorios tales como el receptor tipo toll (en inglés toll-like receptor, TLR) 4, que es responsable de la activación celular del sistema inmune.

40 Las bacterias, así como las toxinas que producen, también son ubicuas. Por ejemplo, se sabe que los contaminantes de endotoxinas existen en las tuberías y las mangueras de los sistemas de suministro de agua, incluyendo aquellas de los laboratorios y las instalaciones para preparar formulaciones farmacéuticas. Las superficies de los recipientes tales como fermentadores y utensilios de vidrio usados en el proceso de la formulación de productos farmacéuticos también se contaminan comúnmente. Además, como los humanos llevan bacterias y por lo tanto endotoxinas en sus cuerpos, de esta manera el personal de tales instalaciones en las que se formulan los productos farmacéuticos también representan una posible fuente de contaminantes de endotoxinas.

45 Por supuesto, además de lo anterior, las propias bacterias gramnegativas encuentran uso en la producción de por ejemplo proteínas terapéuticas recombinantes, por lo que siempre hay un peligro de contaminación de endotoxinas de composiciones acuosas, por ejemplo, formulaciones farmacéuticas, que contienen tales proteínas terapéuticas pueden surgir también directamente de tales bacterias usadas en el proceso de producción.

50 Para salvaguardar contra la incorporación potencialmente peligrosa de contaminantes de endotoxinas, sea cual sea su fuente, normalmente deben tomarse medidas para excluir las endotoxinas de todas las etapas y productos usados en el proceso de producción de tales proteínas antes de que tales soluciones puedan administrarse para fines terapéuticos. De hecho, la exclusión y/o la retirada y la ausencia verificable de todas las trazas de endotoxina (detectable) están entre los requisitos que deben cumplirse cuando se busca la aprobación reguladora para cualquier producto terapéutico nuevo, en particular aquellos que contienen productos producidos en bacterias, o que han entrado en contacto con bacterias en cualquier punto en el proceso de producción (véanse 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, todos los recipientes que guardan y/o que transfieren soluciones destinadas a la administración eventual deben hacerse libres de endotoxinas antes del contacto con la solución. Se usa un horno de despirogenación para este propósito, en donde se requieren temperaturas en exceso de 200 °C para romper las endotoxinas. Basándose en el material de empaquetamiento primario como jeringas o viales, una temperatura del vidrio de 250 °C y un tiempo de mantenimiento de 30 minutos es típico para lograr una reducción de los niveles de endotoxinas por un factor de 1000. Normalmente, los líquidos no pueden despirogenarse

por calor, por lo tanto se usan diferentes métodos, tales como cromatografía (por ejemplo, intercambio aniónico), extracción de fases (por ejemplo, Triton X-114), filtración (por ejemplo, ultrafiltración).

5 Un ensayo común para detectar la actividad de la endotoxina es el ensayo de lisado de amebocito de limulus (LAL), que utiliza sangre del cangrejo herradura. Los niveles muy bajos de endotoxina pueden provocar la coagulación por el lisado de limulus debido a una amplificación potente a través de una cascada enzimática. Sin embargo, debido a la población menguante de cangrejos herradura y el hecho de que existen factores que interfieren con el ensayo LAL, se han realizado esfuerzos para desarrollar ensayos alternativos para detectar la presencia de endotoxinas en solución. El más prometedor de tales métodos son los ensayos de sorbente de afinidad ligados a enzimas (enzyme-linked affinity sorbent assays), que usan una fase sólida para la captura de endotoxinas y la posterior detección por una versión recombinante de una proteína en el ensayo LAL, el Factor C. El kit EndoLISA® es uno de dichos ensayos de sorción de afinidad.

15 Sin embargo, incluso las mejores pruebas disponibles para detectar la presencia de pirógenos, tales como endotoxinas, en particular LPS, a menudo son incapaces de detectar el LPS en solución. Esto implica el peligro de que las soluciones que se cree razonablemente - en ausencia de cualquier endotoxina detectable - que son libres de endotoxinas de hecho contienen endotoxina que se enmascara de forma sencilla para hacerse indetectable. Tales soluciones, por ejemplo, formulaciones farmacéuticas no se excluirán de la aprobación reguladora (al menos no debido a contener endotoxina), debido a que por todas las apariencias diagnósticas, estas soluciones son libres de endotoxina, cumpliendo por lo tanto - o al menos pareciendo cumplir - este requisito regulador. Claramente, sin embargo, la administración de tales soluciones aparentemente libres de endotoxinas para someter los riesgos que desencadenan los tipos de reacciones mencionados anteriormente. En algunos casos, uno puede aprender la presencia de endotoxina enmascarada en soluciones demasiado tarde, después de que los sujetos ya hayan desarrollado los tipos de reacciones adversas y potencialmente amenazadoras para la vida se describen anteriormente. Además, desde un punto de vista higiénico, las autoridades reguladoras de fármacos ponen gran valor en conocer positivamente qué sustancias se contienen en las composiciones farmacéuticas y cuáles no. Esto en última instancia se reduce a la capacidad de detectar fiablemente todos los componentes en una composición dada y la capacidad de uno de creer los resultados obtenidos en referencia tanto a la presencia como a la ausencia de todas las sustancias probadas.

30 El documento **EP 308 239 A2** describe un método para reducir la contaminación de endotoxinas bacterianas en soluciones de macromoléculas.

35 El documento **US 2010/028857** describe un método para retirar endotoxinas.

El documento **Reich et al., en *Pharmacopeial Forum Nature Methods*, 1 de enero de 2013, páginas 1613-1621**, describe la baja recuperación de endotoxinas en formulaciones de proteínas comunes.

40 El documento **Reich et al., en un póster presentado en San Antonio, TX, EE.UU. el 3 de abril de 2014**, se refiere a la baja recuperación de endotoxinas en productos biofarmacéuticos.

El documento **Reich et al., en una presentación el 18 de febrero** de 2014, describe principios mecánicos de enmascaramiento de toxinas y estrategias para desenmascarar.

45 De esta manera existe una fuerte motivación para proporcionar formas en donde todas las endotoxinas presentes en las composiciones, incluyendo endotoxinas que sean indetectables porque se están enmascarando por ciertos componentes distintos de composiciones, pueden desenmascarse de tal manera que se hagan detectables. Proporcionar una forma de desenmascarar y/o detectar hasta ahora endotoxinas indetectables en una composición asistirá grandemente promoviendo la seguridad del paciente. Es un objeto de la presente invención abordar dichas necesidades.

Breve resumen de la invención

55 La materia objeto de la invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas. Por consiguiente, un aspecto de la invención se refiere a un método de desenmascarar una endotoxina en una composición, preferentemente una composición farmacéutica, que comprende un enmascarador de endotoxina y que se sospecha que comprende dicha endotoxina, comprendiendo dicho método las etapas de añadir a dicha composición un modulador capaz de desenmascarar dicha endotoxina, por ejemplo, mediante la liberación de dicha endotoxina, si está presente, de un complejo entre dicha endotoxina y dicho enmascarador de endotoxina, en donde dicho enmascarador de toxina es una sustancia que, en solución con endotoxina, hace a la endotoxina indetectable por métodos de detección disponibles y en donde dicho modulador comprende un primer alifático sustituido con heteroátomos, en donde dicho primer alifático sustituido con heteroátomos es un alcohol alifático que comprende 8 a 16 átomos de carbono. La composición farmacéutica será en la mayoría de los casos una composición acuosa.

65 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método de detectar una endotoxina en una composición, preferentemente una composición farmacéutica, que comprende un enmascarador de endotoxina y que se sospecha

que comprende dicha endotoxina, comprendiendo dicho método las etapas de añadir a dicha composición un modulador capaz de desenmascarar dicha endotoxina, por ejemplo, mediante la liberación de dicha endotoxina, si está presente, de un complejo entre dicha endotoxina y dicho enmascarador de endotoxina; y detectar dicha endotoxina por medio de un método de detección, en donde dicho enmascarador de toxina es una sustancia que, en solución con endotoxina, hace a la endotoxina indetectable por métodos de detección disponibles y en donde dicho modulador comprende un primer alifático sustituido con heteroátomos, en donde dicho primer alifático sustituido con heteroátomos es un alcohol alifático que comprende 8 a 16 átomos de carbono. La composición farmacéutica será en la mayoría de los casos una composición acuosa.

En determinadas realizaciones, los métodos anteriores de desenmascarar y/o detectar pueden comprender además la etapa de añadir a dicha composición un agente que influye en la estabilidad de unión de hidrógeno en solución. En determinadas realizaciones, es preferible añadir dicho agente que influye en la estabilidad de unión de hidrógeno en solución antes de la adición de dicho modulador.

La presente solicitud desvela un kit para desenmascarar una endotoxina en una composición, preferentemente una composición farmacéutica, que comprende un enmascarador de endotoxina y que se sospecha que comprende dicha endotoxina, comprendiendo dicho kit a) un modulador capaz de desenmascarar dicha endotoxina, por ejemplo, liberando una endotoxina de un complejo entre dicha endotoxina y un enmascarador de endotoxina; y b) un agente que influye en la estabilidad de unión de hidrógeno en solución; en donde los componentes (a) y (b) están en el mismo o en diferentes envases.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de un modulador capaz de desenmascarar una endotoxina, por ejemplo, liberando una endotoxina de un complejo entre dicha endotoxina y un enmascarador de endotoxina, para desenmascarar una endotoxina en una composición, preferentemente una composición farmacéutica que se sospecha que comprende dicha endotoxina y dicho enmascarador de endotoxina, en donde dicho modulador comprende un primer alifático sustituido con heteroátomos, en donde dicho primer alifático sustituido con heteroátomos es un alcohol alifático que comprende 8 a 16 átomos de carbono y en donde dicho enmascarador de toxina es una sustancia que, en solución con endotoxina, hace a la endotoxina indetectable por métodos de detección disponibles.

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

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra un mecanismo que se asume que subyace el enmascaramiento de endotoxina de acuerdo con una realización de la presente invención. En el escenario representado en la Figura 1, la endotoxina está presente en solución con un detergente (capaz de actuar como un enmascarador de endotoxina), que forma micelas de detergente en donde la endotoxina se embebe y de esta manera se enmascara de la detección. La Figura 1 muestra esquemáticamente los efectos de añadir un modulador mono-componente que rompe estas micelas, liberando la endotoxina embebida, sin formar nuevas micelas por sí mismo. Siguiendo la ruptura de las micelas de detergente, el modulador mono-componente sirve después como una chaperona para la endotoxina liberada, estabilizándola en solución. 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, pág. 26307-26313. La endotoxina en la forma mostrada en el panel (a) no es susceptible a detección, mientras que la endotoxina en la forma mostrada en el panel (c) es detectable. El escenario representado en la Figura 1 se analiza con detalle adicional a continuación.

La Figura 2 ilustra un mecanismo que se asume que subyace el enmascaramiento de endotoxina de acuerdo con una realización adicional de la presente invención. En el escenario representado en la Figura 2, la endotoxina está presente en solución con un detergente (capaz de actuar como un enmascarador de endotoxina), que forma micelas de detergente en donde la endotoxina se embebe y de esta manera se enmascara de la detección. La Figura 2 muestra esquemáticamente los efectos de añadir un modulador de componente dual que comprende componentes proteicos y no proteicos. Este modulador de componente dual se asume que rompe la micela del detergente en donde la endotoxina se insertó y enmascaró previamente. El componente no proteico del modulador estabiliza transitoriamente la endotoxina fuera de la micela del detergente, mientras que el componente proteico del modulador desestabiliza la micela de detergente mediante la unión por ejemplo a moléculas de detergente. El escenario representado en la Figura 2 se analiza con detalle adicional a continuación.

La Figura 3 ilustra un mecanismo que se asume que subyace el enmascaramiento de endotoxina de acuerdo con una realización adicional de la presente invención. En el escenario representado en la Figura 3, la endotoxina está presente en solución con un detergente (capaz de actuar como un enmascarador de endotoxina), que forma micelas de detergente en donde la endotoxina se embebe y de esta manera se enmascara de la detección. La Figura 3 muestra esquemáticamente los efectos de añadir un modulador de componente múltiple, así como un agente que influye en la estabilidad de unión de hidrógeno. Juntos, el modulador de componente múltiple y el agente que influye en la estabilidad de unión de hidrógeno desestabilizan la micela de detergente inicialmente enmascarando la

endotoxina y promueven la agregación de la endotoxina de tal manera que se hace detectable. El escenario representado en la Figura 3 se analiza con detalle adicional a continuación.

5 La Figura 4 ilustra un mecanismo que se asume que subyace el enmascaramiento de endotoxina de acuerdo con una realización adicional de la presente invención. En el escenario representado en la Figura 4, la endotoxina está presente en solución, es decir, con una proteína. La proteína comprende una hendidura de unión en donde la endotoxina puede unirse establemente y de esta manera mantenerse enmascarada de la detección. La Figura 4 muestra esquemáticamente los efectos de añadir un modulador de componente múltiple de tal manera que la endotoxina previamente enmascarada se agrega y se hace detectable. El escenario representado en la Figura 4 se
10 analiza con detalle adicional a continuación.

15 La Figura 5 ilustra un mecanismo que se asume que subyace el enmascaramiento de endotoxina de acuerdo con una realización adicional de la presente invención. En el escenario representado en la Figura 5, la endotoxina está presente en solución con una proteína (capaz de actuar como un enmascarador de endotoxina). La proteína comprende una hendidura de unión en donde la endotoxina puede unirse establemente y de esta manera mantenerse enmascarada de la detección. La Figura 5 muestra esquemáticamente los efectos de añadir un agente que influye en la estabilidad de unión de hidrógeno así como un modulador de componente múltiple que incluye componentes proteicos y no proteicos. Juntos, estos desestabilizan la endotoxina en su complejo con la proteína enmascarante, estabilizan transitoriamente la endotoxina fuera del complejo con la proteína enmascarante y
20 promueven la agregación de la endotoxina liberada, haciéndola detectable. El escenario representado en la Figura 5 se analiza con detalle adicional a continuación.

25 La Figura 6 ilustra un mecanismo que se asume que subyace el enmascaramiento de endotoxina de acuerdo con una realización adicional de la presente invención. En el escenario representado en la Figura 6, la endotoxina está presente en solución con una proteína así como con un detergente (capaces de actuar como un enmascarador de endotoxina). La proteína comprende una hendidura de unión en donde la endotoxina puede unirse establemente y de esta manera mantenerse enmascarada de la detección. Además, el detergente forma micelas estables en que las moléculas de endotoxina establemente insertadas se enmascaran. La Figura 6 muestra esquemáticamente los efectos de añadir un agente que influye en la estabilidad de unión de hidrógeno así como un modulador de
30 componente múltiple que incluye componentes proteicos y no proteicos. Juntos, estos desestabilizan la endotoxina en su complejo con la proteína enmascarante y/o en la micela de detergente enmascarante, estabilizan transitoriamente la endotoxina fuera del complejo con la proteína enmascarante y/o en la micela de detergente enmascarante y promueven la agregación de la endotoxina liberada, haciéndola detectable. El escenario representado en la Figura 6 se analiza con detalle adicional a continuación.

35 La Figura 7 es un gráfico que muestra la recuperación en porcentaje de la endotoxina LPS de un enmascarante detergente (polisorbato 20/citrato) usando sistemas moduladores de 1-dodecanol solo y 1-dodecanol junto con BSA.

40 La Figura 8 es un gráfico que muestra la recuperación en porcentaje de la endotoxina LPS del enmascarante 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 enmascarantes detergentes usando una diversidad de sistemas moduladores.

45 La Figura 10 es un gráfico que muestra la recuperación en porcentaje de la endotoxina LPS de un detergente enmascarante (polisorbato 20) dependiendo del pH.

50 La Figura 11 es un gráfico que muestra la recuperación en porcentaje de la endotoxina LPS de un detergente enmascarante (polisorbato 80) dependiendo del pH.

La Figura 12 es un diagrama de flujo que muestra un esquema de validación generalizado para determinar y optimizar un proceso de desenmascarado para una composición en cuestión sospechada de contener endotoxina enmascarada.

55 La Figura 13 es una tabla que muestra un esquema de evaluación generalizado para determinar y optimizar un proceso de desenmascarado para una composición en cuestión sospechada de contener endotoxina enmascarada.

60 La Figura 14 es una representación esquemática general de los métodos de la invención en el presente documento, como se ve desde el punto de vista del nivel de recuperación de LPS (es decir, actividad de LPS medida) antes y después de enmascarar (barras de la izquierda y de en medio de la figura, respectivamente), así como después de desenmascarar de acuerdo con los métodos de la presente invención (barra derecha de la figura). Las barras de la izquierda y de en medio de la figura representan de esta manera las circunstancias comúnmente prevalentes en las formulaciones farmacéuticas, en donde la endotoxina que está presente en solución, se hace indetectable por uno o más enmascarantes de endotoxina. Esta endotoxina puede hacerse detectable de nuevo, es decir, puede
65 "rescatarse" de su estado enmascarado, mediante los métodos de la presente invención, permitiendo a uno detectar la endotoxina previamente enmascarada.

La Figura 15 muestra un diagrama genérico que ilustra la dinámica asociada a los métodos de desenmascaramiento descritos en el presente documento. La transición de LPS activo (es decir, agregado y por lo tanto detectable) en el extremo derecho a LPS enmascarado (fondo medio; no agregado) se muestra para varias endotoxinas representativas. Debido a que la energía asociada al "LPS enmascarado" es menor que aquella asociada a "LPS activo", el LPS se mantiene estabilizado en esta forma enmascarada. Los métodos de la invención descritos en el presente documento desestabilizan eficazmente este LPS enmascarado, elevando de esta manera su energía a un nivel por encima de aquel del LPS enmascarado, desde donde el LPS puede caer de nuevo en energía en forma agregada (extremo derecho del diagrama). Se asume que el modulador de reconfiguración juega un papel clave mediando este rescate del LPS desde forma solubilizada (enmascarada) a agregada (no enmascarada).

General

Ha de entenderse que la descripción general anterior así como la descripción detallada siguiente son ejemplares y explicativas solamente y no son restrictivas de la invención como se reivindica. En esta solicitud, el uso del singular incluye el plural salvo que se indique específicamente de otra manera. En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" salvo que se indique de otra manera. Además, el uso de la frase "que incluye" así como otras formas gramaticales tales como "incluye" e "incluido", no es limitante. En el mismo sentido, el uso de la frase "que comprende" así como otras formas gramaticales tales como "comprende" y "comprendido" no es limitante. Los encabezamientos de sección a lo largo de la descripción son solamente para fines de organización. En particular no pretenden ser limitantes para las diversas realizaciones descritas en la misma y ha de entenderse que los elementos y las realizaciones descritos bajo un subencabezamiento pueden combinarse libremente con elementos y realizaciones descritos bajo otro subencabezamiento.

En la descripción anterior y posterior de las reivindicaciones, las características de cualquier realización están pensadas para que puedan combinarse con las de cualquier otra realización. Tales combinaciones de uno o más rasgos en una realización con uno o más rasgos en cualquier otra realización pertenecen a la divulgación de la presente solicitud según se archiva.

30 Descripción detallada de la invención

Como se ha mencionado anteriormente, un aspecto de la invención se refiere a un método de desenmascarar una endotoxina en una composición, preferentemente una composición farmacéutica, que comprende un enmascarador de endotoxina y que se sospecha que comprende dicha endotoxina, comprendiendo dicho método las etapas de añadir a dicha composición un modulador capaz de desenmascarar dicha endotoxina, por ejemplo, mediante la liberación de dicha endotoxina, si está presente, de un complejo entre dicha endotoxina y dicho enmascarador de endotoxina, en donde dicho enmascarador de toxina es una sustancia que, en solución con endotoxina, hace a la endotoxina indetectable por métodos de detección disponibles y en donde dicho modulador comprende un primer alifático sustituido con heteroátomos, en donde dicho primer alifático sustituido con heteroátomos es un alcohol alifático que comprende 8 a 16 átomos de carbono. La composición farmacéutica será en la mayoría de los casos una composición acuosa.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método de detección de una endotoxina en una composición, preferentemente una composición farmacéutica, que comprende un enmascarador de endotoxina y que se sospecha que comprende dicha endotoxina, comprendiendo dicho método las etapas de: añadir a dicha composición un modulador capaz de desenmascarar dicha endotoxina, por ejemplo, mediante la liberación de dicha endotoxina, si está presente, de un complejo entre dicha endotoxina y dicho enmascarador de endotoxina; y detectar dicha endotoxina por medio de un método de detección, en donde dicho enmascarador de toxina es una sustancia que, en solución con endotoxina, hace a la endotoxina indetectable por métodos de detección disponibles y en donde dicho modulador comprende un primer alifático sustituido con heteroátomos, en donde dicho primer alifático sustituido con heteroátomos es un alcohol alifático que comprende 8 a 16 átomos de carbono. La composición farmacéutica será en la mayoría de los casos una composición acuosa.

Endotoxina

El término "endotoxina" se refiere a una molécula producida en la superficie de bacterias en particular bacterias gramnegativas, que son bacterias que, debido a su delgada capa de peptidoglucano en sándwich entre una membrana celular interna y una membrana externa bacteriana, no retienen el tinte cristal violeta usado en el método de tinción de Gram de diferenciación bacteriana y por lo tanto evaden la detección positiva por este método. Específicamente, las endotoxinas son sustancias biológicamente activas presentes en la membrana externa de las bacterias gramnegativas. Una clase común de endotoxinas son los lipopolisacáridos (LPS). Para los fines de la presente solicitud, los términos "endotoxina" y "LPS" se utilizan intercambiamente. Como se analiza en otra parte en el presente documento, sin embargo, se entiende que existen diferentes tipos de LPS, por ejemplo, derivados de distintas fuentes, y que los términos "endotoxina" y "LPS" pretenden abarcar estos tipos diferentes de LPS. Las endotoxinas se localizan en la superficie de las bacterias y, junto con las proteínas y los fosfolípidos, forman la membrana bacteriana externa. En general, el LPS está hecho de 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 central y el polisacárido O-específico (M.A. Freudenberg, C. Galanos, Bacterial Lipopolysaccharides: Structure, Metabolism and Mechanisms of Action, Intern. Rev. Immunol.6,1990).

5 El lípido A es altamente hidrófobo y es la parte endotóxicamente activa de la molécula. El lípido A está compuesto típicamente por un disacárido beta-D-GlcN-(1-6)-alfa-D-GlcN que lleva dos grupos fosforilo. Se fijan hasta cuatro cadenas acilo a esta estructura. Estas cadenas pueden a su vez estar sustituidas por ácidos grasos adicionales, que pueden variar considerablemente entre especies en su naturaleza, su número, su longitud, su orden y su saturación.

10 Covalentemente fijada al lípido A está la sección central de la molécula que puede en sí misma dividirse formalmente en núcleo interno y externo. El núcleo interno está próximo al lípido A y contiene azúcares inusuales tales como ácido 3-desoxi-D-manno-octulosónico (KDO). El núcleo externo se extiende desde la superficie bacteriana y consiste más probablemente en azúcares más comunes tales como hexosas y hexosaminas. Sobre esto se fija, en la mayoría de los casos, un polímero de subunidades de sacárido de repetición denominadas el O-polisacárido,

15 también compuesto típicamente por azúcares comunes. Este O-polisacárido no es ubicuo, sin embargo, ya que se ve que está truncado o carente en un número de cepas gramnegativas. Además, ciertas cepas llevan mutaciones en los locus bien conservados de otra manera y se denominan "mutantes duros" para diferenciarlos de las cepas "suaves" de tipo silvestre que expresan LPS que lleva O-polisacárido (C. Erridge, E. Bennett-Guerrero, I. Poxton, Structure and function of lipopolysaccharides, Microbes and Infection, 2002). Puede encontrarse información copiosa con respecto a las endotoxinas, por ejemplo el LPS, así como su impacto en 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.

Enmascarador de endotoxina

25 La frase "enmascarador de endotoxina" se refiere a una sustancia que, en solución con la endotoxina, hace a la endotoxina indetectable por métodos de detección disponibles, por ejemplo, mediante ensayos de lisado de amebocito de limulus (LAL). Típicamente, la endotoxina es detectable cuando existe en solución en forma agregada, es decir, en una forma en donde múltiples, o al menos dos restos de endotoxina, se mantienen juntos en proximidad espacial por interacciones no covalentes tales como interacciones electrostáticas, interacciones hidrófobas, interacciones de Van der Waals o cualquier combinación de las mismas. Sin embargo, la endotoxina se vuelve significativamente menos activa (indetectable) como se mide por sistemas de detección comunes, es decir, está enmascarada, cuando su estado de agregación activo se cambia de tal manera que la endotoxina se vuelve solubilizada como moléculas individuales de endotoxina. Puede asumirse que las entidades moleculares discretas de endotoxina se estabilizan, por ejemplo, mediante los detergentes presentes en solución. Se asume que tales detergentes estabilizan restos de endotoxina individuales formando micelas de detergente en donde los restos de endotoxina individuales se vuelven embebidos y ya no son capaces de reaccionar con el Factor C en ensayos de endotoxina disponibles en el mercado. Ciertas proteínas también pueden efectuar o contribuir a la estabilización de la endotoxina en una forma soluble indetectable. Por ejemplo, tales proteínas pueden presentar la endotoxina con

30 hendaduras de unión ofreciendo a moléculas de endotoxina individuales un ambiente adecuado para la unión estable, rompiendo de esta manera los agregados de endotoxina de otra manera detectables y/o previniendo que las moléculas de endotoxina interactúen con el Factor C en ensayos de endotoxina disponibles.

45 Se asume que al menos dos moléculas de endotoxina, esto es al menos dos moléculas de LPS, deben formar un agregado para ser detectables por los ensayos de endotoxina disponibles en el mercado tales como el kit de ensayo EndoLISA® disponible de Hyglos GmbH y ensayos basados en LAL.

De hecho, varias publicaciones muestran que los agregados de endotoxina son significativamente más biológicamente activos que las endotoxinas no agregadas (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). Adicionalmente, 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, como se ha mencionado 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.

60 Los ejemplos de enmascaradores de endotoxina que son detergentes incluyen detergentes aniónicos, detergentes catiónicos, detergentes no iónicos y detergentes anfotéricos y cualquier combinación de los mismos.

Los ejemplos de detergentes aniónicos que pueden funcionar como enmascaradores de endotoxinas detergentes en el sentido de la invención incluyen sulfatos de alquilo tales como por ejemplo lauril sulfato amónico o lauril sulfato sódico (SDS); alquil-éter sulfatos tales como por ejemplo laureth sulfato sódico o mireth sulfato sódico; sulfato de colesterol; sulfonatos tales como por ejemplo dodecilbencensulfonato, sodiolauril sulfoacetato o xilen sulfonato; alquil

sulfo succinatos tales como por ejemplo lauril sulfosuccinato disódico; sulfóxidos tales como por ejemplo dodecil metil sulfóxido; fosfatos tales como por ejemplo trilaureth-4 fosfato; y carboxilatos tales como por ejemplo estearato sódico o lauroil sarcosinato sódico.

- 5 Algunos ejemplos de detergentes catiónicos que pueden funcionar como enmascaradores de endotoxina 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 cetil trimetilamonio (CTAB) o cloruro de cetil trimetilamonio (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).

15 Los detergentes no iónicos que pueden funcionar como enmascaradores de endotoxina detergentes en el sentido de la invención incluyen alquil ésteres de polioxietilén sorbitán (polisorbatos) tales como por ejemplo polisorbato 20 (Tween-20), polisorbato 40, polisorbato 60 o polisorbato 80 (Tween-80); alquil ésteres de polioxietilenglicol; alquil éteres de polioxipropilenglicol; alquil éteres de glucósido; octilfenol éteres de polioxietilenglicol; alquilfenol éteres de polioxietilenglicol; alquil ésteres de glicerol; alquil ésteres de sorbitán; copolímeros en bloque de polietilenglicol y polipropilenglicol; cocamida MEA; esteroides tales como por ejemplo colesterol; ciclodextranos; poloxámeros tales como por ejemplo polímeros en 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.

20 Algunos detergentes anfóteros que pueden funcionar como enmascaradores de endotoxina detergentes en el sentido de la invención incluyen CHAPS (3-[(3-Colamidopropil)dimetilamonio]-1-propansulfonato); sultainas, tales como por ejemplo cocamidopropil hidroxisultainá; 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⁺Q⁻, en donde R³ es alquilo C₈-C₁₈, alquenilo C₈-C₁₈ o alquinilo C₈-C₁₈; y lecitina. Específicamente, R³ en la fórmula general anterior R³N⁺O⁻ 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.

25 Alternativamente o además de cualquiera de los enmascaradores de endotoxina indicados anteriormente (solos o en combinación), el enmascarador de endotoxina también puede ser un ingrediente farmacéutico activo (Active Pharmaceutical Ingredient, API). Este API puede existir en solución junto con o sin ninguno de los enmascaradores de endotoxina detergentes indicados anteriormente. Si el API existe junto con un enmascarador de endotoxina detergente en solución, el efecto enmascarador puede ser más pronunciado y pueden ser necesarias medidas más rigurosas para liberar la endotoxina enmascarada del enmascarador de endotoxina, como se analiza en más detalle a continuación. Los API que pueden engendrar o aumentar especialmente el enmascaramiento de endotoxinas presentes en la solución son API de proteínas, 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 de proteína es un fragmento de anticuerpo, el fragmento de anticuerpo puede elegirse preferentemente del grupo que consiste en: Fab; un Fab'; un F(ab')₂; un Fv; un anticuerpo de cadena única; y cualquier combinación de los mismos. Cuando el API de proteína es un anticuerpo, el anticuerpo puede elegirse preferentemente del grupo que consiste en: un anticuerpo completamente humano; un anticuerpo antiidiotípico; un anticuerpo humanizado; un anticuerpo biespecífico; un anticuerpo quimérico; un anticuerpo de CDR injertada; un anticuerpo monoclonal; un anticuerpo policlonal; y cualquier combinación de los mismos.

30 En general, un enmascarador de endotoxina, ya sea un detergente o una proteína, tendrá la característica de desplazar el equilibrio entre la endotoxina solubilizada y agregada en la dirección de la endotoxina solubilizada que no es detectable por las pruebas de endotoxinas disponibles. Es este desplazamiento de endotoxina hacia una forma indetectable lo que se denomina "enmascaramiento" en el presente documento. Como se ha mencionado anteriormente, la forma en que la endotoxina está solubilizada puede incluir por ejemplo endotoxina a) que está embebida en la capa lipídica de una micela formada por un detergente; b) que está unida sobre o en una proteína, por ejemplo en una hendidura de unión adecuada de un ambiente estérico y electrostático apropiado formado en la superficie de un agente farmacéutico activo, por ejemplo, una proteína; o c) que participa en una combinación de estas dos posibilidades. Independientemente de la forma en que la endotoxina se solubiliza de tal manera que desfavorezca energéticamente la forma agregada, sin embargo, el efecto neto es que las moléculas individuales de endotoxina que de otra manera estarían agregadas y por lo tanto detectables, se estabilizan individualmente y, en esta forma individualizada (solubilizada), se vuelve y se mantiene indetectable, es decir, enmascarada.

35 Aunque indetectable, sin embargo, tales moléculas de endotoxina estabilizadas en solución pueden sin embargo engendrar y/o contribuir a las clases de reacciones pirogénicas y/o tóxicas indicadas anteriormente cuando se administran a sujetos. Este peligro es especialmente agudo en formulaciones farmacéuticas, ya que las formulaciones farmacéuticas a menudo contienen un detergente para solubilizar un API, por ejemplo, un API de proteína, que, sin el detergente, serían insolubles a las concentraciones proporcionadas en la formulación farmacéutica. Al hacer soluble el API, por ejemplo, un API de proteína, al incluir el detergente, entonces, uno a

menudo destruye inconscientemente la agregación de endotoxina que es muy necesaria para la detección de esta endotoxina. Por lo tanto, cuando el enmascarador de endotoxina es un detergente, la medida muy empleada para formular el API, por ejemplo, un API de proteína, en forma y concentración aceptables también tiene el potencial de enmascarar la endotoxina en solución.

5 Como se ha mencionado anteriormente el enmascarador de endotoxina también puede ser una proteína, por ejemplo el propio API. Este escenario puede surgir junto con la presencia de un enmascarador de endotoxina detergente o, en el caso en que no haya detergente presente, también puede surgir en ausencia de un enmascarador de endotoxina detergente. En este último caso, el API, en particular un API de proteína, puede ofrecer a la endotoxina un ambiente suficiente para la unión estable sobre o en tal proteína de tal manera que la endotoxina se enmascare por el API solo, es decir, sin que sea necesario ningún detergente para enmascarar la endotoxina, haciéndola indetectable. En el caso en que el enmascarador de endotoxina sea una proteína, esta proteína puede ser el propio API o puede alternativa o adicionalmente ser una proteína en solución que es diferente del API. En general, cualquier proteína que tenga un ambiente estérico y electrostático apropiado para estabilizar moléculas individuales de endotoxina, por ejemplo moléculas individuales de LPS podría efectuar o contribuir potencialmente al enmascaramiento de endotoxina.

En los escenarios del tipo descrito anteriormente, las moléculas individuales de endotoxina que de otra manera se mantendrían en agregados y por lo tanto serían detectables, se estabilizan en una o más tales localizaciones de superficie o en dicha proteína. Como es el caso para las micelas de detergente, tal estabilización desplaza el equilibrio existente entre solubilizada (indetectable) y agregada (detectable) en dirección de la endotoxina solubilizada (indetectable). Como se ha mencionado anteriormente, uno puede imaginar tal desplazamiento de equilibrio hacia la forma solubilizada (indetectable) estando especialmente pronunciada en el caso en que una solución comprenda tanto detergente como una o más proteínas con las características anteriores, ya que en tales casos la estabilización de moléculas individuales de endotoxina fuera de su forma agregada por el enmascarador de endotoxina puede asegurar tanto en forma de estabilización en micelas así como en la superficie de proteínas. En tales escenarios, pueden requerirse medidas más rigurosas para desplazar dicho equilibrio hacia la endotoxina agregada que es entonces detectable. Estas se analizan con más detalle en el contexto de escenarios ilustrativos adicionales a continuación (Figura 1-6).

30 Modulador

El término "modulador" como se usa en el presente documento se refiere a uno o más compuestos que, solos o en concierto, hace(n) a una endotoxina enmascarada susceptible a detección mediante una prueba de endotoxina (tales como la prueba de detección EndoLISA® disponible de Hyglos GmbH). El modulador comprende un primer alifático sustituido con heteroátomos, en donde dicho primer alifático sustituido con heteroátomos es un alcohol alifático que comprende 8 a 16 átomos de carbono. El término "modulador" como se usa en el presente documento puede abarcar tanto componentes únicos como múltiples que logren este fin. En algunos casos a continuación en el presente documento, se hace referencia a un "sistema modulador", aunque el término "modulador" a veces se usa para designar sustancias moduladoras múltiples que pretenden trabajar en concierto. Esto se refiere a un modulador multi-componente que comprende múltiples sustancias que actúan en concierto para hacer a una endotoxina enmascarada detectable por una prueba de endotoxina. Los diferentes componentes de un sistema modulador pueden incorporarse por diferentes razones, es decir, para tomar ventaja de diferentes funciones de sustancias moduladoras que afectan a la estabilidad de un complejo entre la endotoxina y el enmascarador de endotoxina de formas diferentes. Por facilidad de referencia, uno puede referirse por ejemplo a diferentes clases de modulador que pueden emplearse solos o juntos para enmascarar la endotoxina:

- 50 • "Modulador de interrupción": Un modulador de interrupción es un modulador que rompe completa o parcialmente un complejo entre un enmascarador de endotoxina y una endotoxina. Cuando el enmascarador de endotoxina es un detergente y la endotoxina se enmascara en forma solubilizada insertada en la capa lipídica de una micela detergente enmascarante, entonces un modulador que rompe una micela detergente tal para liberar la endotoxina se denominaría un modulador de interrupción. Como se analiza en más detalle a continuación, 1-dodecanol es un modulador de interrupción tal. Un modulador de interrupción, por ejemplo 1-dodecanol, ácido 1-decanoico u octilsulfato sódico (SOS) puede usarse ventajosamente en un intervalo de concentración de 0,01-100 mM, preferentemente en un intervalo de concentración de 0,1 - 10 mM, preferentemente a una concentración de 10 mM en el proceso de desenmascaramiento. En algunos casos, el modulador de interrupción también puede funcionar simultáneamente como un modulador de reconfiguración, descrito a continuación.
- 60 • "Modulador de adsorción": Un "modulador de adsorción" es un modulador que tiene la capacidad de unir sustancias que de otra manera estabilizan la endotoxina en forma solubilizada y por lo tanto no detectable. Por ejemplo, cuando el enmascarador de endotoxina es un detergente como, por ejemplo, contenido en algunas composiciones farmacéuticas, entonces un modulador que une moléculas del detergente y de esta manera contribuye a la ruptura de las micelas estabilizantes de endotoxina se denominaría un modulador de adsorción. Como se analiza en más detalle a continuación, BSA es un modulador de adsorción tal. Un modulador de adsorción, por ejemplo BSA puede usarse ventajosamente en un intervalo de concentración de

0,1-20 mg/ml, preferentemente en un intervalo de concentración de 1-10 mg/ml, preferentemente a una concentración de 10 mg/ml en el proceso de desenmascaramiento.

- 5 • "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 endotoxina. Por ejemplo, cuando el enmascarador de endotoxina es una proteína y la endotoxina está 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 denominaría un modulador de desplazamiento. Como se analiza en más detalle a continuación, SDS es un modulador de desplazamiento tal. Un modulador de desplazamiento, por ejemplo SDS puede usarse ventajosamente en un intervalo de concentración del 0,01-1 % en peso, preferentemente en un intervalo de concentración del 0,05-0,5 % en peso, preferentemente en un intervalo de concentración del 0,02-0,2 % en peso, preferentemente a una concentración del 0,1 % en peso en el proceso de desenmascaramiento.
- 15 • "Modulador de reconfiguración": Un "modulador de reconfiguración" es un modulador que tiene la capacidad de estabilizar transitoriamente la endotoxina después de su liberación del enmascarador de endotoxina (por ejemplo, mediante un modulador de interrupción o un modulador de desplazamiento, como se analiza anteriormente), ayudando de esta manera a que la endotoxina liberada, solubilizada (indetectable) adopte una forma agregada (detectable). Con la ayuda del modulador de reconfiguración, la endotoxina solubilizada se vuelve reconfigurada como endotoxina agregada. Como se analiza en más detalle a continuación, 1-dodecanol es un modulador de reconfiguración tal. Un modulador de reconfiguración, por ejemplo 1-dodecanol, ácido 1-decanoico u octilsulfato sódico (SOS) puede usarse ventajosamente en un intervalo de concentración de 0,01-100 mM, preferentemente en un intervalo de concentración de 0,1 - 10 mM en el proceso de desenmascaramiento. En algunos casos, el modulador de reconfiguración también puede funcionar simultáneamente como un modulador de interrupción, descrito anteriormente.

30 Como estará claro en el presente documento a continuación, los tipos anteriores de modulador no son mutuamente exclusivos; es decir, es posible para una sustancia dada que tenga funcionalidad como diferentes clases de moduladores anteriores. Un ejemplo es 1-dodecanol, que puede clasificarse tanto como un modulador interruptor (rompiendo una micela de detergente) así como un modulador de reconfiguración (estabilizando transitoriamente la endotoxina liberada de la micela de tal manera que pueda agregarse y volverse detectable). Similarmente el SDS puede clasificarse como un modulador de interrupción (rompiendo micelas existentes de otro detergente distinto de SDS) y un modulador de desplazamiento (liberando la endotoxina de los sitios de unión en o sobre cualquier proteína de enmascaramiento que pueda estar presente). La clasificación según el tipo de modulador depende de la función que una sustancia en cuestión juega en una composición particular. Sin embargo, ya que se asume que se requerirá generalmente la reconfiguración de la endotoxina de forma solubilizada en agregada para hacer a la endotoxina detectable, el modulador normalmente comprenderá al menos un componente calificado como un "modulador de reconfiguración".

40 Como un ejemplo adicional, una sustancia que funciona como un "modulador de desplazamiento" cuando el enmascarador de endotoxina es una proteína puede funcionar en algunos casos como un "modulador de interrupción" cuando el enmascarador de endotoxina es un detergente. El SDS es un ejemplo de una sustancia tal, la clasificación del cual según el tipo de componente modulador depende de las condiciones prevalentes. Por ejemplo, cuando el enmascarador de endotoxina es una proteína, el SDS funcionará generalmente como un modulador de desplazamiento, ya que ayuda a desplazar la endotoxina unida en o sobre la proteína de enmascaramiento. Sin embargo, cuando el enmascarador de endotoxina es un detergente, entonces el SDS, solo o junto con otro componente modulador, puede funcionar más como un modulador de interrupción, ya que en este caso promueve la liberación de endotoxina de la capa lipídica de micelas de detergente rompiendo las micelas.

50 Un modulador puede contener una o más sustancias dentro de las clasificaciones anteriores. Por ejemplo, un modulador mono-componente puede comprender solamente un modulador de interrupción tal como 1-dodecanol. Un modulador de componente dual puede comprender una mezcla de un modulador de interrupción tal como 1-dodecanol (también posiblemente funcionando como un modulador de reconfiguración) y, dependiendo de la naturaleza del complejo de enmascaramiento entre la endotoxina y el enmascarador de endotoxina, uno de un modulador de adsorción tal como BSA o un modulador de desplazamiento tal como SDS. Un modulador multi-componente puede comprender una mezcla de un modulador de interrupción tal como 1-dodecanol (también posiblemente funcionando como un modulador de reconfiguración) y, dependiendo de la naturaleza del complejo de enmascaramiento entre la endotoxina y el enmascarador de endotoxina, uno de cada de un modulador de adsorción tal como BSA y un modulador de desplazamiento tal como SDS. Como se analizará en detalle a continuación, la complejidad del sistema modulador elegido dependerá de la naturaleza del complejo entre la endotoxina y el enmascarador de endotoxina y las condiciones de solución circundantes que contribuyen a la estabilidad de ese complejo. A partir de lo anterior, está claro que cada nueva composición a analizarse para la presencia de endotoxina puede requerir su propia composición de modulador customizada para hacer a la endotoxina enmascarada susceptible a detección. La identificación de un modulador adecuado para una composición o formulación dadas a ensayarse puede lograrse sin embargo por experimentación rutinaria, como se mostrará

adicionalmente a continuación.

Como se ha mencionado anteriormente, en su sentido más general, se asume que el modulador desestabiliza un complejo entre la endotoxina y un enmascarador de endotoxina y que promueve la liberación de la endotoxina del enmascarador de endotoxina. De este modo, el modulador o el sistema modulador desplazan eficazmente el equilibrio desde un estado solubilizado (indetectable) hacia un estado agregado (detectable).

Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que la endotoxina que está presente pero indetectable en solución se mantiene indetectable porque, como se asume, la endotoxina se mantiene establemente solubilizada en micelas de detergente y/o unida a estructuras de superficie de proteínas presentes en la solución. Estabilizadas individualmente en esta forma, las moléculas de endotoxina evaden la detección. Sin embargo, los presentes inventores han descubierto que las condiciones de solución pueden manipularse de tal manera que la endotoxina solubilizada se vuelva en una forma que pueda detectarse. En algunos casos, pueden requerirse múltiples manipulaciones de las condiciones de solución para alcanzar este fin y la rigurosidad de la medida o medidas tomadas para efectuar el desplazamiento en el equilibrio deseado hacia un estado agregado variarán dependiendo del grado en que el enmascarador de endotoxina estabilice la endotoxina en forma solubilizada, como se ha mencionado anteriormente. Pero generalmente, las manipulaciones realizadas de acuerdo con la invención como se describe en el presente documento deben entenderse en el contexto del objeto global de desplazar el equilibrio de la endotoxina de un estado solubilizado a un estado agregado de tal manera que pueda detectarse.

Para lograr lo anterior, el "modulador" incluirá un primer alifático sustituido con heteroátomos, en donde dicho primer alifático sustituido con heteroátomos es un alcohol alifático que comprende 8 a 16 átomos de carbono. Esta especie es una molécula anfífila que compite por la unión entre el componente lipídico de endotoxina y el enmascarador de endotoxina, debilitando de esta manera la interacción entre el primero y el último. Tal unión competitiva se logrará generalmente proporcionando al menos un componente del sistema modulador en una forma que es estructuralmente similar al componente lipídico (anfífilo) de la endotoxina de tal manera que el primero puede desplazar al último en su interacción estabilizada con el enmascarador de endotoxina.

Por ejemplo, en el caso que el enmascarador de endotoxina sea un detergente, un modulador de interrupción que comprende un alcohol alifático que comprende 8 a 16 átomos de carbono incluirá generalmente un compuesto anfífilo capaz de insertarse establemente, es decir, entre las moléculas de detergente anfífilas y la porción lipídica similarmente anfífila de la endotoxina. Cuando el enmascarador de endotoxina es un detergente, un modulador de interrupción anfífilo tal provocará por lo tanto varios efectos en paralelo que conducen a un desplazamiento global en el equilibrio de una forma solubilizada hacia una agregada de endotoxina. En primer lugar, proporcionar un sistema modulador que comprende al menos un modulador de interrupción anfífilo (como anteriormente) interrumpe las interacciones lipófilas que subyacen a las micelas de detergente de tal manera que estas micelas se rompen. Ya que la endotoxina se solubilizó previamente (y por lo tanto se enmascaró) por la inserción de este componente lipídico en la capa lipídica de las micelas de detergente, la ruptura de las micelas retira esta fuerza estabilizante y da como resultado la liberación de la endotoxina previamente embebida. El papel del modulador de interrupción en el caso que el enmascarador de endotoxina sea o incluya un detergente es romper de esta manera las micelas de detergente.

Además, el carácter anfífilo del anterior modulador de interrupción también puede permitirle asociarse al componente lipídico de la endotoxina, una vez que la endotoxina se libera de sus micelas de detergente como se describe anteriormente. Esta interacción entre el modulador de interrupción anfífilo anterior y el componente lipídico de la endotoxina tiene el efecto de chaperonar la endotoxina en solución acuosa siguiendo su liberación de las micelas de detergente estabilizantes. En este caso, el modulador de interrupción anterior tendría una doble función como un modulador de reconfiguración. Ya que el modulador de interrupción es anfífilo en carácter, no se excluye que pueda ser capaz de formar micelas por sí mismo. Sin embargo, el efecto desenmascarante será generalmente el más grande cuando el modulador de interrupción anfífilo no forme micelas por sí mismo lo que podría sencillamente intercambiar un estado de endotoxina solubilizada y por lo tanto enmascarada por otro. Un papel clave del modulador de reconfiguración es estabilizar transitoriamente la endotoxina liberada (aunque menos que en su complejo anterior con el enmascarador de endotoxina), chaperonando eficazmente la endotoxina en un estado agregado y por lo tanto detectable.

De esta manera temporalmente chaperonada en solución, la endotoxina liberada es después libre de agregarse en una forma que sea detectable por lo tanto "desenmascarada". Si es o no necesaria manipulación adicional de las condiciones de solución 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 solución y de la estabilidad inicial de la endotoxina en complejo con el enmascarador de endotoxina.

En otro escenario ya contemplado anteriormente, el enmascarador de endotoxina no es, o no solamente, un detergente, pero también puede ser o comprender una proteína con hendiduras de unión en su superficie adecuadas para unir establemente restos individuales de endotoxina de tal manera que no pueda detectarse. En este caso, se aplican consideraciones similares que pertenecen a la aplicación del modulador como se ha expuesto anteriormente. Por ejemplo, el uso de un modulador de interrupción (anfífilo) y/o un modulador de desplazamiento en el caso que la

endotoxina sea o comprenda una proteína tiene el efecto de que el modulador interrumpe las interacciones lipófilas existentes entre las cadenas laterales de aminoácidos lipófilos de la proteína (enmascarador de endotoxina) y el componente lipídico de la endotoxina. Debido a que el modulador de interrupción y/o el modulador de desplazamiento es/son anfífilos por carácter, el modulador o moduladores también serían capaces de interrumpir interacciones electrostáticas existentes entre las cadenas laterales polares y/o ionizadas dentro de la proteína (enmascarador de endotoxina) y los grupos polares dentro de las regiones del núcleo y/o el O-antígeno del polisacárido de la endotoxina. Con estas interacciones estabilizantes interrumpidas, la endotoxina que estaba previamente enmascarada por un enmascarador de endotoxina de proteína de esta manera se desplaza desde su complejo previo con la proteína y se chaperona en solución en un estado agregado mediante la asociación con un modulador de reconfiguración como se describe anteriormente.

Como se describe anteriormente para el caso en donde el enmascarador de endotoxina es un detergente en ausencia de un enmascarador de endotoxina de proteína, la endotoxina liberada y chaperonada por el modulador de reconfiguración es después libre de agregarse en una forma que sea detectable y por lo tanto "desenmascarada". Si es o no necesaria manipulación adicional de las condiciones de solución más allá de la adición de los componentes del sistema modulador para desplazar el equilibrio hacia esta forma agregada, detectable de la endotoxina dependerá generalmente de las condiciones que prevalecen en la solución y de la estabilidad inicial de la endotoxina en complejo con el enmascarador de endotoxina.

El modulador, por ejemplo, el modulador de interrupción, el modulador de desplazamiento y/o el modulador de reconfiguración comprenden un primer alifático sustituido con heteroátomos, en donde el primer alifático sustituido con heteroátomos es un alcohol alifático y en donde la cadena principal del primer alifático sustituido con heteroátomos comprende de 8 a 16 átomos de carbono. Como se usa en el presente documento, la expresión "cadena principal" se refiere a la cadena más larga del primer alifático sustituido con heteroátomos que comprende 8 a 16 átomos de carbono, según se numeran por la nomenclatura de la normativa IUPAC. Específicamente, la cadena principal del primer alifático sustituido con heteroátomos puede comprender 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 átomos de carbono. Como se ha mencionado anteriormente, el primer alifático sustituido con heteroátomos es un alcohol alifático, en particular, 1-dodecanol, que es la molécula dada por la fórmula $\text{HO}-(\text{CH}_2)_{11}-\text{CH}_3$. Como se ha mencionado anteriormente, el 1-dodecanol es especialmente bien adecuado en muchos casos como un modulador de interrupción así como, en muchos si no en todos los casos, como un modulador de reconfiguración.

El modulador de reconfiguración se asume que juega un papel especialmente importante, si no indispensable, promoviendo una forma agregada detectable de la endotoxina. El modulador de reconfiguración puede ser un alifático sustituido con heteroátomos que comprende 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 átomos de carbono en su cadena principal. La expresión "cadena principal" se refiere a la cadena más larga del modulador de reconfiguración, según se numeran por la nomenclatura de la normativa IUPAC. Como se usa en el presente documento, el término "heteroátomo" se refiere a cualquier átomo distinto de carbono, al que se une covalentemente un átomo de carbono en el primer alifático sustituido con heteroátomos. Los heteroátomos representativos incluyen átomos de oxígeno, nitrógeno y azufre. Es especialmente adecuado cuando el heteroátomo es oxígeno. Adicionalmente, el modulador de reconfiguración puede estar ramificado o no ramificado, comprendiendo las variantes ramificadas sustituciones a lo largo de la "cadena principal" como se define 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 alqueno C_8 , alqueno C_9 , alqueno C_{10} , alqueno C_{11} , alqueno C_{12} , alqueno C_{13} , alqueno C_{14} , alqueno C_{15} o alqueno C_{16} ; o un resto alquino C_8 , alquino C_9 , alquino C_{10} , alquino C_{11} , alquino C_{12} , alquino C_{13} , alquino C_{14} , alquino C_{15} o alquino C_{16} . Adicionalmente, el modulador de reconfiguración puede contener cualquier mezcla de enlaces sencillos, dobles y triples carbono-carbono. Los 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} . Los moduladores de reconfiguración especialmente adecuados comprenden alquilo C_{12} . Adicionalmente, el heteroátomo puede ser de diversos estados de oxidación. Por ejemplo, cuando el heteroátomo es oxígeno, el oxígeno puede estar en forma de un alcohol, como un aldehído o un ácido carboxílico. Son especialmente adecuadas como moduladores de reconfiguración las moléculas en alcanos no ramificados, en particular 1-alcanos no ramificados. Entre estos, son especialmente adecuados los alcanos C_{12} , especialmente 1-dodecanol que tiene la fórmula $\text{HO}-(\text{CH}_2)_{11}-\text{CH}_3$.

En realizaciones adicionales, el sistema modulador puede incluir otros componentes además de dicho primer alifático sustituido con heteroátomos que comprende 8 a 16 átomos de carbono. Por ejemplo, el sistema modulador puede comprender adicionalmente un segundo alifático sustituido con heteroátomos, por ejemplo, como un modulador de interrupción, un modulador de desplazamiento y/o un modulador de reconfiguración, en donde la cadena principal de dicho segundo alifático sustituido con heteroátomos comprende 8 a 16 átomos de carbono. La "cadena principal" del segundo alifático sustituido con heteroátomos se define como se describe anteriormente para el primer alifático sustituido con heteroátomos. Específicamente, la cadena principal del segundo alifático sustituido con heteroátomos puede comprender 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 átomos de carbono. El primer alifático sustituido con heteroátomos que comprende 8 a 16 átomos de carbono es diferente del segundo alifático sustituido con heteroátomos que comprende 8 a 16 átomos de carbono. En una realización preferida, el segundo alifático

sustituido con heteroátomos que puede ser parte del modulador es un alifático sustituido con oxígeno. En ciertas realizaciones preferidas, este alifático sustituido con oxígeno es un sulfato alifático, en donde se prefiere especialmente que este sulfato alifático sea dodecil sulfato sódico (SDS). Por lo tanto, en una realización particularmente preferida de la invención, el sistema modulador incluye un primer alifático sustituido con heteroátomos que es 1-dodecanol (por ejemplo, como un modulador de interrupción y/o un modulador de reconfiguración) y un segundo alifático sustituido con heteroátomos que es SDS (como un modulador de interrupción y/o un modulador de desplazamiento adicionales).

En una realización adicional, el sistema modulador como se describe anteriormente puede comprender además una proteína capaz de unirse a un detergente de tal manera que rompa las micelas formadas por dicho detergente. En general, el detergente unido será el enmascarador de endotoxina (cuando dicho enmascarador de endotoxina es o comprende un detergente) y el principio por el cual la proteína capaz de unirse a un detergente une el detergente es análogo al principio descrito anteriormente, de acuerdo con que una proteína que funciona como un enmascarador de endotoxina secuestra porciones de la molécula de endotoxina en o sobre su superficie. En la presente realización, la proteína capaz de unirse a un detergente, cuando se usa como parte del modulador, también lleva en su superficie áreas de compatibilidad estérica y electrostática con una porción o porciones de moléculas de detergente presentes en solución, que son suficientes para unir o secuestrar moléculas de detergente, haciéndolas de esta manera no disponibles para la participación en micelas y rompiendo de esta manera cualquier micela divergente que pueda estar albergando endotoxina, o que pueda servir para desplazar el equilibrio fuera de una forma agregada de endotoxina.

Los inventores han descubierto que las moléculas de albúmina son excepcionalmente buenas uniendo detergente. Por lo tanto, se contempla que además del primer alifático sustituido con heteroátomos solo, o además del primer alifático sustituido con heteroátomos en combinación con el segundo alifático sustituido con heteroátomos, el modulador puede comprender adicionalmente una proteína (modulador de adsorción) capaz de unirse a un detergente de tal manera que rompa las micelas formadas por dicho detergente. En determinadas realizaciones, el componente de proteína del modulador puede ser una albúmina, preferentemente seroalbúmina humana (HSA), seroalbúmina bovina (BSA) u ovoalbúmina (OVA).

Se contempla adicionalmente que el modulador pueda contener uno o más de cada uno del primer alcohol alifático sustituido con heteroátomos que comprende 8 a 16 átomos de carbono, el dicho segundo alifático sustituido con heteroátomos que comprende 8 a 16 átomos de carbono y dicha proteína capaz de unir un detergente de tal manera que rompa 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.

Método de detección

Como se usa en el presente documento, la expresión "método de detección" se refiere a un método que es adecuado para detectar endotoxina en solución. Por ejemplo, los métodos adecuados con respecto a esto son los métodos de detección basados en limulus o es una prueba de inmunoadsorción ligada a enzimas (ELISA). Los métodos de limulus pueden realizarse de forma clásica usando lisado derivado natural (J. Jorgensen, R. Smith, Perparation, Sensitivity, and Specificity of Limulus Lysate for Endotoxin Assay, Applied Microbiology, 1973) o Factor C preparado recombinantemente (J. L. Ding, B. Ho, A new era in pyrogen testing, Trends in Biotechnology, 2001).

Un método de detección adecuado para detectar endotoxina es el método basado en fase sólida. Este es un método en tres etapas. Específicamente, la Endotoxina se captura por una molécula de captura específica de LPS en la superficie de los pocillos de una placa de microtitulación (etapa 1). Después del lavado posterior (etapa 2), la reacción de detección enzimática se lleva a cabo en condiciones óptimas (etapa 3). La ventaja de los métodos basados en fase sólida es la alta rigurosidad contra la interferencia de matriz (H. Grallert, S. Leopoldseder, M. Schuett, P. Kurze, B. Buchberger, EndoLISA: a novel and reliable method for endotoxin detection, Nature methods, 2011). Un sistema basado en fase sólida particularmente adecuado para la detección de endotoxinas es el kit EndoLISA® producido por Hyglos GmbH. EndoLISA® es un ensayo de placa de microtitulación fluorescente de punto final destinado a la determinación cuantitativa *in vitro* de endotoxina en muestras farmacéuticas, biológicas y ambientales. El experto en la materia conoce cómo construir y realizar un ensayo basado en fase sólida de acuerdo con el manual del fabricante. El sistema de detección EndoLISA® se describe por ejemplo en el libro "Pharmazeutische Mikrobiologie - Qualitätssicherung, Monitoring, Betriebshygiene" por Michael Rieth, octubre de 2012, Wiley-VCH, Weinheim, ISBN 978-3-527-33087-4.

Agente que influye en la estabilidad de unión de hidrógeno en solución

De acuerdo con una realización adicional de la invención, los métodos anteriores de desenmascarar una endotoxina y/o el método de detectar una endotoxina pueden comprender además la etapa de añadir a dicha composición un agente que influye en la estabilidad de unión de hidrógeno en solución, que es un agente caotrópico, un catión o una combinación de los mismos. En general, como se usa en el presente documento, un agente que influye en la

estabilidad de unión de hidrógeno en solución, es decir, un agente caotrópico, un catión o una combinación de los mismos, modifica las condiciones de solución de tal manera que desestabiliza el complejo en donde una molécula individual o múltiples moléculas de endotoxina se solubiliza o solubilizan y por lo tanto se enmascaran.

5 No todos los complejos entre endotoxina y enmascarador de endotoxina son los mismos. En particular, el mínimo de energía que gobierna la estabilización de la endotoxina en ciertos complejos de enmascaramiento son diferentes de aquellos que gobiernan la estabilización de la endotoxina en otros complejos de enmascaramiento. Siendo todas las demás cosas iguales, cuanto menor es un mínimo de energía que gobierna la estabilización de endotoxina en un complejo dado con una endotoxina, más difícil será, es decir, más riguroso debe ser el modulador, para liberar la endotoxina de su estado solubilizado. Aunque como se ha mencionado anteriormente, tal liberación es una etapa importante en la agregación final de endotoxina en una forma detectable, es decir, no enmascarada. Por lo tanto, cuanto más estable es el complejo entre la endotoxina y el enmascarador de endotoxina, más rigurosas deben ser las medidas tomadas para desenmascarar en última instancia la endotoxina.

15 En casos donde el complejo entre la endotoxina y el enmascarador de endotoxina es especialmente estable, la adición de un modulador mono-componente o incluso multi-componente puede a veces no ser necesario para desestabilizar el complejo enmascarante y liberar la endotoxina. Puede en tales casos ser de ayuda promover la liberación de endotoxina de su complejo con enmascarador de endotoxina ajustando las condiciones de solución para desestabilizar el complejo endotoxina-enmascarador de endotoxina.

20 Como se ha mencionado anteriormente, un agente que influye en la estabilidad de unión de hidrógeno en solución, es decir, un agente caotrópico, un catión o una combinación de los mismos, puede ayudar en este objeto. Algo, si no la mayoría de la estabilización de endotoxina en complejo con un enmascarador de endotoxina surge normalmente de las interacciones no covalentes entre el resto de endotoxina y el enmascarador de endotoxina. Estas interacciones pueden por ejemplo tomar la forma de interacciones hidrófobas, iónicas, de uniones de hidrógeno y/o de Van der Waals entre regiones de la molécula de endotoxina y regiones sobre la molécula o moléculas del enmascarador de endotoxina. Ya que la resistencia de estas interacciones endotoxina-enmascarador de endotoxina está influenciada por la red de uniones de hidrógeno circundantes en solución, inversamente sigue que influir en la estabilidad de uniones de hidrógeno en solución modulará la resistencia de estas interacciones. La adición de un agente que influya en la estabilidad de unión de hidrógeno en solución, es decir, un agente caotrópico, un catión o una combinación de los mismos, puede por lo tanto ayudar a debilitar las interacciones de uniones no covalentes entre la endotoxina y el enmascarador de endotoxina, elevando esencialmente la energía libre del complejo y de esta manera haciéndolo más susceptible a la interrupción por el modulador de tal manera que la endotoxina se libere y se haga detectable.

35 Además del efecto de desestabilización analizado anteriormente, un agente que influye en la estabilidad de unión de hidrógeno en solución, es decir, un agente caotrópico, un catión o una combinación de los mismos, también puede tener un efecto adicional promoviendo el desenmascaramiento de endotoxina. Alterando la estabilidad de unión de hidrógeno en solución, el agente también puede fomentar la agregación de los restos de endotoxina una vez liberados de su complejo con el enmascarador de endotoxina. Existirá generalmente un equilibrio entre la endotoxina en formas solubilizada y agregada. El agente que influye en la estabilidad de unión de hidrógeno en solución puede ser de ayuda desplazando este equilibrio hacia la agregada (y de esta manera detectable). Las sustancias adecuadas son aquellas que tenderían a disminuir la estabilidad de unión de hidrógeno en solución que rodea los restos de endotoxina chaperonada y/o los compuestos que tienden a aumentar la fuerza iónica de la solución, dirigiendo de esta manera los restos de endotoxina chaperonados por el modulador de reconfiguración juntos en un agregado lipófilo.

50 Nótese que además puede no siempre ser necesario para añadir un agente que influye en la estabilidad de unión de hidrógeno en solución. Si será o no indicada la adición de un agente tal dependerá, por ejemplo, de la estabilidad de la endotoxina en complejo con el enmascarador de endotoxina y/o la posición de equilibrio entre formas solubilizadas, chaperonadas y agregadas de restos de endotoxina una vez liberadas del enmascarador de endotoxina. Por ejemplo, en soluciones que contienen concentraciones más altas de sal, es concebible que el complejo de la endotoxina y el enmascarador de endotoxina ya pueda ser lo suficientemente inestable para romperse por el modulador de interrupción solo y que los restos de endotoxina presentes en solución después de la liberación del enmascarador de endotoxina serán lo suficientemente estables para formar agregados sin ninguna asistencia adicional. En tales situaciones, un agente que influye en la estabilidad de unión de hidrógeno en solución puede no requerirse para lograr el desenmascaramiento.

60 Por otro lado, pueden existir situaciones, por ejemplo en soluciones que contienen menores concentraciones de sal, donde el complejo de endotoxina-enmascarador de endotoxina puede ser de tal gran estabilidad que un modulador de interrupción solo no puede romperlo para liberar la endotoxina o donde - incluso si se libera por el modulador de interrupción solo - el equilibrio entre la endotoxina solubilizada y agregada se encuentra hacia la forma solubilizada de tal manera que la agregación necesaria para la detección no ocurre. En tales situaciones la incorporación de un agente que influye en la estabilidad de unión de hidrógeno en solución puede ayudar a influir en la energética de la complejación y/o la agregación de tal manera que favorezca la endotoxina en forma detectable.

65

En general, puede decirse que el grado de desestabilización del complejo entre la endotoxina y el enmascarador de endotoxina dependerá de la cantidad de sal en la solución, desestabilizándose este complejo en un grado directamente proporcional a la cantidad de sal presente en solución. Sin embargo como regla general, puede hacerse referencia a la serie de Hofmeister, de acuerdo con la cual cuanto más caotrópica es una sal, menor será la cantidad de tal sal necesaria para desestabilizar un complejo entre endotoxina y enmascarador de endotoxina en un grado dado. Meramente como un ejemplo ilustrativo, para lograr aproximadamente el mismo grado de desestabilización de un complejo entre endotoxina y enmascarador de endotoxina logable con, digamos, 100 mM de CaCl_2 , uno puede necesitar usar, digamos, 500 mM de NaCl . En este ejemplo, el CaCl_2 es más caotrópico que el NaCl , por lo que se requerirá menos CaCl_2 para lograr el mismo grado de desestabilización.

Como se ha mencionado anteriormente, cuando está presente, el agente que influye en la estabilidad de unión de hidrógeno en solución es 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 magnésico, 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+} .

El agente que influye en la estabilidad de unión de hidrógeno en solución, por ejemplo, una sal catiónica divalente, por ejemplo, CaCl_2 , puede usarse ventajosamente en un intervalo de concentración de 1-400 mM, preferentemente en un intervalo de concentración de 10 - 200 mM, preferentemente en un intervalo de concentración de 50 - 100 mM en el proceso de desenmascaramiento.

El agente que influye en la estabilidad de unión de hidrógeno en solución, por ejemplo, un agente caotrópico, por ejemplo, cloruro de guanidinio, puede usarse ventajosamente en un intervalo de concentración de 1 mM - 1 M, preferentemente en un intervalo de concentración de 25 - 200 mM, preferentemente en un intervalo de concentración de 10 - 100 mM en el proceso de desenmascaramiento.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna y meramente para ilustrar los principios y posibles mecanismos que los presentes inventores creen que subyacen al efecto ventajoso observado de desenmascarar endotoxinas en solución, haciendo de esta manera a la endotoxina detectable previamente enmascarada e indetectable, lo siguiente describe varios mecanismos de interacción entre la endotoxina y componentes adicionales de una composición dada que contiene al menos un enmascarador de endotoxina. Para ilustrar estos mecanismos, se hace referencia a las Figuras 1-6.

Desenmascarar endotoxina enmascarada por un enmascarador detergente con un modulador mono-componente, en donde el componente único funciona tanto como un modulador de interrupción como un modulador de reconfiguración

La Figura 1 representa el escenario en donde la endotoxina reside en solución junto con un detergente que la está enmascarando en forma individualizada en una micela de detergente. El panel (a) de la Figura 1 muestra un único resto de endotoxina que se inserta en la capa lipídica de tal micela de detergente a través de su cola lipídica. Las moléculas de detergente que constituyen la capa lipídica de la micela del detergente se simbolizan como círculos abiertos en el panel (a). Debido a que este resto único de endotoxina se inserta establemente en forma individual en la capa lipídica de la micela en lugar de en forma multimérica agregada, evade la detección usando métodos de detección disponibles (por ejemplo, la prueba EndoLISA® de Hyglos GmbH). Si la solución mostrada en el panel (a) de la Figura 1 fuera una formulación farmacéutica que contiene adicionalmente un API, parecería estar libre de endotoxinas y por lo tanto seguro para su administración, incluso aunque esté presente la endotoxina en la solución. Administrar una formulación tal aparentemente libre de endotoxina a un paciente arriesgaría de esta manera sin querer el provocar los tipos de respuestas inmunológicas y tóxicas peligrosas a la endotoxina mencionada anteriormente.

Por encima de las flechas de equilibrio entre los paneles (a) y (b) de la Figura 1, uno ve la adición de un modulador de interrupción y de reconfiguración capaz de liberar la endotoxina de un complejo entre la endotoxina y el enmascarador de endotoxina. En el escenario mostrado en la Figura 1, este "complejo" es la endotoxina embebida, a través de su componente lipídico, en la capa lipídica de una micela de detergente. El modulador de interrupción y de reconfiguración mostrado aquí (una molécula anfífila usada como un modulador mono-componente que tiene la capacidad tanto como modulador de interrupción como de reconfiguración) exhibe las propiedades duales de romper la micela del detergente de tal manera que libere las moléculas insertadas de endotoxina, así como de estabilizar la endotoxina una vez se libera de su complejo con el enmascarador de endotoxina. 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 interrupción y de reconfiguración de tal manera que la molécula de endotoxina pueda existir en forma chaperonada fuera de las micelas una vez estas se rompen por el modulador. La porción inferior del panel (b) deja claro que el modulador de interrupción existe en equilibrio, asociado tanto al resto de endotoxina liberado como al detergente que conformaba previamente la capa lipídica de la micela del detergente antes de la interrupción de las micelas por el modulador de interrupción (y de reconfiguración).

Como se ha mencionado anteriormente, en una realización de la presente invención, el modulador de interrupción y/o de reconfiguración puede ser 1-dodecanol, llevando un resto alcohol polar, seguido de una cola de hidrocarburo saturado de 12 átomos de carbono. Tanto la configuración estérica como electrostática del 1-dodecanol es de esta manera similar a aquella de los restos lipídicos de la endotoxina, de tal manera que el 1-dodecanol puede actuar eficientemente con, y por lo tanto estabilizar, la endotoxina después de que se haya liberado de la micela del detergente.

Otra razón por la que el 1-dodecanol es especialmente adecuado para su uso como modulador de interrupción y/o de reconfiguración es que el 1-dodecanol, aunque anfífilo, no forma micelas. Por lo tanto, una vez que la micela de detergente representada en el panel (a) de la Figura 1 se rompe por el 1-dodecanol, no se reforman nuevas micelas de modulador, que de otra manera podrían reenmascarar la endotoxina desplazando el equilibrio lejos de su forma agregada. La característica del modulador que no forma micelas por sí mismo contribuye a la estabilización de la endotoxina en solución, ayudada por el modulador, como se representa en el panel (b) de la Figura 1. En el escenario representado en la Figura 1, las condiciones de la solución prevalentes hipotéticas son de tal manera que el equilibrio entre los restos chaperonados de endotoxina mostrados en el panel (b) y la endotoxina agregada mostrada en el panel (c) ya caen en la dirección del agregado del panel (c). Con la forma agregada de la endotoxina favorecida, la endotoxina ya está en, o predominantemente en una forma agregada que es susceptible de detección por medios conocidos, por ejemplo, el kit de ensayo EndoLISA® de Hyglos GmbH.

Globalmente, entonces, la Figura 1 muestra la transición desde restos de endotoxina individuales (solubilizados) que se insertan establemente y por lo tanto se enmascaran por las micelas de detergente a un escenario en donde los restos individuales de endotoxina se han agregado para volverse detectables. La endotoxina previamente enmascarada en el panel (a) se ha desenmascarado en el panel (c), permitiendo de esta manera que uno determine que una solución que se pensó previamente que estaba libre de endotoxina realmente contiene este contaminante.

Desenmascarar endotoxina enmascarada por un enmascarador detergente con un modulador de componente dual que comprende un modulador de interrupción y de reconfiguración y un modulador de adsorción (proteína)

El escenario inicial representado en la Figura 2 es muy parecido al representado en la Figura 1: una molécula única de endotoxina se inserta en una micela de detergente (simbolizada por un anillo de círculos abiertos que representa las moléculas de detergente individuales) y, de esta manera establemente individualizada, se enmascara de tal manera que evade la detección. Entre los paneles (a) y (b), uno ve la adición de un sistema modulador de componente dual que comprende tanto un componente no proteico que funciona simultáneamente como un modulador de interrupción y de reconfiguración y un componente de proteína que funciona como un modulador de adsorción. El modulador de interrupción y de reconfiguración puede ser como se describe como anteriormente para la Figura 1, por ejemplo, 1-dodecanol, que ayuda a interrumpir la micela del 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 para promover la interrupción de las micelas del detergente que son más estables que aquellas representadas en la Figura 1 y para las que un modulador de interrupción solo puede no ser suficiente para lograr la interrupción deseada.

Como se ha explicado anteriormente, el modulador de adsorción puede ser por ejemplo seroalbúmina bovina (BSA) o seroalbúmina humana (HSA), entre otras cosas. Tales proteínas tienen la capacidad de actuar como "esponjas moleculares" que adsorben en su superficie moléculas del detergente previamente formador de micelas. Por supuesto, en el caso en que se emplee un modulador de adsorción tal, existirá un cierto equilibrio entre otras moléculas de tipo detergente en solución, tales como el modulador de interrupción y de reconfiguración. Se esperaría que esto engendrara un equilibrio como se muestra en el panel (b), en el cual el modulador de interrupción y de reconfiguración existe en formas unidas a endotoxina liberada (porción derecha del panel (b)), unidas a detergente que constituía previamente la micela del detergente, así como unidas a la superficie del modulador de adsorción, junto con el detergente adicional de la micela de detergente (ahora interrumpida).

Bajo las condiciones de solución prevalentes en el escenario mostrado en la Figura 2, la endotoxina que se ha liberado de la micela de detergente de enmascaramiento se combina en agregados detectables, mostrados en el panel (c). De hecho, el uso de un modulador de adsorción como se muestra en la Figura 2 puede promover tal formación de agregados. Se asume que esto es debido a que el modulador de adsorción une moléculas del modulador de interrupción y de reconfiguración en su superficie, retirando de esta manera estas especies de otra manera estabilizantes de endotoxina de la solución de tal manera que el equilibrio se conduce a la derecha hacia el agregado del panel (c).

Globalmente, entonces, la Figura 2 muestra la transición de los restos de endotoxina individuales que están incrustadas en las micelas de detergente y, debido a su individualización en estas micelas, se mantienen enmascarados, a un escenario en donde los restos individuales de endotoxina se han forzado a agregar de tal manera que se vuelven detectables. Es decir, La endotoxina previamente enmascarada en el panel (a) se ha desenmascarado en el panel (c), permitiendo de esta manera que uno determine que una solución que se pensó previamente (en el panel (a)) que estaba libre de endotoxina realmente contiene este contaminante (panel (c)).

Desenmascarar endotoxina enmascarada por un enmascarador detergente con un sistema modulador multi-componente en combinación con un agente que influye en la estabilidad de unión de hidrógeno en solución

5 En los escenarios representados en las Figuras 1 y 2, las condiciones de solución fueron de tal manera que el uso de un sistema modulador solo es suficiente para interrumpir las micelas de detergente enmascarantes. Visto de otra manera, ninguna de las micelas enmascarantes de detergente mostradas en las Figuras 1 y 2 han sido tan estables como para resistir la interrupción usando un modulador de interrupción solo. Además, las condiciones en las Figuras 1 y 2 han sido de tal manera que los equilibrios entre las formas solubilizadas y agregadas de endotoxina caen hacia la forma agregada, de tal manera que la detección de esta forma agregada fue posible bajo las condiciones de solución mostradas sin necesidad de tomar ninguna medida adicional.

15 Las condiciones que subyacen el escenario mostrado en la Figura 3 ahora son diferentes. En este caso, las moléculas individuales de endotoxina se insertan en la capa lipídica de micelas de detergente (simbolizadas de nuevo por un anillo de círculos abiertos que representa las moléculas de detergente individuales), pero ya sea debido a las condiciones de la solución, a la naturaleza de la interacción del detergente de enmascaramiento con la endotoxina o a una combinación de estas cosas, la endotoxina insertada en la micela de detergente en el panel (a) es más estable, y por lo tanto, menos resistente a la interrupción con modulador de interrupción, que cualquiera de las situaciones iniciales en las Figuras 1 y 2. Se requieren medidas adicionales para desestabilizar el complejo detergente-endotoxina de tal manera que, una vez desestabilizado, el sistema modulador pueda interrumpir la micela y liberar la endotoxina insertada.

25 Con este fin, el escenario mostrado en la Figura 3 conlleva usar un agente que influye en la estabilidad de unión de hidrógeno en solución, simbolizado 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 micela-endotoxina en el panel (b). Como se ha mencionado anteriormente, una sustancia útil como un agente que influye en la estabilidad de unión de hidrógeno en solución es calcio divalente.

30 Con el complejo entre el enmascarador detergente y la endotoxina enmascarada de esta manera desestabilizado, se añade un sistema modulador que comprende tanto un modulador de adsorción como un modulador de desplazamiento (véase encima de las flechas de equilibrio entre los paneles (b) y (c)) para desplazar la endotoxina de la micela ya desestabilizada de detergente enmascarante. Como se ha mencionado anteriormente, el modulador de desplazamiento puede ser dodecil sulfato sódico (SDS), en sí mismo un detergente. La posibilidad de que el sistema modulador contenga un componente que en sí mismo es un detergente y que pueda formar nuevas micelas por sí mismo, se representa en el panel (c) de la Figura 3 por un círculo de puntos, en las cuales se inserta la endotoxina. Bajo las condiciones prevalentes en la Figura 3, sin embargo, cualquier micela formada por el modulador de desplazamiento no es tan estable como la micela formada por el detergente enmascarante mostrado en el panel (a). Esto es al menos en parte debido a que el modulador de adsorción, por ejemplo, BSA mostrado en la Figura 3 también se une al modulador de desplazamiento en su superficie, estableciendo un equilibrio entre poblaciones unidas a proteína y formadoras de micelas del modulador de desplazamiento que desestabilizan eficazmente cualquier micela formada por el modulador de desplazamiento.

45 La presencia de un modulador de interrupción y reconfiguración, por ejemplo como una especie anfífila no formadora de 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 analizado con detalle anteriormente en el contexto de las Figuras 1 y 2. En resumen, el modulador de interrupción y de reconfiguración mostrado entre los paneles (c) y (d) de la Figura 3 libera y solubiliza la endotoxina transitoriamente insertada en micelas formadas por el modulador de desplazamiento, al mismo tiempo que establece un equilibrio entre las especies de endotoxina solubilizadas (no detectables) y agregadas (detectables). Este equilibrio puede desplazarse a la derecha (hacia la forma agregada) por el agente que influye en la estabilidad de unión de hidrógeno en solución (por ejemplo, una sal con un catión, preferentemente un catión divalente y/o un agente caotrópico).

55 Globalmente, la Figura 3 muestra la liberación de una molécula enmascarada de endotoxina de un complejo estable con una micela de un enmascarador detergente. Usa un agente que influye en la estabilidad de unión de hidrógeno en solución para desestabilizar este complejo y un modulador multicomponente que en total interrumpe este complejo y chaperona la endotoxina liberada a través de una serie de mínimos energéticos en la dirección última de un complejo de endotoxina agregado y por lo tanto detectable.

Desenmascarar endotoxina enmascarada por un enmascarador de proteína con un modulador de componente dual que comprende un modulador de desplazamiento y un modulador de interrupción y de reconfiguración

60 La Figura 4 es una representación esquemática de un escenario en donde una endotoxina se enmascara por una proteína en solución. Esto se muestra en el panel (a) de la Figura 4. En el escenario representado en la Figura 4, la proteína, que puede ser por ejemplo un API en una formulación farmacéutica, exhibe una hendidura de unión que es tanto estérica como electrostáticamente adecuada para unir establemente la endotoxina. De este modo, el enmascarador de proteína une moléculas de endotoxina, haciéndolas indetectables. La adición de un componente 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 en el enmascarador de proteína. Este modulador de desplazamiento puede por ejemplo ser un "segundo alifático sustituido con heteroátomos que comprende 8 a 16 átomos de carbono" como se analiza anteriormente. En el caso en que el modulador de desplazamiento fuera, por ejemplo, dodecil sulfato sódico, este modulador de desplazamiento podría unirse a la superficie de la proteína de enmascaramiento, desplazando la molécula de endotoxina desde 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, como se simboliza por el círculo de puntos en la porción derecha del panel (b), el componente modulador de desplazamiento también puede formar micelas transitorias por sí mismo, esencialmente chaperonando la endotoxina liberada del enmascarador de proteína en una forma establemente insertada 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 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, la cosa importante es que el modulador de desplazamiento representado 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 que esta endotoxina se libera de su estado enmascarado en o sobre la proteína de enmascaramiento, un componente modulador adicional (modulador de interrupción y de reconfiguración), representado encima de las flechas de equilibrio entre los paneles (b) y (c) de la Figura 4 desplaza la relación energética prevalente en solución de tal manera que el estado más estable para la endotoxina es en forma libremente solubilizada, chaperonada en solución por el modulador de interrupción y de reconfiguración. Este modulador de interrupción y de reconfiguración puede por ejemplo ser un "primer alifático sustituido con heteroátomos que comprende 8 a 16 átomos de carbono" como se analiza anteriormente, que puede ser por ejemplo 1-dodecanol. Como se ha analizado anteriormente, este modulador de interrupción y de reconfiguración típicamente tendrá la propiedad de interrumpir las micelas existentes (por ejemplo formadas por el modulador de desplazamiento y se muestra en la porción derecha del panel (b)), aunque sin formar micelas por sí mismo. Con cualquier micela previa del modulador de desplazamiento interrumpida de esta manera y con el modulador de interrupción y de reconfiguración incapaz de formar micelas por sí mismo, la forma más energéticamente estable de la endotoxina se vuelve la forma solubilizada mostrada en el panel (c) de la Figura 4, chaperonada por el modulador de interrupción y de reconfiguración.

El resto de la Figura 4 es como se ha analizado anteriormente para la etapa de equilibrio final en las Figuras 1 y 3. En resumen, existe un equilibrio entre la endotoxina individual solubilizada (panel (c)) y la endotoxina agregada (panel (d)). Hasta el grado en que cualquier población apreciable de endotoxina agregada existe como parte de este equilibrio, la endotoxina se vuelve detectable donde, unida establemente en o sobre la proteína de enmascaramiento, previamente no lo era. Globalmente, la endotoxina que se enmascaró previamente en forma individualizada por una proteína se ha desenmascarado y hecho detectable ajustando las condiciones de solución de tal manera que el estado más energéticamente favorable en que la endotoxina puede residir se vuelva su forma agregada detectable. Como en las figuras anteriores analizadas anteriormente, entonces, el "desenmascaramiento" es el resultado de manipular las condiciones de solución de tal manera que se desplace el equilibrio desde un estado en donde la endotoxina se estabiliza en forma individualizada ("enmascarada") hacia un estado en que la endotoxina está agregada y detectable ("desenmascarada").

Desenmascarar endotoxina enmascarada por una proteína usando un modulador multi-componente que comprende un modulador de adsorción (proteína), un modulador de desplazamiento y un modulador de interrupción/reconfiguración, en combinación con un agente que influya en la estabilidad de unión de hidrógeno en solución

El escenario inicial mostrado en la Figura 5 corresponde a aquel mostrado en la Figura 4: la endotoxina se une establemente en o sobre una proteína presente en la composición. Esta proteína en la composición, que puede por ejemplo ser un API, de esta manera funciona como un "enmascarador de endotoxina". Como ya se ha analizado en el contexto del escenario representado en la Figura 3, la endotoxina se compleja establemente con el enmascarador de endotoxina en el panel (a) de la Figura 5 de manera que la simple adición de modulador no puede liberarla. En la Figura 3, analizada anteriormente, el enmascarador de endotoxina era un detergente, que formaba una micela en donde una molécula única de endotoxina se insertaba muy establemente. Ahora en la Figura 5, el enmascarador de endotoxina es una proteína con un sitio de unión susceptible de unión de endotoxina estable. Pero el principio se mantiene siendo el mismo: Ya sea insertada en la capa lipídica de una micela de detergente (Figura 3) o residiendo establemente en o sobre una proteína, la endotoxina se estabiliza hasta un grado que la simple adición de un modulador es incapaz de superar y la endotoxina de esta manera solubilizada se mantiene indetectable.

Como se explica anteriormente para la Figura 3, este complejo estable entre endotoxina y enmascarador de endotoxina puede desestabilizarse mediante la adición de un agente que influya en la estabilidad de unión de hidrógeno en solución, por ejemplo una sal o un agente caotrópico, por ejemplo calcio divalente. Este agente que influye en la estabilidad de unión de hidrógeno se simboliza en la Figura 5 por pequeños cuadrados que empiezan desde las flechas de equilibrio entre los paneles (a) y (b). Este agente interrumpe la red de unión de hidrógeno que se asume que existe entre la endotoxina y el enmascarador de proteína, elevando de esta manera la energía libre

del complejo a un nivel donde los componentes del modulador, que se muestran encima de las flechas de equilibrio entre los paneles (b) y (c), puede romper el complejo en un grado tal que la endotoxina se desaloja de la proteína de enmascaramiento.

5 Usando un sistema modulador que comprende tanto un modulador de adsorción (proteína) como un modulador de desplazamiento como se muestra en la Figura 5 entonces se asume que da lugar 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 unión de hidrógeno en solución 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 donde la endotoxina estaba previamente unida. Esta representación pretende representar el hecho de que el modulador de desplazamiento eficazmente desplazó la endotoxina de su posición estable en o sobre la proteína de enmascaramiento. La porción de en medio del panel (c) de la Figura 5 muestra una micela que podría formarse por el modulador de desplazamiento (por ejemplo, SDS), con una molécula de endotoxina transitoriamente insertada en la capa lipídica de la micela. Las moléculas del agente que influye en la estabilidad de unión de hidrógeno en solución también se muestran unidas a la endotoxina y la micela y sirven para desestabilizar adicionalmente esta micela, asegurando que la micela de hecho se mantiene transitoria y no presenta la endotoxina con un mínimo de energía de unión de la que no pueda desalojarse mediante un modulador de interrupción adicional. Finalmente, la porción derecha del panel (c) muestra el modulador de adsorción (proteína) actuando, como se ha descrito brevemente antes, como una "esponja molecular" que adsorbe tanto el agente que influye en la estabilidad de unión de hidrógeno en solución así como el modulador de desplazamiento en su superficie. Esto agota eficazmente esta especie en solución, desestabilizando la micela transitoria mostrada en la porción media del panel (c) hasta el grado en que se agota el modulador de desplazamiento, estabilizándolo hasta el grado en que el agente que influye en la estabilidad de unión de hidrógeno en solución se agota. En general, sin embargo, la cantidad de agente que influye en la estabilidad de unión de hidrógeno en solución será lo suficientemente alta para desestabilizar el complejo inicial entre la proteína de enmascaramiento y la endotoxina tal que suficiente de este agente persistirá en solución a pesar del agotamiento por el modulador de adsorción, de tal manera que la micela transitoria mostrada en el panel (c) se desestabilizará como se desea.

30 El uso de un modulador de interrupción y reconfiguración, por ejemplo 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) de tal manera que libere la molécula de endotoxina insertada. Como ya se ha analizado anteriormente la endotoxina solubilizada de esta manera (panel (d)) entonces entrará en una relación de equilibrio con una forma reconfigurada agregada de endotoxina (panel (e)) que puede detectarse como se analiza anteriormente.

35 Desenmascarar endotoxina enmascarada tanto por enmascaradores de proteína como de detergente con un modulador multi-componente que comprende un modulador de adsorción (proteína), un modulador de desplazamiento y un modulador de interrupción/reconfiguración, en combinación con un agente que influye en la estabilidad de unión de hidrógeno en solución

40 Muchos API de proteína, por ejemplo, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, hormonas, enzimas, proteínas de fusión o conjugados de proteína se formulan y se comercializan a concentraciones altas tales que los detergentes deben incluirse en solución para evitar la agregación de proteína indeseada. El escenario inicial mostrado en la Figura 6 es de esta manera representativo de una de las situaciones más relevantes en el campo de la formulación farmacéutica debido a que están presentes tanto enmascaradores de detergente como de proteína (por ejemplo, proteína API). La molécula de endotoxina se muestra como se inserta en la capa lipídica de una micela de detergente (simbolizada de nuevo por un anillo de círculos abiertos que representa las 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, dictándose la posición relativa de este equilibrio, hacia una especie de endotoxina unida a micela o bien unida a proteína por la estabilidad relativa de los complejos respectivos. Siendo todas las demás cosas iguales, el complejo de menor energía libre, y por lo tanto de mayor estabilidad, prevalecerá.

55 El análisis de la Figura 6 es análogo a aquel de la Figura 5 anterior, siendo la única diferencia que el panel (b) de la Figura 6 muestra tanto las especies de endotoxina unidas a proteína como a micela en equilibrio mutuo, cada una desestabilizada por el agente que influye en la estabilidad de unión de hidrógeno en solución.

60 Usar un modulador de adsorción y un modulador de desplazamiento da lugar a la situación de equilibrio representada en el panel (c) de la Figura 6. El análisis anterior para el panel (c) de la Figura 5 se aplica aquí correspondientemente. El uso de un modulador de interrupción y de reconfiguración adicional (mostrado sobre las flechas de equilibrio entre los paneles (c) y (d)) que es capaz de interrumpir la micela transitoria del panel (c) sin formar micelas por sí mismo, libera la endotoxina de su estado transitoriamente unido en una micela de modulador de desplazamiento (porción de en medio del panel (c)) y engendra la relación de equilibrio entre las formas solubles (no detectables) y agregadas (detectables) de la endotoxina como se analiza anteriormente. Como se explica anteriormente para las figuras anteriores, el modulador de interrupción y de 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 del detergente mostrada en el panel (a) (porción inferior del panel (d)).

Nótese que los escenarios 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, estará claro que los procesos analizados son todos procesos de equilibrio y que no hay en consecuencia prerrequisito para el orden de adición de diferentes componentes del sistema modulador o, si se usa, del agente que influye en la estabilidad de unión de hidrógeno en solución. Los equilibrios mostrados se establecerán automáticamente de esta manera tan pronto como los componentes estén presentes juntos en solución. El "orden" de adición de estos componentes como se implica en el análisis anterior y mostrado en las Figuras 2-6 sirve de esta manera meramente para ilustrar los mecanismos que los presentes inventores creen que subyacen al efecto técnico ventajoso de la presente invención. En consecuencia, desenmascarar una endotoxina previamente enmascarada debería lograrse mediante la adición de componentes en puntos separados en el tiempo como se sugiere por las Figuras 2-6, sin embargo el efecto de desenmascaramiento deseado también es logvable cuando los componentes representados en las Figuras 2-6 se añaden todos de una vez.

En el sentido más general, los escenarios representados anteriormente en la Figura 1-6 y el análisis correspondiente deberían ilustrar los siguientes principios generales, que se destinan a ser directrices generales para la persona experta al implementar la presente invención. Muchas soluciones que se ensayaron negativas para endotoxina por métodos convencionales realmente contienen endotoxina en forma enmascarada. Los métodos convencionales detectan endotoxina en su forma agregada, por lo que el hecho de que muchas soluciones existentes, tales como formulaciones farmacéuticas, se ensayen negativas para endotoxina no significa necesariamente que estas soluciones no contengan endotoxina, sino que no contienen endotoxina en forma detectable.

En su forma más general, los métodos de la invención permiten el desenmascaramiento de endotoxina, por ejemplo, desestabilizando los complejos entre endotoxina y enmascaradores de endotoxina de tal manera que liberen y, en última instancia agreguen moléculas individuales de endotoxina, haciendo de esta manera detectable la endotoxina previamente indetectable. La liberación de la endotoxina de sus complejos enmascarados con enmascaradores de endotoxina puede asegurarse directamente usando un modulador de interrupción y de reconfiguración para romper tales complejos o, para complejos especialmente estables, estos pueden desestabilizarse y después romperse con un modulador tal o con un sistema modulador multi-componente. Sin embargo la endotoxina unida se libera, el efecto neto es que las transiciones de endotoxina de una forma unida establemente a una forma soluble transitoria pueden después agregarse. En su sentido más amplio, entonces, los métodos de la presente invención implican ajustar las condiciones de solución como se describe anteriormente de tal manera que la endotoxina previamente enmascarada se acomode a través de una serie de equilibrios, en donde la transición final dé como resultado la agregación de endotoxina en una forma que sea detectable.

Ya que el desenmascaramiento y/o la detección de endotoxina de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento dependen de una reconfiguración final de endotoxina liberada en forma solubilizada (indetectable) en una forma agregada (detectable) se necesitará generalmente un modulador de reconfiguración. Este modulador de reconfiguración (por ejemplo, 1-dodecanol) tendrá generalmente la característica de no formar micelas por sí mismo, estabilizando las moléculas individuales de endotoxina de tal manera que estas puedan entrar en un equilibrio con formas agregadas de endotoxina. Como está claro a partir de lo anterior, un modulador de reconfiguración a veces, pero no necesariamente, funcionará también como modulador de interrupción que es capaz de romper un complejo inicial entre endotoxina y una micela de detergente de enmascaramiento y/o un complejo de entre endotoxina y una micela transitoria de modulador de desplazamiento.

Los siguientes ejemplos, incluyendo los experimentos llevados a cabo y los resultados logrados, se proporcionan solamente para fines ilustrativos y no se interpretan limitando la presente invención.

50 Ejemplos

Introducción

El enmascaramiento de endotoxinas es un fenómeno común en la composición farmacéutica, especialmente en productos de fármacos biofarmacéuticos. El enmascaramiento de endotoxinas se dirige por varios factores, dando lugar al final a la no detectabilidad o al menos una detectabilidad disminuida de la endotoxina en el producto de fármaco.

En un escenario, el enmascaramiento no está causado por el ingrediente farmacéutico activo (API), por ejemplo, una proteína, en sí mismo sino por los ingredientes de formulación. Tales ingredientes son detergentes, que se añaden para evitar la agregación de la proteína y sustancias tamponantes como citrato, fosfato, Tris, acetato, histidina, glicina, que se añaden para el ajuste de pH del producto.

Como era de esperar, la cinética del enmascaramiento está influenciada por la temperatura, avanzando el enmascaramiento más rápido a temperaturas más altas que a temperaturas más bajas. Salvo que se especifique otra cosa, todos los experimentos realizados a continuación se realizaron a temperatura ambiente. Esta es la

temperatura a la que se realizan a menudo las etapas del proceso de producción del ingrediente farmacéutico activo (API) y es por lo tanto la temperatura más relevante para evaluar la aplicabilidad de los métodos de la invención descritos en el presente documento para los procesos industriales.

5 Ejemplo 1: Desenmascaramiento de endotoxina de un sistema de enmascaramiento de polisorbato 20/citrato usando un modulador de interrupción y de reconfiguración (1-dodecanol) solo y junto con un modulador de adsorción (BSA) adicional

10 Se eligió un sistema de enmascaramiento de polisorbato 20/citrato para el primer experimento porque el citrato y el polisorbato 20 se incluyen a menudo en las formulaciones biofarmacéuticas. Estos experimentos pretenden determinar si la endotoxina enmascarada puede liberarse de un complejo con enmascarador detergente mediante la adición de un modulador de interrupción y de reconfiguración como se describe en el presente documento.

15 Materiales y métodos

El enmascaramiento de endotoxina se realizó como sigue. Se prepararon alícuotas acuosas de 1 ml de Citrato 10 mM pH 7,5 que contienen un 0,05 % (p/v) de polisorbato 20 en tubos de ensayo de vidrio libres de endotoxinas. Posteriormente, se añadieron 10 µl de una solución madre de 10.000 UE/ml de LPS (LPS O55 B5, Sigma L2637-5MG), la solución resultante se sometió a vórtex durante 1 min y se almacenó a temperatura ambiente durante al menos 24 horas. Como un control positivo de LPS que contiene LPS no enmascarado, se añadieron 10 µl de una solución madre de 10.000 UE/ml de LPS a 1 ml de agua libre de endotoxinas, se mezcló y se incubó de forma idéntica a las preparaciones de enmascaramiento, pero con polisorbato 20. El control positivo de LPS-agua se describe con más detalle a continuación.

25 El enmascaramiento de endotoxina se realizó como sigue. Se añadieron 100 µl de soluciones madre de cada uno de 1-dodecanol (modulador de interrupción y de reconfiguración) disuelto en etanol al 100 % y de 100 mg/ml de BSA (modulador de adsorción) disueltos en agua libre de endotoxinas. 1-Dodecanol y BSA se usan aquí como los dos componentes de un sistema modulador de componente dual. Se realizó un experimento de desenmascaramiento separado de forma idéntica a anteriormente, excepto por que se usó un modulador de mono-componente. El modulador único en este experimento fue 1-dodecanol solo, es decir, sin BSA. Las concentraciones de las soluciones madre de 1-dodecanol fueron 400, 200, 100, 50, 25, 12,5 y 6,25 mM. Para desenmascarar, las soluciones madre de desenmascaramiento de BSA y 1-dodecanol se añadieron secuencialmente con 2 minutos de mezcla por vórtex después de cada dilución. Después de mezclar, las muestras se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente sin mezclar.

35 El contenido de endotoxinas se analizó usando EndoLISA® (Hyglos GmbH) de acuerdo con las instrucciones del kit. Las diluciones de la muestra fueron 1:10 y 1:100 en agua libre de endotoxinas.

40 La recuperación de endotoxina se calculó como un porcentaje de recuperación de un control de LPS-agua separado que contenía solamente agua y LPS sin ningún componente enmascarante. En ausencia de cualquier enmascarador de endotoxina, no debería enmascarse nada de LPS en este control de LPS-agua, esto es, todo el LPS presente en este control de LPS-agua debe ser detectable. De este modo, el control de LPS-agua sirve como un patrón para determinar tanto cualitativamente así como cuantitativamente si el kit de detección EndoLISA® empleado está funcionando apropiadamente detectando el LPS (control cualitativo) y si todo el LPS que se sabe que está presente en el control de hecho se detecta (control cuantitativo).

45 Resultados

Los datos de recuperación en la Figura 7 y la Tabla 1 (a continuación) muestran que mediante la adición de BSA y/o 50 1-dodecanol en concentraciones de 20 a 2,5 mM, puede recuperarse endotoxina enmascarada en un grado mayor que el 100 %. En ausencia de BSA, no puede lograrse la recuperación del 100 % sino, más bien, más del 50 % en el intervalo de 10 a 2,5 mM de 1-dodecanol con recuperación máxima a 5 mM de 1-dodecanol de aproximadamente el 90 %.

55 En este y los siguientes ejemplos, las recuperaciones de más del 100 % de LPS deben interpretarse a la luz de lo siguiente: Se ha descubierto que la actividad del LPS depende tanto de la forma del LPS (por ejemplo, el grado y la orientación de agregación) así como la estructura del LPS (variando ligeramente esta estructura en el LPS que 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 del LPS (de hecho, se debe a tal alteración como se promueve por el modulador, especialmente el modulador de reconfiguración, que es posible el desenmascaramiento del LPS). El cambio en la forma y la orientación de la agregación del LPS entre el control de LPS-agua (no enmascarado) y las muestras desenmascaradas puede en algunos casos provocar la actividad detectada después del desenmascaramiento que excede aquella medida en el control de LPS-agua positivo. Esto no significa que realizar los métodos de desenmascaramiento de la invención como se describe en el presente documento genere nuevo LPS no previamente presente, sino que en algunos 65 casos, realizar los métodos de desenmascaramiento de la invención como se describe en el presente documento

altera la forma del LPS existente de tal manera que la actividad aparente medida 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

5 Los resultados demuestran claramente que la endotoxina enmascarada puede desenmascararse por la adición del modulador 1-dodecanol (modulador de interrupción y de reconfiguración) solo. Los resultados muestran además que este efecto desenmascarante puede mejorarse por la adición de un modulador de adsorción adicional (BSA). En este último caso en donde se añaden 1-dodecanol y BSA como un modulador de componente dual, el BSA ayuda a adsorber detergente, desestabilizando de esta manera la micela de detergente que enmascara la endotoxina, el modulador 1-dodecanol, es capaz de interrumpir micelas de detergente (en su capacidad como modulador de interrupción) y de reconfigurar la endotoxina liberada en una estructura agregada (en su capacidad como modulador de reconfiguración). En el caso del polisorbato 20 en ausencia de BSA es posible una recuperación casi cuantitativa (89 % en 1-dodecanol 5 mM). Esto puede deberse a la similitud en la longitud de las cadenas de alquilo del 1-dodecanol y el detergente polisorbato 20 enmascarante de LPS. El desenmascaramiento se mejora por la adición de BSA, que se asume que desplaza el equilibrio del LPS de forma solubilizada a agregada (véase por ejemplo, la Figura 2).

20 Ejemplo 2: Desenmascaramiento de endotoxina de un sistema de enmascaramiento de polisorbato 20/citrato usando alcoholes de diferente longitud de la cadena de alquilos como moduladores de interrupción y de reconfiguración

Este experimento investiga el uso de diversos alcoholes de alquilo como moduladores de interrupción y de reconfiguración. Un objeto de los experimentos descritos en este ejemplo fue investigar la relación entre la longitud de la cadena de alquilo en el alcohol y la eficiencia de desenmascaramiento. Con este fin, se realizó el desenmascaramiento mediante la adición de alcoholes con longitudes de cadena de átomos de carbono de C8-C18 en diferentes concentraciones.

Materiales y métodos

30 El enmascaramiento de endotoxina se realizó como se describe en el Ejemplo 1. El desenmascaramiento se realizó mediante la adición de soluciones madre de 1-alcoholes no ramificados de diferentes longitudes de cadena de alquilo (C₈, C₁₀, C₁₂, C₁₄, C₁₆, C₁₈) como moduladores (moduladores de interrupción y de reconfiguración) como se describen en el Ejemplo 1 para 1-dodecanol (que tiene una cadena de alquilo de 12 carbonos). Cada una de las soluciones madre se disolvió en etanol al 100 %. En contraste a ciertos de los experimentos descritos anteriormente en el Ejemplo 1, no se incluyeron otros componentes moduladores, por ejemplo, BSA, en los presentes experimentos de desenmascaramiento. El análisis de las concentraciones de endotoxinas se realizó usando el kit

EndoLISA® (Hyglos GmbH) y el posterior cálculo de recuperación de endotoxina se expresó como un porcentaje del LPS en la muestra de control de LPS-agua. El control positivo de LPS-agua se explica en detalle en el Ejemplo 1, anteriormente.

5 Resultados

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

10

Tabla 2

Conc. (mM)	% de recuperación de LPS					
	1-Octanol	1-Decanol	1-Dodecanol	1-Tetradecanol	1-Hexadecanol	1-Octa-decanol
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

nd = no hay datos

15

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

20

Los resultados anteriores implican que la longitud de la cadena de alquilo del alcohol usado como un modulador de interrupción y de reconfiguración deben coincidir idealmente con la longitud de cadena de alquilo de las cadenas de acilo en la endotoxina tan estrechamente como sea posible. En el presente caso, las longitudes de las cadenas de acilo en el componente de Lípido A del LPS son C12 y C14 y fueron los 1-alcoholes que tenían longitudes de cadena de alquilo en ese intervalo que, cuando se usaron como moduladores de interrupción y reconfiguración, desenmascararon más eficazmente la endotoxina.

25

Ejemplo 3: Desenmascaramiento de endotoxina de sistemas de enmascaramiento de diversos tensioactivos no iónicos usando 1-dodecanol como un modulador de interrupción y de reconfiguración solo y junto con el modulador de adsorción BSA

30

Para investigar la hipótesis de que el desenmascaramiento de endotoxina de polisorbato 20 por 1-dodecanol solo se promueve por longitud de cadena de alquilo del tensioactivo enmascarante equivalente o similar y 1-dodecanol, se diseñaron diversos experimentos usando detergentes enmascarantes de diferentes longitudes de cadena y de diferente estructura y estos se desenmascararon entonces usando un modulador de interrupción y de reconfiguración de longitud de cadena de alquilo fijada (1-dodecanol, con una cadena de alquilo C₁₂). Con este fin, las muestras enmascaradas se prepararon en polisorbato 80 y Triton X-100 y se desenmascararon posteriormente con 1-dodecanol o BSA/1-dodecanol usando diferentes concentraciones de 1-dodecanol.

35

Materiales y métodos

40

El enmascaramiento de endotoxina se realizó como sigue: Se prepararon alícuotas de 1 ml de citrato 10 mM pH 7,5 que contienen un 0,05 % de polisorbato 20, polisorbato 80 o Triton X-100 en tubos de ensayo de vidrio libres de endotoxinas. Posteriormente, se añadieron 10 µl de una solución madre de 10.000 UE/ml de LPS (LPS O55 B5, Sigma L2637-5MG), se sometió a vórtex durante 1 min y se almacenó a temperatura ambiente durante al menos 24 horas. Como un control de LPS positivo, se añadieron 10 µl de una solución madre de 10.000 UE/ml de LPS a 1 ml de agua libre de endotoxinas, se mezcló y se incubó de forma idéntica a las preparaciones de enmascaramiento. El control de LPS-agua positivo se analiza en detalle anteriormente en el Ejemplo 1.

45

El desenmascaramiento se realizó mediante la adición de soluciones madre de 1-dodecanol (como un modulador de interrupción y de reconfiguración) en diferentes concentraciones como se describe en el Ejemplo 1. Las soluciones

madre de los alcoholes respectivos se disolvieron en 100 % de etanol. El desenmascaramiento se realizó tanto en ausencia como en presencia de 10 mg/ml de BSA como se describe en el Ejemplo 1.

- 5 El análisis de las concentraciones de endotoxinas se realizó con el kit EndoLISA® (Hyglos GmbH), con el posterior cálculo de recuperación de endotoxina expresado como un porcentaje de la endotoxina en la muestra control de LPS-agua.

Resultados

- 10 La Tabla 3 (a continuación) muestra las recuperaciones de LPS después del desenmascaramiento de los respectivos sistemas de enmascaramiento polisorbato 20/citrato, polisorbato 80/citrato y Triton X-100/citrato dependiendo de la concentración de 1-dodecanol (modulador de interrupción y de reconfiguración) en ausencia o en presencia de BSA (modulador de adsorción).

15 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 = no hay datos

- 20 El desenmascaramiento con 1-dodecanol 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 un 90 %. Ambos enfoques de desenmascaramiento del sistema de enmascaramiento 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.

- 25 Por lo tanto, desenmascarar usando 1-dodecanol solo (como un modulador de interrupción y de reconfiguración) es suficiente para desenmascarar LPS de sistemas de enmascaramiento tal como en el sistema de enmascaramiento del polisorbato 20. La adición de BSA (como un 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 del sistema Triton X-100 no es altamente eficiente incluso cuando se añade BSA junto con 1-dodecanol. Añadir un componente modulador adicional tal como por ejemplo SDS (como un modulador de desplazamiento) puede ayudar a mejorar la recuperación de LPS de las formulaciones de enmascaramiento de Triton X-100.

- 35 Ejemplo 4: Aumentar la eficiencia de desenmascaramiento mediante la adición de un modulador y un agente caotrópico que influye en la estabilidad de unión de hidrógeno

- 40 La débil recuperación de LPS del sistema de enmascaramiento Triton X-100 usando el sistema modulador dual de BSA (modulador de adsorción) y 1-dodecanol (modulador de interrupción y de reconfiguración) puede deberse a la alta estabilidad del complejo formado por Triton X-100 y LPS. Esta alta estabilidad puede evitar la destrucción

deseada de las micelas de enmascaramiento de endotoxina de Triton X-100 mediante la acción interruptora de 1-dodecanol y la adsorción del detergente por BSA.

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 multi-componente. La esperanza fue que se volviera posible entonces desestabilizando una micela de detergente de otra manera estable, la destrucción de esta micela usando un sistema de modulador multi-componente de 1-dodecanol (como modulador de interrupción y de reconfiguración), BSA (como modulador de adsorción) y SDS (como modulador de desplazamiento).

Materiales y Métodos

El enmascaramiento de endotoxina se realizó como sigue: Se prepararon alícuotas de 1 ml de citrato 10 mM pH 7,5 que contienen un 0,05 % de Triton X-100 en tubos de ensayo de vidrio libres de endotoxinas. Posteriormente, se añadieron 10 µl de una solución madre de 10.000 UE/ml de LPS (LPS O55 B5, Sigma L2637-5MG), se sometió a vórtex durante 1 min y se almacenó a temperatura ambiente durante al menos 24 horas. Como un control de LPS positivo, se añadieron 10 µl de una solución madre de 10.000 UE/ml de LPS a 1 ml de agua libre de endotoxinas, se mezcló y se incubó de una manera idéntica a las preparaciones de enmascaramiento. El control de LPS-agua positivo se analiza en detalle anteriormente en el Ejemplo 1.

El enmascaramiento de endotoxina se realizó como sigue: se añadieron 100 µl de las siguientes soluciones madre como componente único o como combinaciones a las muestras enmascaradas de 1 ml: CaCl₂ 1 M (disuelto en agua), 100 mg/ml de BSA (disuelto en agua), 1 % de SDS (disuelto en agua) y 1-dodecanol 50 mM (disuelto en etanol al 100 %). En el caso de adición de combinaciones, los agentes se añadieron secuencialmente, con una etapa de vórtex de 2 minutos entre cada adición. Las muestras se incubaron después a temperatura ambiente durante 30 minutos sin agitación.

El contenido de endotoxinas se analizó usando el kit EndoLISA® (Hyglos GmbH) de acuerdo con las instrucciones del kit. Las diluciones de la muestra fueron 1:10 y 1:100 en agua libre de endotoxinas. La recuperación de endotoxinas se calculó y se expresó como un porcentaje de recuperación del control de LPS-agua. El control de LPS-agua positivo se analiza en detalle anteriormente en el Ejemplo 1.

Resultados

La Figura 8 muestra el porcentaje de recuperación de LPS dependiendo de la adición de combinaciones de CaCl₂(C), BSA (B; modulador de adsorción), SDS (S; modulador de desplazamiento) y 1-dodecanol (D; modulador de interrupción y reconfiguración). El 1-dodecanol como el único modulador (de interrupción y reconfiguración) no desenmascara eficientemente el LPS de un complejo de enmascaramiento de Triton X-100. La adición de BSA (modulador de adsorción) y 1-dodecanol (modulador de interrupción y reconfiguración) como un sistema modulador de componente dual da como resultado aproximadamente un 20 % de recuperación. La adición adicional de una sal caotrópica tal como CaCl₂ o bien un modulador adicional tal como SDS (modulador de desplazamiento) no da como resultado recuperaciones de LPS mayores del 20 %. Sin embargo, la adición de CaCl₂, BSA (modulador de adsorción), SDS (modulador de desplazamiento) y 1-dodecanol (modulador de interrupción y reconfiguración) da como resultado recuperaciones de LPS de más del 100 %.

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

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

Ya que se observó un desenmascaramiento eficiente del sistema de enmascaramiento de Triton X-100 usando una combinación de CaCl₂, BSA, SDS y 1-dodecanol, se mantiene la cuestión de la eficiencia de desenmascaramiento de este enfoque partiendo de los sistemas de enmascaramiento de polisorbato. Para responder a esta pregunta, la endotoxina se enmascaró en sistemas de enmascaramiento de polisorbato 20, 80 y Triton X-100/citrato y 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 un modulador de interrupción y reconfiguración, se usa BSA como un modulador de adsorción, se usa SDS como un modulador de desplazamiento y se usa CaCl₂ como un agente que influye en la estabilidad de unión de hidrógeno en solución.

Materiales y métodos

El enmascaramiento de endotoxina se realizó como sigue: Se prepararon alícuotas de 1 ml de citrato 10 mM pH 7,5 que contienen un 0,05 % de polisorbato 20 o un 0,05 % de polisorbato 80 o bien un 0,05 % de Triton X-100 en tubos

de ensayo de vidrio libres de endotoxinas. Posteriormente, se añadieron 10 µl de una solución madre de 10.000 UE/ml de LPS (LPS O55 B5, Sigma Aldrich L2637-5MG), se sometió a vórtex durante 1 min y se almacenó a temperatura ambiente durante al menos 24 horas. Como un control de LPS positivo, se añadieron 10 µl de una solución madre de 10.000 UE/ml de LPS a 1 ml de agua libre de endotoxinas, se mezcló y se incubó de forma idéntica a las preparaciones de enmascaramiento. La función del control de LPS-agua positivo es como se describe anteriormente en el Ejemplo 1.

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

El contenido de endotoxinas se analizó usando el kit EndoLISA® (Hyglos GmbH) de acuerdo con las instrucciones del kit. Las diluciones de la muestra fueron 1:10 y 1:100 en agua libre de endotoxinas. La recuperación de endotoxinas se calculó como un porcentaje de recuperación del control de LPS-agua.

Resultados

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

Tabla 4

Detergente enmascaramiento de	% 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 un desenmascaramiento eficiente (~ 80 %) a partir del sistema de enmascaramiento de polisorbato 20 mediante 1-dodecanol, BSA/1-dodecanol y CaCl₂/BSA/SDS/1-dodecanol. En el caso de un sistema de enmascaramiento de polisorbato 80, se logra buena eficiencia 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 lo tanto, dependiendo de la estabilidad del complejo de enmascaramiento, pueden lograrse recuperaciones de endotoxina eficientes 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 de lograr desenmascaramiento eficiente, independientemente del sistema de enmascaramiento usado. Como está claro a partir de los experimentos descritos anteriormente en el presente documento, puede lograrse fácilmente una composición óptima para desenmascarar LPS en cualquier formulación dada por experimentación rutinaria.

Ejemplo 6: Desenmascaramiento de Endotoxina a partir de diferentes fuentes de Endotoxina

Los experimentos de desenmascaramiento de endotoxina en los Ejemplos 1-5 se realizaron con una preparación de LPS disponible en el mercado altamente purificada de E. coli O55:B5. Ya que solamente la parte conservada del Lípido A del LPS es responsable de la toxicidad y de la detectabilidad en métodos de detección basados en Factor C, puede asumirse que los enfoques de desenmascaramiento descritos anteriormente funcionarán igualmente bien usando preparaciones de LPS de bacterias distintas de E. coli O55:B5. Sin embargo, la bibliografía también describe diferencias en la longitud de cadena de acilo para la parte del lípido A del LPS, así como modificaciones de las cadenas laterales. Aún más, la longitud de las cadenas laterales del O-azúcar del LPS podría impactar potencialmente en el enfoque de desenmascaramiento. Adicionalmente, no puede excluirse que el LPS purificado y la endotoxina de origen natural (NOE, por sus siglas en inglés) puedan diferir en su comportamiento de desenmascaramiento. Para abordar estos problemas, y excluir la posibilidad, de que los enfoques de desenmascaramiento sean específicos para el LPS usado de E. coli O55:B5, LPS de diferentes bacterias, diferente longitud en las cadenas del núcleo y el O-azúcar y diferente pureza se enmascararon en diversos sistemas de enmascaramiento de detergente y posteriormente se desenmascararon usando bien 1-dodecanol solo, BSA/1-

dodecanol o bien CaCl₂/BSA/SDS/1-dodecanol.

Materiales y métodos

- 5 El enmascaramiento de endotoxina se realizó como sigue: las muestras de LPS de diferentes tipos y de diferentes fuentes se añadieron (aproximadamente 50 UE/ml) a 1 ml de muestras de enmascaramiento que contienen bien un 0,05 % de polisorbato 20, un 0,05 % de polisorbato 80 o bien un 0,05 % de Triton X-100 y citrato 10 mM pH 7,5. La fuente de LPS, el tipo y el proveedor se muestran en la Tabla 5 (a continuación). Las NOE se produjeron a partir de sobrenadante de cultivo bacteriano después del crecimiento a la fase estacionaria en medio LB por filtración estéril.
- 10 Como un conservante, se añadió azida sódica al 0,05 %. El LPS liofilizado se disolvió en agua libre de endotoxina. Las soluciones de LPS para las cuales el proveedor en las Tablas 5-7 se indica como "LMU" fueron amables regalos del Dr. A. Wieser de la Ludwig-Maximilian University of Munich. El contenido de endotoxina de las soluciones madre de LPS se determinó usando el kit EndoZyme® (Hyglos GmbH) y se produjeron soluciones madre de aproximadamente 5000 UE/ml de LPS en agua libre de endotoxinas. De estas soluciones se añadieron 10 µl a 1 ml de muestras de enmascaramiento. Posteriormente, las muestras se permitieron enmascarar el LPS respectivo durante 7 días a temperatura ambiente.

- El desenmascaramiento de endotoxina se realizó mediante la adición de 100 µl de bien una solución madre de 1-dodecanol 100 mM, o bien la adición de 100 µl de una solución madre de BSA 100 mg/ml y 100 µl de una solución madre de 1-dodecanol 100 mM o bien mediante la adición de 100 µl de cada uno de CaCl₂ 1 M, BSA 100 mg/ml, SDS al 1 % y soluciones de 1-dodecanol 100 mM. El desenmascaramiento y la determinación del contenido de endotoxina se realizaron como se describe en los Ejemplos 1-5.

Resultados

- 25 Las Tablas 5-7 (a continuación) muestran el porcentaje de recuperación de LPS después del enmascaramiento y después del desenmascaramiento del LPS de diferentes fuentes y tipos fuera de los sistemas de enmascaramiento detergentes diferentes. Específicamente, la Tabla 5 muestra los resultados obtenidos para un sistema de enmascaramiento de Tween20 / Citrato; la Tabla 6 muestra los resultados obtenidos para un sistema de enmascaramiento de Tween80 / Citrato; y la Tabla 7 muestra los resultados obtenidos para un sistema de enmascaramiento de Triton X-100 / Citrato.

Tabla 5

<u>Sistema de enmascaramiento de Tween 20 / Citrato</u>	<u>proveedor</u>	<u>Control de enmascaramiento (% de recuperación)</u>	<u>Dodecanol (% de recuperación)</u>	<u>BSA/Dodecanol (% de recuperación)</u>	<u>CaCl₂/BSA/SDS/Dodecanol (% de recuperación)</u>
<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 (NOE)</i> *	Hyglos	0,0	55	156	187
<i>Salmonella enterica</i>	Sigma	0,0	42	63	76
<i>E.coli K 12</i>	Invivogen	3,0	78	80	137

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>Pseudomonas aeruginosa</i> *	Sigma	0,0	14	5	179

* Cepas que son contaminantes comunes del agua y por lo tanto es más probable que estén presentes en procesos para la producción de composiciones farmacéuticas

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

5 * Cepas que son contaminantes comunes del agua y por lo tanto es más probable que estén presentes en procesos para la producción de composiciones farmacéuticas

Tabla 7

Sistema de enmascaramiento de Triton X-100 / 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	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

10 * Cepas que son contaminantes comunes del agua y por lo tanto es más probable que estén presentes en procesos para la producción de composiciones farmacéuticas

15 Los datos anteriores muestran claramente que la capacidad de desenmascarar exitosamente la endotoxina de diversos sistemas de enmascaramiento es independiente de la fuente y el 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 endotoxina de diversas fuentes, bajo una diversidad de condiciones de enmascaramiento.

Ejemplo 7: Desenmascaramiento de endotoxina de sistemas de enmascaramiento de proteínas

Los experimentos anteriores han investigado el desenmascaramiento del LPS de sistemas de enmascaramiento de detergentes. Sin embargo, como se describe anteriormente en el presente documento, los detergentes no son las únicas sustancias que pueden enmascarar la endotoxina de la detección. Las proteínas (por ejemplo, API de proteínas) también son capaces de enmascarar la endotoxina de la detección cuando contienen sitios de unión sobre o dentro de su estructura en donde la endotoxina puede unirse, evadiendo de esta manera la detección. Los presentes experimentos por lo tanto se refieren al enmascaramiento de endotoxina (LPS) por una proteína en lugar de un detergente. Se usó lisozima como la proteína de enmascaramiento en estos experimentos porque se conoce su capacidad de unir endotoxina (véase, por ejemplo, Ohno & Morrison (1999). J. Biol. Chemistry 264(8), 4434-4441).

Materiales y Métodos

El enmascaramiento de endotoxina se realizó como sigue: se incubaron 50 UE/ml de LPS (E.coli O55:B5) durante siete días en tampón citrato 10 mM, pH 7,5 que contenía 1 mg/ml de lisozima de clara de huevo de gallina (Sigma Aldrich) a temperatura ambiente.

El desenmascaramiento de endotoxina se realizó como sigue: El desenmascaramiento se realizó mediante la adición de reactivos de desenmascaramiento (moduladores como se describen en los ejemplos anteriores y agentes que influyen en la estabilidad de unión 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. Todas las soluciones madre se disolvieron en agua excepto 1-dodecanol, que se disolvió en etanol al 100 %. Las concentraciones añadidas de las soluciones madre fueron CaCl₂ 100 mM 1 M, BSA 100 mg/ml y SDS al 1 %, respectivamente. El desenmascaramiento se realizó por adición secuencial de los diversos componentes con una etapa de someter a vórtex dos minutos después de cada adición. Las muestras se incubaron después durante 30 minutos a temperatura ambiente y se diluyeron posteriormente 1:10 y 1:100 en agua libre de endotoxina para análisis usando el kit EndoLISA® (Hyglos GmbH).

Resultados

La Tabla 8 (a continuación) muestra la eficiencia de desenmascaramiento de un enmascarador de proteína (lisozima) dependiendo de los componentes añadidos.

35

Tabla 8

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

En el caso del enmascaramiento por lisozima, el uso de 1-dodecanol (modulador de reconfiguración) solo o junto con un detergente de soporte (modulador de desplazamiento) como un componente adicional del sistema modulador no desenmascara eficientemente. En este caso, el complejo de enmascaramiento lisozima-LPS parece ser más estable debido a interacciones electrostáticas entre el LPS cargado negativamente y la lisozima cargada positivamente. La mejora del desenmascaramiento puede lograrse mediante la adición de sal, lo que interrumpe la interacción

electrostática, haciendo de esta manera al complejo lisozima-LPS más lábil y aumentando su susceptibilidad a interrupción con modulador. Con este fin, pueden lograrse buenos resultados usando un sistema modulador multi-componente de BSA (modulador de adsorción), SDS (modulador de desplazamiento) y 1-dodecanol (modulador de reconfiguración), junto con CaCl₂ para disminuir la estabilidad del complejo lisozima-LPS inicial. La combinación de estos componentes es capaz de romper el complejo de enmascaramiento y da lugar a estructuras de LPS detectables. Este modelo puede tomarse como un modelo general de las medidas que pueden usarse para desenmascarar la endotoxina cuando está enmascarada, entera o en parte, por una proteína, por ejemplo, un API de proteína en una composición farmacéutica.

10 Ejemplo 8: Sustancias distintas de alcoholes de 1-alquilo como moduladores para el desenmascaramiento

Como se ha descrito anteriormente en el presente documento, se ha descubierto que los alcoholes de 1-alquilo (usados como moduladores de reconfiguración) promueven la formación de estructuras de LPS detectables. Se deseó por lo tanto investigar si otros tipos de sustancias distintas de alcoholes de 1-alquilo también podrían tener la capacidad de promover formas similarmente detectables de LPS. Este ejemplo muestra los resultados de una exploración de sustancias distintas de alcoholes de 1-alquilo que podrían ser capaces de soportar la formación de estructuras de LPS detectables.

20 Materiales y métodos

100 UE/ml de LPS (E. coli O55:B5, Sigma) se enmascararon en polisorbato 20/citrato durante 24 horas a temperatura ambiente. Se inició el desenmascaramiento por la adición secuencial de 1 parte de soluciones madre de CaCl₂ (a 1 M), BSA (a 100 mg/ml), SDS (al 1 %) y sustancia X en 10 partes de una solución de LPS enmascarado, en donde "sustancia X" representó la sustancia distinta de un alcohol de 1-alquilo, la capacidad de la cual como un modulador de reconfiguración fue a ensayarse. La sustancia X se valoró en diferentes concentraciones. Después del desenmascaramiento, las muestras se diluyeron 1:10 y 1:100 en agua libre de endotoxina y se analizaron para la endotoxina detectable usando el kit EndoLISA® (Hyglos GmbH).

30 Resultados

La Tabla 9 (a continuación) muestra las recuperaciones máximas de LPS después del desenmascaramiento dependiendo de la sustancia usada como modulador. Adicionalmente, se muestran las concentraciones adecuadas de soluciones madre de las sustancias respectivas para el desenmascaramiento.

35 Tabla 9

Sustancias	% de recuperación de LPS	Concentración madre óptima de sustancia X
octil sulfato sódico (SOS)	20	30 mM
ácido 1-decanoico	57	100 mM

Como puede verse a partir de lo anterior, los alcoholes de 1-alquilo no son la única clase de compuestos que pueden funcionar como un modulador de reconfiguración para promover la formación de una forma detectable de LPS. Otras sustancias que contienen estados de oxidación más altos de oxígeno (por ejemplo, como en ácido 1-decanoico) así como heteroátomos distintos de oxígeno (por ejemplo como en octil sulfato sódico (SOS)) también pueden permitir un desenmascaramiento moderado a bueno.

Los resultados indican que las sustancias que son similares en estructura a los 1-alquilalcoholes son también capaces de soportar el desenmascaramiento en un cierto grado. Parece que los derivados OH de alcanos, preferentemente alcanos C₈-C₁₆, preferentemente alcanos C₈-C₁₂, preferentemente alcanos C₁₂ sirven mejor para hacer al LPS susceptible de detección por ensayos basados en Factor C.

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

Como parte de la verificación de la mejora en el desenmascaramiento por la adición de seroalbúmina bovina (BSA) en muestras enmascaradas que contienen polisorbato 80, se ensayaron albúminas de diferentes fuentes.

55 Materiales y métodos

Muestras enmascaradas (1 ml) que contienen 50 UE/ml de LPS (O55:B5) en tampón polisorbato 80/citrato se desenmascararon mediante la adición de 100 µl de soluciones madre con diferentes concentraciones de albúminas (seroalbúmina bovina (BSA), endotoxina muy baja, Serva GmbH; seroalbúmina humana (HSA, producida recombinantemente en Pichia pastoris (Sigma Aldrich); y Ovoalbúmina (Ova), EndoGrade Ovalbumin, Hyglos GmbH) y la posterior adición de 100 µl de una solución madre de 1-dodecanol 100 mM). Las concentraciones de las

soluciones madre de albúmina fueron 100, 33, 10, 3,3 y 1 mg/ml. Debido a la menor solubilidad de la ovoalbúmina en agua, no se preparó una solución de 100 mg/ml de ovoalbúmina.

- 5 Las recuperaciones de LPS se calcularon siguiendo la determinación del contenido de LPS detectable usando el kit EndoLISA® (Hyglos GmbH). Para las mediciones de EndoLISA® las muestras desenmascaradas se diluyeron 1:10 y 1:100 en agua libre de endotoxina y se midieron posteriormente de acuerdo con las instrucciones del kit.

Resultados

- 10 La Tabla 10 (a continuación) muestra la eficiencia de desenmascaramiento de un sistema de enmascaramiento de polisorbato 80/citrato, dependiendo de las albúminas de diferentes fuentes.

Tabla 10

proteína	[solución 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

- 15 nd = no hay datos

Los datos muestran que todas las albúminas ensayadas son capaces de soportar el desenmascaramiento 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 resultar de diferentes afinidades de las albúminas al detergente en la muestra enmascarada.

- 20

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

- 25 El desenmascaramiento usando la combinación de sustancias CaCl₂ (agente que influye en la unión de hidrógeno), BSA (modulador de adsorción), SDS (modulador de desplazamiento) y 1-dodecanol (modulador de reconfiguración) (esta combinación entera se denomina "CBSD") se ha demostrado anteriormente que desenmascara eficientemente el LPS cuando se enmascara, por ejemplo, por Triton X-100. Los presentes experimentos investigan el efecto de la naturaleza de la sal caotrópica (agente que influye en la estabilidad de unión de hidrógeno) en la eficiencia de desenmascaramiento. Con este fin, los siguientes experimentos emplean sales de propiedades caotrópicas en aumento: Na⁺, Mg²⁺ y Ca²⁺, en cada caso presentadas como la sal de cloruro correspondiente.
- 30

Materiales y métodos

El enmascaramiento de endotoxina se realizó como sigue: se enmascararon 50 UE/ml de LPS O55:B5 de E. coli permitiéndolo incubarse durante 3 días a temperatura ambiente en una solución de tampón citrato 10 mM (pH 7,5) que contiene Triton X-100 al 0,05 %. En este caso, el Triton X-100 funcionó como el enmascarador detergente.

El desenmascaramiento de endotoxina se realizó como sigue: 300, 100, 30, 10, 3 y 1 μ l de una solución madre de cloruro sódico 5 M (NaCl), cloruro magnésico 1 M (MgCl₂) o bien cloruro de calcio 1 M (CaCl₂) se añadieron a alícuotas de 1 ml de las muestras enmascaradas y se mezclaron. Posteriormente, se añadieron 100 μ l de los otros componentes moduladores BSA (modulador de adsorción), SDS (modulador de interrupción y de desplazamiento) y 1-dodecanol (modulador de reconfiguración)) como se describe en los Ejemplos 1-5.

Resultados

La Tabla 11 (a continuación) muestra el porcentaje de recuperación de endotoxina dependiendo 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

Los datos muestran que todas las sales ensayadas fueron capaces de soportar un desenmascaramiento eficiente del LPS del detergente de enmascaramiento Triton X-100 en combinación con un sistema modulador multicomponente incluyendo BSA (como modulador de adsorción), SDS (aquí, como modulador de interrupción) y 1-dodecanol (como modulador de interrupción y reconfiguración). Adicionalmente, como se describe anteriormente en el presente documento, la cantidad de la sal requerida para lograr un grado comparable de eficiencia de desenmascaramiento disminuyó con las propiedades caotrópicas en aumento. Estos resultados permiten que se esbozen varias conclusiones generales. En primer lugar, cuando se usa una sal para desestabilizar un complejo enmascarado entre endotoxina y enmascarador de endotoxina, el carácter caotrópico de esta sal es un factor importante para lograr el desenmascaramiento eficiente. En segundo lugar, la cantidad de sal requerida para lograr el desenmascaramiento eficiente variará en general inversamente con la fuerza caotrópica de la sal empleada.

Ejemplo 11: Desenmascaramiento de endotoxina de muestras que contienen detergente y tampón fosfato

La mayoría de formulaciones de fármacos que contienen una proteína (por ejemplo, anticuerpo) como un ingrediente farmacéutico activo (API) contienen detergentes no iónicos como polisorbato 20 o bien 80 juntos tamponados en citrato o bien fosfato. En tales formulaciones, la concentración de detergente está habitualmente por encima de la concentración micelar crítica (CMC). Adicionalmente los valores de pH de tales formulaciones se ajustan a menudo para asegurar la estabilidad óptima del API.

Con lo anterior en mente, las investigaciones expuestas en este Ejemplo buscaron investigar la influencia del valor de pH en la eficiencia de desenmascaramiento. Para aproximar las condiciones prevalentes en las formulaciones farmacéuticas que contienen un API de proteína tan estrechamente como sea posible, se usaron los detergentes polisorbato 20 y polisorbato 80 como enmascaradores de endotoxina y las soluciones se tamponaron con fosfato. En vista de los resultados descritos anteriormente en el presente documento, el desenmascaramiento se realizó usando una combinación de CaCl₂ (sal caotrópica como un agente que incluye en la estabilidad de unión de hidrógeno), BSA (modulador de adsorción), SDS (aquí, como modulador de interrupción) y 1-dodecanol (modulador de interrupción y reconfiguración). Como Ca²⁺ y PO₄³⁻ forman complejos de calcio-fosfato no solubles, la solución de cloruro de calcio se estabilizó mediante la adición de un exceso molar de dos veces de citrato, pH 7,5.

Materiales y métodos

El enmascaramiento de endotoxina se realizó como sigue: A muestras de 1 ml, conteniendo cada una 10 mM de tampón fosfato de diversos valores de pH y polisorbato 20 o bien polisorbato 80 al 0,05 %, se añadieron 100 UE/ml de LPS de E. coli O55:B5. El enmascaramiento se dejó avanzar incubando estas soluciones durante 7 días a temperatura ambiente. Se prepararon muestras control que contenían LPS de tampones fosfato que carecían de detergente, se incubaron y se midieron en paralelo a las muestras de enmascaramiento.

El desenmascaramiento de endotoxina se realizó como sigue: Una combinación de CaCl₂, BSA, SDS y 1-dodecanol se añadió a cada una de las muestras como se describe en los ejemplos anteriores. Para evitar la precipitación de

fosfato cálcico y para ajustar el pH de las muestras, se añadió un exceso molar de dos veces de tampón citrato pH 7,5 a cada muestra antes de la adición de los componentes de desenmascaramiento.

5 El contenido de endotoxina de las muestras enmascaradas se determinó usando el kit EndoZyme® de Hyglos GmbH a tiempo cero y después de 7 días. El contenido de endotoxina de las muestras desenmascaradas se analizó usando el kit EndoLISA® de Hyglos GmbH. El porcentaje de recuperación de LPS después de 7 días de enmascaramiento y después del desenmascaramiento se calculó con referencia a las muestras control a tiempo cero.

10 Resultados

La Tabla 12 (a continuación) y las Figuras 10 y 11 muestran el porcentaje de recuperación de LPS después de 7 días de enmascaramiento dependiendo del valor de pH y el porcentaje de recuperación de LPS después del desenmascaramiento de las muestras enmascaradas.

15

Tabla 12

tampón fosfato (valor de pH)	Enmascarador polisorbato 20		Enmascarador polisorbato 80	
	recuperación después del enmascaramiento [%]	recuperación después del desenmascaramiento [%]	recuperación después del enmascaramiento [%]	recuperación después del desenmascaramiento [%]
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

20 Los datos muestran que el enmascaramiento en las soluciones de tampón fosfato que contienen detergente es fuertemente dependiente del pH. A valores de pH por debajo de 4, no se produce enmascaramiento después de una semana de incubación de la muestra. A valores de pH por encima de 4 se ve un fuerte efecto de enmascaramiento, dando como resultado recuperaciones de LPS detectable de menos del 1 %.

25 Los datos también muestran de forma conclusiva que el enfoque de desenmascaramiento implementado hace detectable al LPS previamente enmascarado indetectable. Independiente del valor de pH y del grado de enmascaramiento, puede recuperarse un 100 % o más de LPS, es decir, detectarse.

Ejemplo 12: Desenmascaramiento usando moduladores de desplazamiento distintos del SDS

30 Como se muestra en los ejemplos anteriores, una combinación de CaCl₂/BSA/SDS/1-dodecanol desenmascaró eficientemente endotoxina que está enmascarada por el detergente Triton X-100. Varios de los experimentos descritos anteriormente sugieren la importancia de incluir SDS en este esquema para lograr el desenmascaramiento eficiente. El objeto de los experimentos descritos en el presente ejemplo es investigar si el componente modulador SDS (aquí, como un modulador de interrupción) puede intercambiarse por otro detergente sin impactar negativamente en el efecto de enmascaramiento observado usando SDS.

35

Materiales y métodos

40 El enmascaramiento de endotoxina se realizó como sigue: Se prepararon alícuotas de 1 ml de citrato 10 mM pH 7,5 que contienen un 0,05 % de Triton X-100 en tubos de ensayo de vidrio libres de endotoxinas. Posteriormente, se añadieron 10 µl de una solución madre de 10.000 UE/ml de LPS (LPS O55 B5, Sigma L2637-5MG), se sometió a vórtex durante 1 min y se almacenó a temperatura ambiente durante al menos 24 horas. Se preparó un control de LPS positivo en agua como sigue: se añadieron 10 µl de una solución madre de 10.000 UE/ml de LPS a 1 ml de agua libre de endotoxinas, se mezcló y se incubó de forma idéntica a las preparaciones de enmascaramiento. Los detalles adicionales con respecto al control de LPS-agua positivo se indican en el Ejemplo 1.

45

El desenmascaramiento de endotoxina se realizó como sigue: A soluciones enmascaradas de LPS, preparadas como se indica anteriormente, CaCl₂, BSA, detergente X y 1-dodecanol se añadieron como se describe en los ejemplos anteriores, donde "detergente X" (modulador de interrupción) se varió en identidad y concentración. Se ensayaron los siguientes detergentes: sal de dioctil sulfosuccinato sódico (AOT), dodecil bencen sulfonato sódico

(SDBS), sal potásica de 4-nonilfenil-3-sulfopropil éter de polietilenglicol (PENS) e hidrato de ácido p-xilen-2-sulfónico (XSA). El desenmascaramiento se realizó como se describe en los ejemplos anteriores, el contenido de endotoxina se determinó usando el kit EndoLISA® de Hyglos GmbH y el porcentaje de recuperación de LPS se calculó con referencia al control positivo de LPS-agua. Los detalles adicionales con respecto al control positivo de LPS-agua se describen en el Ejemplo 1 anterior.

Resultados

La Tabla 13 muestra el porcentaje de recuperación de LPS después del desenmascaramiento usando detergentes distintos del SDS en el enfoque de desenmascaramiento de CaCl₂/BSA/[detergente X]/1-dodecanol.

Tabla 13

Detergente	Óptimo de concentración	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 aparte del SDS son capaces de soportar el desenmascaramiento como un modulador de interrupción en un enfoque de desenmascaramiento de CaCl₂/BSA/[detergente X]/1-dodecanol. Adicionalmente, en ausencia de 1-dodecanol ningún detergente fue capaz de desenmascarar LPS de Triton X-100. Como se ha mencionado anteriormente, esto sugiere que el 1-dodecanol puede jugar un papel importante (al menos) como un modulador de reconfiguración que puede ser crucial para mediar la transición de endotoxina desde un estado solubilizado (indetectable) a uno agregado (detectable).

Ejemplo 13: Desenmascaramiento de composiciones de anticuerpo tamponadas dependiendo del detergente de enmascaramiento

Las formulaciones más comúnmente usadas de productos de fármaco basados en proteínas contienen tampón fosfato y detergentes no iónicos tales como polisorbato 20 o polisorbato 80. Además, los anticuerpos constituyen uno de los productos farmacéuticos de proteínas más comúnmente formulados. Con esto en mente, los presentes inventores buscaron confirmar si los anteriores enfoques de desenmascaramiento para sistemas de enmascaramiento de detergentes o de proteínas son adecuados para desenmascarar endotoxina en sistemas que contienen tanto detergente como proteína, donde la proteína es un anticuerpo tamponado en fosfato. El polisorbato 20 y 80 se eligieron como detergentes de enmascaramiento en estos experimentos porque estos dos detergentes son los detergentes más comúnmente usados en las formulaciones de fármacos de proteínas.

Materiales y Métodos

El enmascaramiento de endotoxina se realizó como sigue: 50 UE/ml de endotoxina (E. coli O55:B5; Sigma L2637-5MG) se añadieron a alícuotas de 1 ml de una solución de anticuerpo que contiene 10 mg/ml de una preparación de anticuerpo IgG policlonal bovino, disuelto en fosfato sódico 10 mM pH 7,5 y NaCl 50 mM. Posteriormente, se añadieron polisorbato 20 o bien polisorbato 80 a una concentración final del 0,05 % y las soluciones se incubaron durante 3 días a temperatura ambiente para permitir que se produjera el enmascaramiento. Además, controles que contenían la solución tampón sin detergente o anticuerpo, así como la solución tampón que contenía el anticuerpo o bien el polisorbato respectivo se prepararon y se trataron como las muestras de enmascaramiento. Cada uno de los controles contenía la misma cantidad de LPS.

El desenmascaramiento se realizó como sigue: El desenmascaramiento se realizó mediante la adición de 1-dodecanol o bien BSA/1-dodecanol o bien CaCl₂/BSA/SDS/1-dodecanol. Se añadieron 100 µl de las siguientes soluciones madre a alícuotas de 1 ml de la solución de muestra: CaCl₂ (1 M), BSA (100 mg/ml), SDS (1 %) y 1-dodecanol (100, 10 o 1 mM). Adicionalmente, antes de la adición de cloruro cálcico a una muestra, la muestra se estabilizó contra la precipitación de fosfato cálcico por la adición de una concentración final de citrato sódico 200 mM pH 7,5. Todas las soluciones madre se añadieron secuencialmente con etapas de mezcla de dos minutos siguiendo cada adición. Después de la adición y la mezcla del último componente las muestras se incubaron durante al menos 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se diluyeron 1:10 y 1:100 en agua libre de endotoxina y se analizaron para el contenido de endotoxina usando el kit EndoLISA (Hyglos GmbH). El porcentaje de recuperación de LPS se calculó con referencia al contenido de endotoxina determinado en el control tampón (analizado con más detalle en el Ejemplo 1).

Resultados

5 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 después de 3 días de incubación a temperatura ambiente.

Tabla 14a

tipo de muestra	ingredientes	polisorbato 20	polisorbato 80
		Recuperación de LPS (%)	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

10 La tabla 14b (a continuación) muestra el porcentaje de recuperación de LPS de una solución de anticuerpo después del desenmascaramiento que contiene polisorbato 20 o bien 80. Adicionalmente, muestra las concentraciones de las soluciones madre añadidas.

Tabla 14b

[CaCl ₂] (M)	[BSA] (mg/ml)	[SDS] (%)	[1-Dodecanol] (mM)	polisorbato 20	polisorbato 80
				Recuperación de LPS (%)	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

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

25 Las recuperaciones de LPS después del desenmascaramiento de los complejos de enmascaramiento que contienen LPS, detergente y anticuerpo son bajas usando 1-dodecanol solo (9 y 17 % para polisorbato 80 y 20, respectivamente). El uso de una combinación de BSA (modulador de adsorción) y 1-dodecanol (modulador de interrupción y reconfiguración) permitió recuperaciones de LPS moderadas 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 interrupción y reconfiguración), da como resultado recuperaciones del 67 % y el 91 % del LPS enmascarado para polisorbato 20 y 80, respectivamente. Curiosamente, se logró el desenmascaramiento usando una solución madre de 1-dodecanol con una concentración tan baja como 1 mM. Adicionalmente, en contraste al desenmascaramiento de los sistemas detergentes que carecen de proteína, el uso de 1-dodecanol (modulador de interrupción y reconfiguración) o BSA (modulador de adsorción) y 1-dodecanol (modulador de interrupción y reconfiguración) no desenmascaran con mayor eficiencia del 50 %. Como se muestra para la lisozima anteriormente, el desenmascaramiento eficiente solamente se logró en presencia de CaCl₂, BSA,

SDS y 1-dodecanol.

Ejemplo 14: Desenmascaramiento de composiciones que contienen anticuerpo y polisorbato 20 dependiendo de la sustancia tampón

5 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 eficiencia de desenmascaramiento. Con este fin, los presentes inventores eligieron tampón citrato 10 mM o fosfato 10 mM de pH 7,5, porque estos son los tampones más comúnmente usados en las formulaciones de fármacos de proteínas.

Materiales y métodos

15 El enmascaramiento de endotoxina se realizó como sigue: 50 UE/ml de endotoxina (E. coli O55:B5; Sigma L2637-5MG) se añadieron a alícuotas de 1 ml de una solución de anticuerpo que contiene 10 mg/ml de una preparación de anticuerpo IgG policlonal bovino, disuelto en fosfato sódico 10 mM que contiene cloruro sódico 50 mM o bien citrato sódico 10 mM pH 7,5 que contiene cloruro sódico 150 mM. Posteriormente, se añadió polisorbato 20 a una concentración final del 0,05 % y las muestras se enmascararon durante 3 días a temperatura ambiente. Además, 20 controles positivos que contenían la solución tampón sin detergente o anticuerpo, así como la solución tampón que contenía el anticuerpo o bien el polisorbato respectivo se prepararon y se trataron como las muestras de enmascaramiento. Cada uno de los controles positivos contenía la misma cantidad de LPS.

25 El desenmascaramiento de endotoxina se realizó como sigue: El desenmascaramiento se realizó mediante la adición de 1-dodecanol o bien una combinación de BSA (modulador de adsorción) y 1-dodecanol (modulador de interrupción y reconfiguración) o CaCl₂, BSA (modulador de adsorción), SDS (modulador de desplazamiento) y 1-dodecanol (modulador de interrupción y reconfiguración). Se añadieron 100 µl de cada una de las siguientes soluciones madre secuencialmente a 1 ml de la solución de muestra: CaCl₂ (1 M), BSA (10 mg/ml), SDS (1 %) y 1-dodecanol (100, 10 o 1 mM). Adicionalmente, antes de la adición de cloruro cálcico a una muestra que contiene tampón fosfato, esta 30 muestra se estabilizó contra la precipitación de fosfato cálcico por la adición de una concentración final de citrato sódico 200 mM pH 7,5. Todas las soluciones madre se añadieron secuencialmente con etapas de mezcla de dos minutos después de cada adición. Después de la adición y la mezcla del último componente las muestras se incubaron durante al menos 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se diluyeron 1:10 y 1:100 en agua libre de endotoxina y se analizaron para el contenido de endotoxina usando el kit EndoLISA (Hyglos 35 GmbH). El porcentaje de recuperación de LPS se calculó con referencia al contenido de endotoxina determinado en el control positivo (analizado con más detalle en el Ejemplo 1).

Resultados

40 La tabla 15 (a continuación) muestra el porcentaje de recuperación de LPS de una solución de anticuerpo después del enmascaramiento y del desenmascaramiento que contiene citrato o bien fosfato como sustancia tamponante.

Tabla 15

tipo de muestra	ingrediente	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/ingredientes de desenmascaramiento	Recuperación de LPS (%)	[1-dodecanol] (mM)	Recuperación de LPS (%)	[1-dodecanol] (mM)
muestra desenmascarada *	1-dodecanol	26	100	17	100

tipo de muestra	enfoque/ingredientes de desenmascaramiento	Recuperación de LPS (%)	[1-dodecanol] (mM)	Recuperación de LPS (%)	[1-dodecanol] (mM)
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 soluciones tampón que contienen anticuerpo pero no polisorbato, enmascaran del 60 % al 70 % del LPS (basándose en la recuperación del 40 % y aproximadamente el 30 % de LPS para los tampones citrato y fosfato, respectivamente). Las recuperaciones de LPS de las soluciones 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 después del desenmascaramiento de las composiciones que contienen LPS, detergente y anticuerpo son bajas usando 1-dodecanol solo (17 % y 26 % para fosfato y citrato, respectivamente) y moderadas usando una combinación de BSA (modulador de adsorción) y 1-dodecanol (modulador de interrupción y reconfiguración) (41 % y 49 % para fosfato y citrato, respectivamente). El desenmascaramiento usando una combinación de CaCl₂, BSA (modulador de adsorción), SDS (modulador de desplazamiento) y 1-dodecanol
- 15 (modulador de interrupción y reconfiguración) da como resultado recuperaciones del 67 % y el 87 % del LPS enmascarado para fosfato y citrato, respectivamente. Curiosamente, la concentración necesaria de solución madre de 1-dodecanol para el desenmascaramiento eficiente difiere fuertemente entre los sistemas tampón usados (100 mM para anticuerpo/detergente/citrato y 1 mM para anticuerpo/detergente/fosfato). Los datos muestran claramente que el desenmascaramiento eficiente de endotoxina en composiciones que comprenden tanto proteína (anticuerpo)
- 20 como detergente puede lograrse mediante el ajuste de la concentración de 1-dodecanol.

Ejemplo 15: Enmascaramiento y desenmascaramiento de una solución de anticuerpo que contiene LPS de fuente desconocida

- 25 Para mostrar que el desenmascaramiento no es solamente posible a partir de soluciones que contienen LPS de una fuente conocida, los presentes inventores ensayaron un anticuerpo monoclonal de ratón disponible en el mercado para uso diagnóstico que contiene una contaminación de LPS, donde la fuente del LPS es desconocida. Adicionalmente, este anticuerpo se disolvió en una composición tampón que corresponde a la formulación del producto de fármaco de anticuerpo conocido Rituximab (MabThera®, Rituxan®).

Materiales y métodos

- 35 Determinación de la contaminación de endotoxina: Un anticuerpo monoclonal de ratón (MAB 33, Roche Diagnostics) se disolvió en una solución que contenía citrato y cloruro sódico de pH 6,5 y se almacenó a 4 °C. Las concentraciones finales de citrato, cloruro sódico y anticuerpo fueron 25 mM, 150 mM y 10 mg/ml, respectivamente. Directamente después de la solubilización del anticuerpo, el contenido de endotoxina se analizó usando los kits de detección EndoZyme® y EndoLISA® (Hyglos GmbH). El contenido de endotoxina determinado fue 11 UE/mg de anticuerpo.
- 40 El enmascaramiento de LPS se inició mediante la adición de polisorbato 80 a una concentración final del 0,07 % y aumentando la temperatura a condiciones ambientales (22 °C). Posteriormente, se incubaron alícuotas de 1 ml de las muestras a temperatura ambiente durante 3 días para permitir que la endotoxina presente se vuelva enmascarada.
- 45 El desenmascaramiento se realizó como sigue: El desenmascaramiento se realizó por la adición de 1-dodecanol (modulador de interrupción y reconfiguración); o bien una combinación de BSA (modulador de adsorción) y 1-dodecanol (modulador de interrupción y reconfiguración); o una combinación de CaCl₂, BSA (modulador de adsorción), SDS (modulador de desplazamiento) y 1-dodecanol (modulador de interrupción y reconfiguración). Se añadieron 100 µl de cada una de las siguientes soluciones madre secuencialmente a 1 ml de la solución de muestra:
- 50 CaCl₂ (1 M), BSA (10 mg/ml), SDS (1 %) y 1-dodecanol (100, 10 o 1 mM). Todas las soluciones madre se añadieron secuencialmente con etapas de mezcla de dos minutos después de cada adición. Después de la adición y la mezcla del último componente las muestras se incubaron durante al menos 30 minutos a temperatura ambiente.
- 55 Posteriormente, las muestras se diluyeron 1:10 y 1:100 en agua libre de endotoxina y se analizaron para el contenido de endotoxina usando EndoLISA® (Hyglos GmbH). El porcentaje de recuperación de LPS se calculó en referencia al contenido de endotoxina determinado a tiempo cero.

Resultados

La Tabla 16 (a continuación) muestra el porcentaje de recuperación de endotoxina dependiendo del tiempo de enmascaramiento, de la presencia o ausencia de polisorbato 80 y del desenmascaramiento de la solución de anticuerpo/polisorbato 80.

Tabla 16

tipo de muestra	ingredientes	Recuperación de LPS (%)	
control t(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/ingredientes de desenmascaramiento	Recuperación de LPS (%)	[1-dodecanol] (mM)
muestra desenmascarada *	1-dodecanol	45	100
muestra desenmascarada *	BSA/1-dodecanol	68	100

* Las muestras "desenmascaradas" contenían anticuerpo.

10 Los datos muestran que la solución tampón que contenía anticuerpo pero no polisorbato enmascara el 40 % del LPS en 3 días de incubación a temperatura ambiente. Sin embargo, la incubación en tampón que contiene polisorbato 80 o bien anticuerpo y polisorbato 80, da como resultado recuperaciones de endotoxina más pequeñas del 4 %.

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

20 Los experimentos descritos en este ejemplo muestran que, cuando está presente, la endotoxina de origen natural (Natural Occuring Endotoxin, NOE) puede detectarse por un sistema de detección de endotoxina adecuado. Adicionalmente, estos experimentos muestran que tal NOE puede enmascarse de la manera descrita anteriormente en el presente documento, es decir, el peligro del enmascaramiento se aplica no solamente para la endotoxina purificada, sino también para la NOE. La capacidad de los métodos de la invención como se describen en el presente documento de desenmascarar tal NOE demuestra adicionalmente su aplicabilidad en situaciones en las cuales NOE se ha enmascarado, demostrando su eficacia de los métodos de la invención para desenmascarar la NOE enmascarada. Estos descubrimientos son relevantes para las condiciones prevalentes en la industria, donde los procesos de producción a menudo comienzan con una proteína expresada en presencia de NOE y la última se enmascara por la incorporación de detergente para evitar la agregación de proteína indeseada. Globalmente, entonces, los resultados de los experimentos descritos en este ejemplo demuestran que los métodos de la invención son capaces de desenmascarar endotoxina en condiciones de relevancia para la industria farmacéutica.

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

40 En los tres casos de enmascaramiento en soluciones de anticuerpo (Ejemplos 13, 14 y 15), puede verse que el enmascaramiento no solo es debido al componente detergente en la composición sino también en algún grado al propio anticuerpo. El enfoque de desenmascaramiento más eficiente es el uso de una combinación de CaCl₂, BSA (modulador de adsorción), SDS (modulador de desplazamiento) y 1-dodecanol (modulador de interrupción y reconfiguración) para desenmascarar la endotoxina. En este caso, pueden verse analogías al caso de la lisozima (analizado en el Ejemplo 7 anterior), en donde la propia proteína juega un papel como un enmascarador de endotoxina. Curiosamente, en todos los casos, la concentración de 1-dodecanol debe optimizarse para el desenmascaramiento eficiente.

45 Ejemplo 16: Evaluación general del enfoque de desenmascaramiento aplicado a una nueva composición en cuestión

Como se muestra en los ejemplos anteriores, la elección del enfoque tomado para desenmascarar la endotoxina sospechada de estar presente, pero enmascarada en una composición dependerá de un número de factores. Por

ejemplo, como han mostrado los ejemplos anteriores, a veces es posible lograr un desenmascaramiento eficiente usando un modulador mono-componente que dobla como un modulador de interrupción y un modulador de reconfiguración, como se define anteriormente en el presente documento. Por otro lado, en algunos casos, el modulador debe ser un sistema modulador con dos o más componentes, por ejemplo un modulador de desplazamiento y/o un modulador de adsorción, dependiendo de qué medidas se necesitan para desestabilizar e interrumpir la endotoxina/el complejo endotoxina enmascarador suficientemente de tal manera que la endotoxina se libere y pueda medirse en una forma agregada que pueda detectarse.

Los ejemplos anteriores empiezan a partir de condiciones conocidas controladas para ilustrar conceptos subyacentes a la presente invención. En un escenario en el mundo real, sin embargo, en donde los métodos de la invención han de 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 una validación tal, exponiendo un esquema genérico por el cual los métodos de la invención pueden calibrarse a una nueva composición en cuestión. Con este fin, es necesario un enfoque de desenmascaramiento iterativo, empezando con una exploración inicial del enfoque de desenmascaramiento más adecuado seguido de las posteriores etapas de mejora para el ajuste de las concentraciones óptimas del componente de desenmascaramiento.

Descripción general de un proceso de evaluación para una composición dada

En general, la Figura 12 muestra un esquema que expone esquemáticamente las etapas que uno tomaría normalmente al evaluar los métodos de la invención para una composición nueva desconocida.

Como estará claro a partir de lo anterior, la detección última de la endotoxina inicialmente enmascarada depende de la capacidad de convertir esta endotoxina de forma establemente unida (enmascarada) a una forma agregada que está desenmascarada y por lo tanto 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). La etapa 2 después optimiza la concentración de modulador de adsorción, si este modulador se incluye. La etapa 3 después optimiza la concentración de modulador de desplazamiento, si este modulador se incluye.

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

Descripción específica de un proceso de evaluación para una composición dada

La Figura 13 muestra las combinaciones y las concentraciones de soluciones madre para seleccionar y optimizar el proceso de desenmascaramiento. Los enfoques de desenmascaramiento se dividen en tres posibles escenarios A, B y C, dependiendo de qué sustancia o combinación de sustancias se usa o usan al desenmascarar. El enfoque A de desenmascaramiento describe un enfoque de desenmascaramiento en donde solamente se usa 1-dodecanol como un modulador. El enfoque B de desenmascaramiento describe un enfoque de desenmascaramiento en donde el sistema modulador está compuesto por 1-dodecanol y BSA. El enfoque C de desenmascaramiento describe un enfoque de desenmascaramiento en donde el sistema modulador está compuesto por 1-dodecanol, BSA y SDS y se realiza en presencia de CaCl_2 .

Procedimiento

Añadir 100 μl de las soluciones madre de componente de desenmascaramiento a 1 ml de muestra enmascarada. Después de la adición de un componente, mezclar la muestra exhaustivamente sometiendo a vórtex durante 2 minutos. Después, añadir el siguiente componente y mezclar. Después de la adición de todos los componentes y la posterior mezcla, incubar las muestras durante > 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, analizar las muestras para el contenido de endotoxina usando un método de ensayo de endotoxina apropiado, por ejemplo, el kit EndoLISA® de Hyglos GmbH.

REIVINDICACIONES

1. Un método para desenmascarar una endotoxina en una composición, preferentemente una composición farmacéutica, que comprende un enmascarador de endotoxina y que se sospecha que comprende dicha endotoxina, comprendiendo dicho método las etapas de añadir a dicha composición un modulador capaz de desenmascarar dicha endotoxina,
 5 en el que dicho enmascarador de toxina es una sustancia que, en solución con endotoxina, hace a la endotoxina indetectable por métodos de detección disponibles y
 en el que dicho modulador comprende un primer alifático sustituido con heteroátomos, en el que dicho primer alifático sustituido con heteroátomos es un alcohol alifático que comprende 8 a 16 átomos de carbono.
2. Un método para detectar una endotoxina en una composición, preferentemente una composición farmacéutica, que comprende un enmascarador de endotoxina y que se sospecha que comprende dicha endotoxina, comprendiendo dicho método las etapas de:
 15
- añadir a dicha composición un modulador capaz de desenmascarar dicha endotoxina; y
 - detectar dicha endotoxina por medio de un método de detección,
- 20 en el que dicho enmascarador de toxina es una sustancia que, en solución con endotoxina, hace a la endotoxina indetectable por métodos de detección disponibles y
 en el que dicho modulador comprende un primer alifático sustituido con heteroátomos, en donde dicho primer alifático sustituido con heteroátomos es un alcohol alifático que comprende 8 a 16 átomos de carbono.
- 25 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende además la etapa de añadir a dicha composición un agente que influye en la estabilidad de unión de hidrógeno en solución, en el que el agente que influye en la estabilidad de unión de hidrógeno en solución es un agente caotrópico, un catión o una combinación de los mismos.
- 30 4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho agente que influye en la estabilidad de unión de hidrógeno en solución se añade antes de la adición de dicho modulador.
5. El método de acuerdo con las reivindicaciones 3 o 4, en el que dicho agente caotrópico se elige del grupo que consiste en: urea; cloruro de guanidinio; butanol; etanol; perclorato de litio; acetato de litio; cloruro magnésico; fenol; propanol; y tiourea.
- 35 6. El método de acuerdo con las reivindicaciones 3 a 5, en el que el catión es un catión divalente.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el catión divalente se elige de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} y Zn^{2+} .
- 40 8. Uso de un modulador capaz de desenmascarar una endotoxina para desenmascarar una endotoxina en una composición que se sospecha que comprende dicha endotoxina y dicho enmascarador de endotoxina, en el que dicho modulador comprende un primer alifático sustituido con heteroátomos, en el que dicho primer alifático sustituido con heteroátomos es un alcohol alifático que comprende 8 a 16 átomos de carbono y
 45 en el que dicho enmascarador de toxina es una sustancia que, en solución con endotoxina, hace a la endotoxina indetectable por métodos de detección disponibles.
9. El método o el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho alcohol alifático es 1-dodecanol.
- 50 10. El método o el uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicho modulador comprende además un segundo alifático sustituido con heteroátomos, en donde la cadena principal de dicho segundo alifático sustituido con heteroátomos comprende 8 a 16 átomos de carbono.
11. El método o el uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicho segundo alifático sustituido con heteroátomos es un alifático sustituido con oxígeno.
- 55 12. El método o el uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicho alifático sustituido con oxígeno es un sulfato alifático.
- 60 13. El método o el uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que dicho sulfato alifático es dodecil sulfato sódico (SDS).
14. El método o el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9-13, en el que dicho modulador comprende además una proteína capaz de unirse a un detergente de tal manera que rompa las micelas formadas por dicho detergente.
- 65

15. El método o el uso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que dicha proteína es una albúmina.
16. El método o el uso de acuerdo con la reivindicación 15, en el que dicha albúmina es seroalbúmina humana, seroalbúmina bovina y/u ovoalbúmina.
- 5 17. El método o el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho enmascarador de endotoxina es un detergente y/o un ingrediente farmacéutico activo (API).
- 10 18. El método o el uso de acuerdo con la reivindicación 17, en el que el detergente se elige del grupo que consiste en un detergente aniónico; un detergente catiónico; un detergente no iónico; un detergente anfótero; y cualquier combinación de los mismos.
- 15 19. El método o el uso de acuerdo con la reivindicación 18, en el que dicho detergente aniónico se elige del grupo que consiste en: sulfatos de alquilo, preferentemente lauril sulfato de amonio o lauril sulfato sódico (SDS); éter sulfatos de alquilo, preferentemente laureth sulfato sódico o mireth sulfato sódico; sulfato de colesterol; sulfonatos, preferentemente dodecibencensulfonato, sodiolauril sulfoacetato o xilen sulfonato; sulfo succinatos de alquilo, preferentemente lauril sulfosuccinato disódico; sulfóxidos, preferentemente dodecil metil sulfóxido; fosfatos, preferentemente trilauret-4 fosfato; y carboxilatos, preferentemente estearato sódico o lauroil sarcosinato sódico.
- 20 20. El método o el uso de acuerdo con la reivindicación 18, en el 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 (preferentemente bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB); o cloruro de cetil trimetilamonio (CTAC)); cloruro de cetilpiridinio (CPC); detergentes de amonio cuaternario, preferentemente fosfato de tris[2-(2-hidroxietoxi)etil]-octadecil-amonio (Quaternium 52); y etoxilato de hidroxietilcelulosa, cuaternizado (Polyquaternium-10).
- 25 21. El método o el uso de acuerdo con la reivindicación 18, en el que dicho detergente no iónico se elige del grupo que consiste en: alquil ésteres de polioxietilenglicol sorbitán (polisorbatos), preferentemente polisorbato 20 (Tween-20), polisorbato 40, polisorbato 60 o polisorbato 80 (Tween-80); alquil ésteres de polioxietilenglicol; alquil ésteres de polioxipropilenglicol; alquil ésteres de glucósido; octilfenol ésteres de polioxietilenglicol; alquilfenol ésteres de polioxietilenglicol; alquil ésteres de glicerol; alquil ésteres de sorbitán; copolímeros en bloque de polietilenglicol y polipropilenglicol; cocamida MEA; esteroides, preferentemente colesterol; ciclodextrinas; poloxámeros, preferentemente polímeros en bloque Pluronic; y cocamida DEA.
- 30 22. El método o el uso de acuerdo con la reivindicación 18, en el que dicho detergente anfótero se elige del grupo que consiste en: CHAPS (3-[(3-Colamidopropil)dimetilamonio]-1-propansulfonato); sultaínas, preferentemente cocamidopropil hidroxisultaína; betaínas, preferentemente cocamidopropil betaína; óxidos de amino, preferentemente óxido de palmitamina, óxido de laurilamina y óxido de amina de fórmula general $R^3N^+O^-$, en donde R^3 es alquilo C_8-C_{18} , alquenilo C_8-C_{18} o alquinilo C_8-C_{18} ; y lecitina.
- 35 23. El método o el uso de acuerdo con la reivindicación 17, en el que dicho API es un API de proteína.
- 40 24. El método o el uso de acuerdo con la reivindicación 23, en el que la proteína se elige del grupo que consiste en 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 25. El método o el uso de acuerdo con la reivindicación 24, en el que el fragmento de anticuerpo se elige del grupo que consiste en un Fab; un Fab'; un F(ab')₂; un Fv; un anticuerpo de cadena única; y cualquier combinación de los mismos.
- 50 26. El método o el uso de acuerdo con la reivindicación 24, en el que el anticuerpo se elige del grupo que consiste en un anticuerpo completamente humano; un anticuerpo antiidiotípico; un anticuerpo humanizado; un anticuerpo biespecífico; un anticuerpo quimérico; un anticuerpo de CDR injertada; un anticuerpo monoclonal; un anticuerpo policlonal; y cualquier combinación de los mismos.
- 55

Figura 1

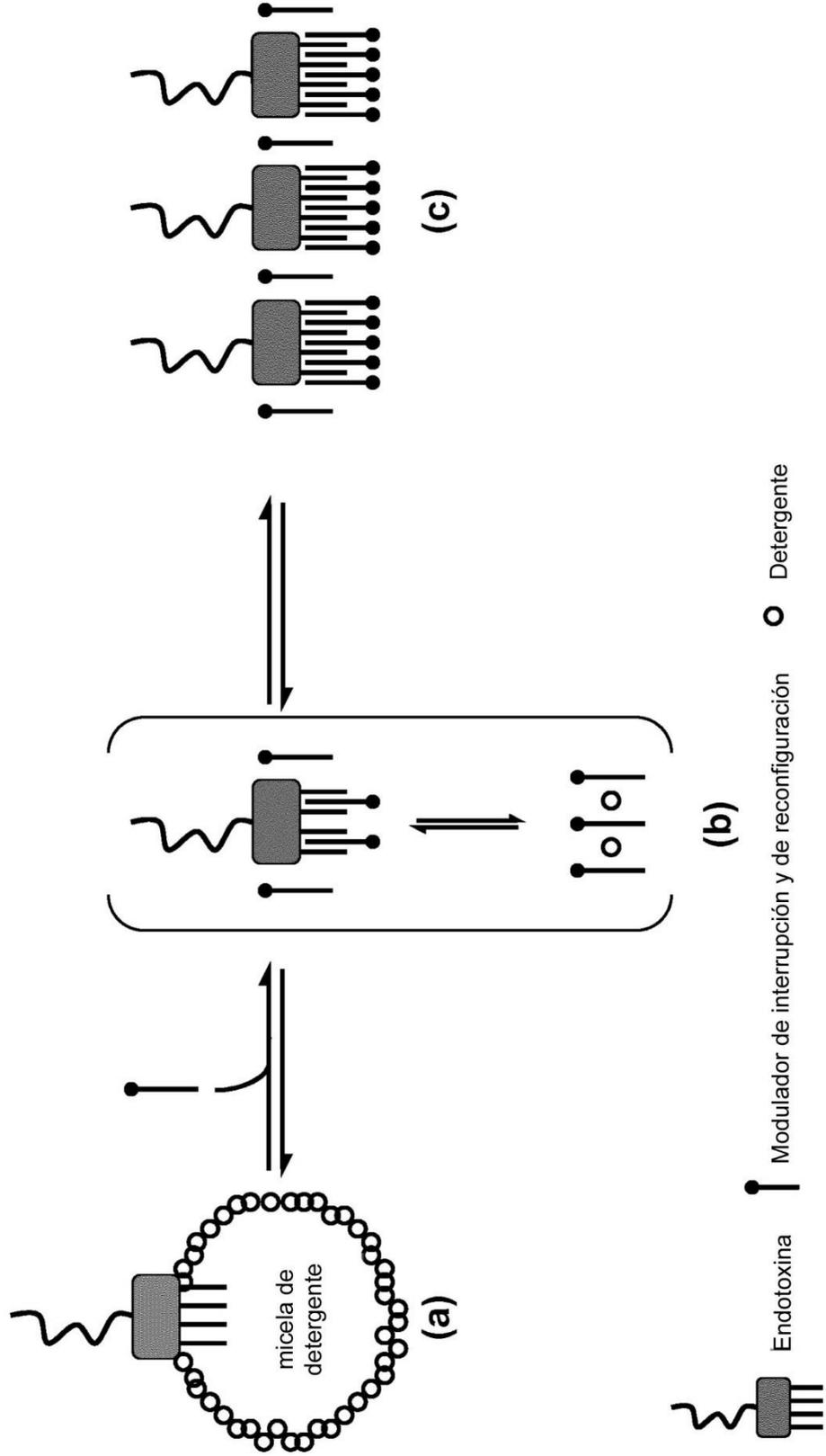


Figura 2

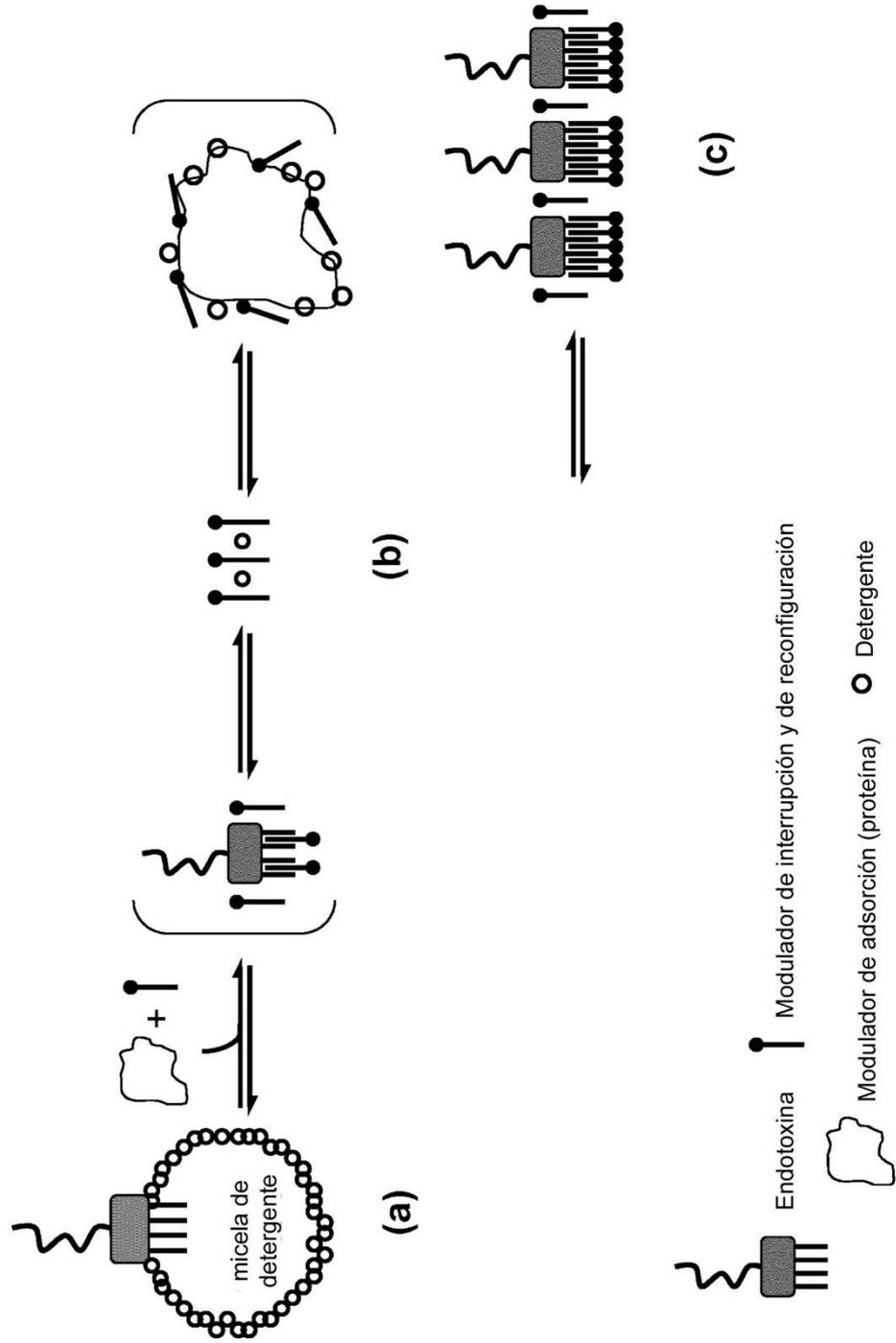


Figura 3

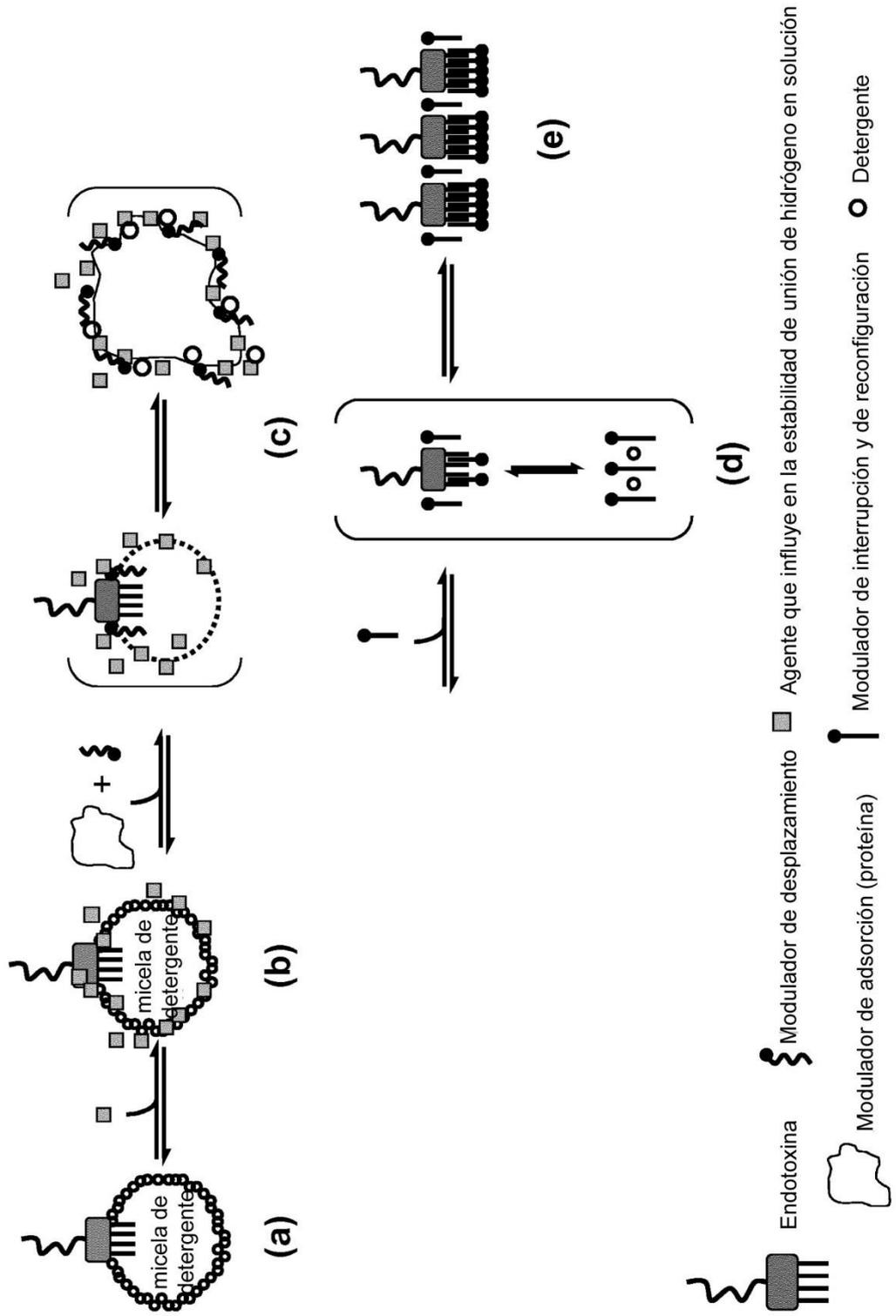


Figura 4

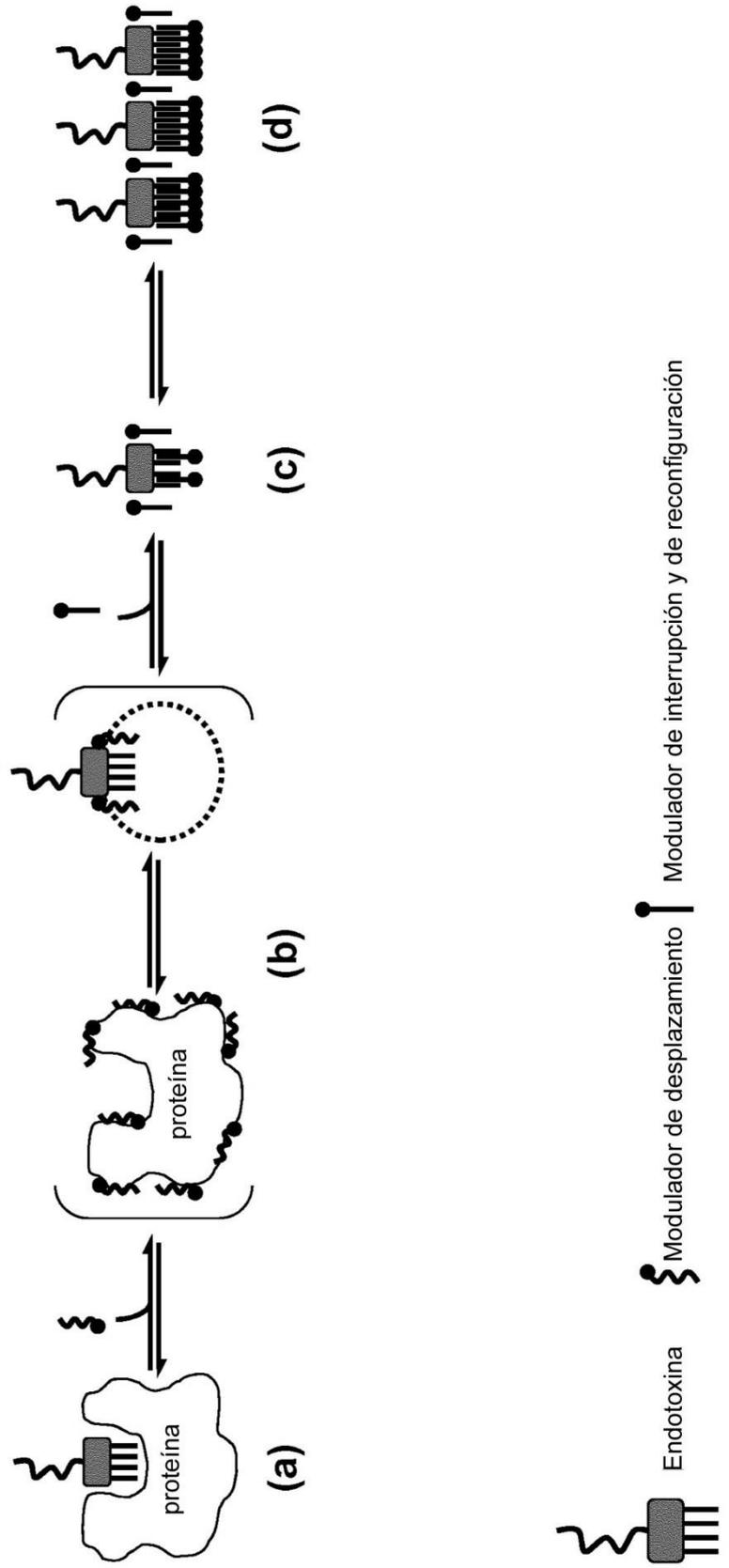


Figura 5

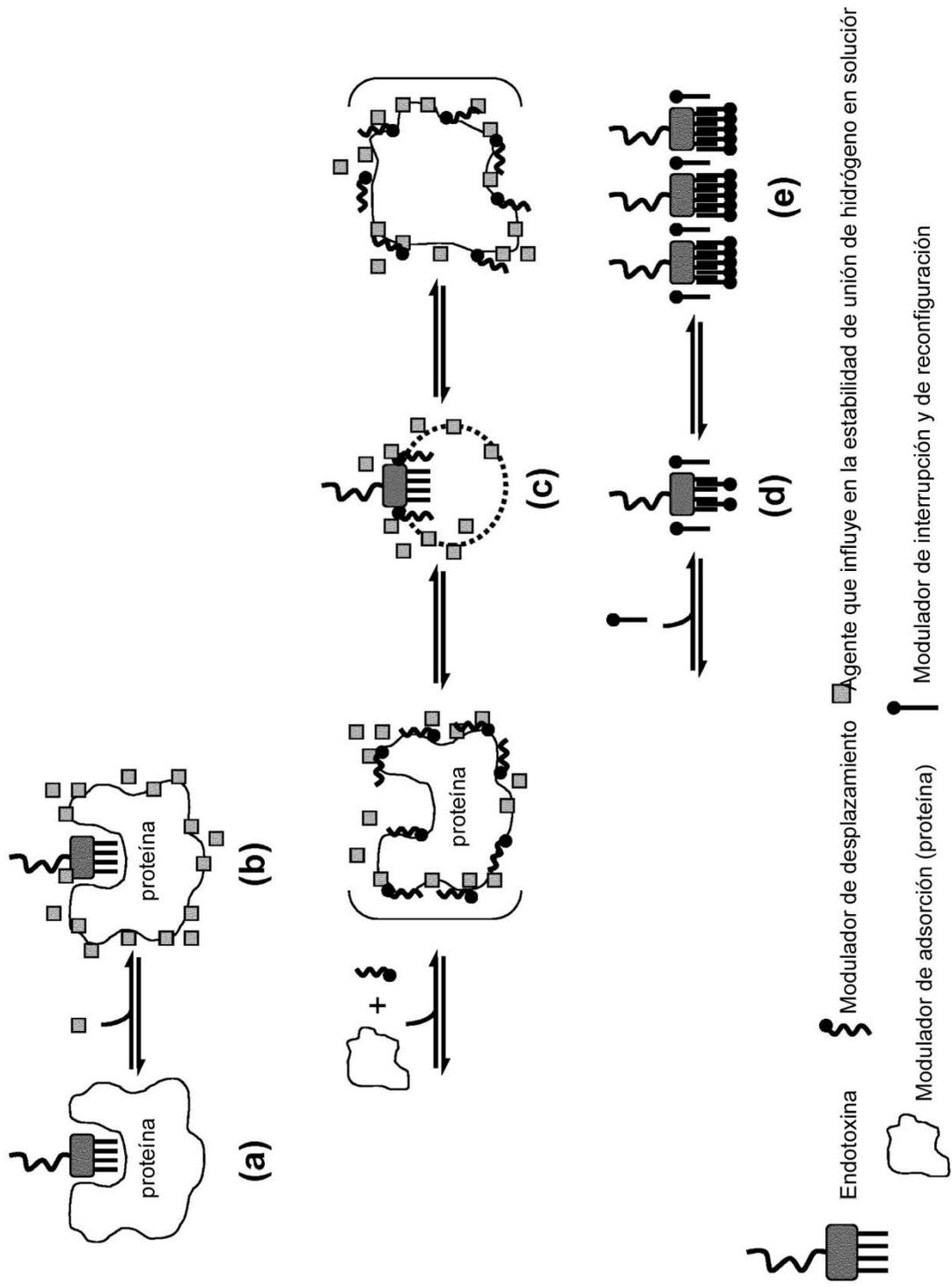


Figura 6

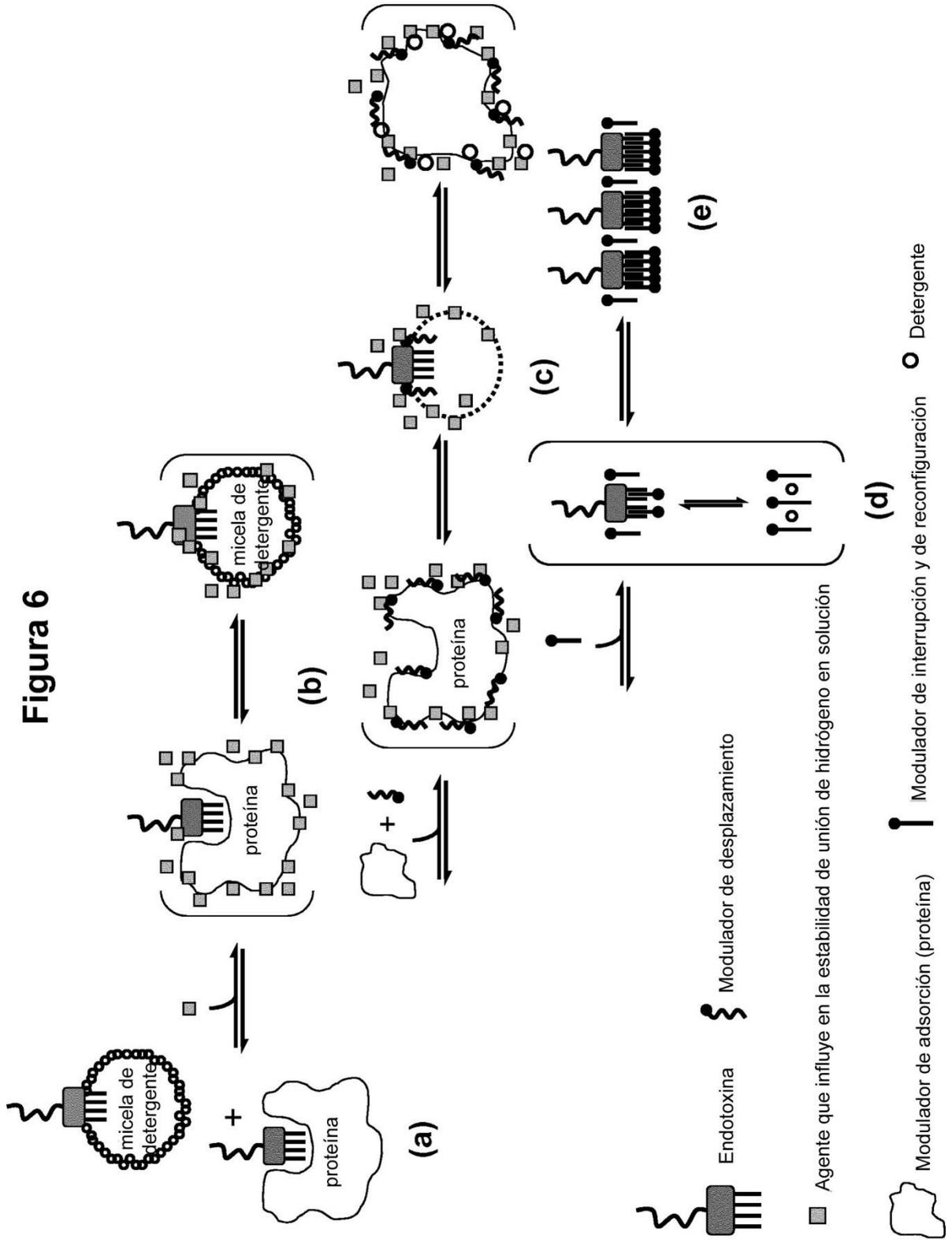
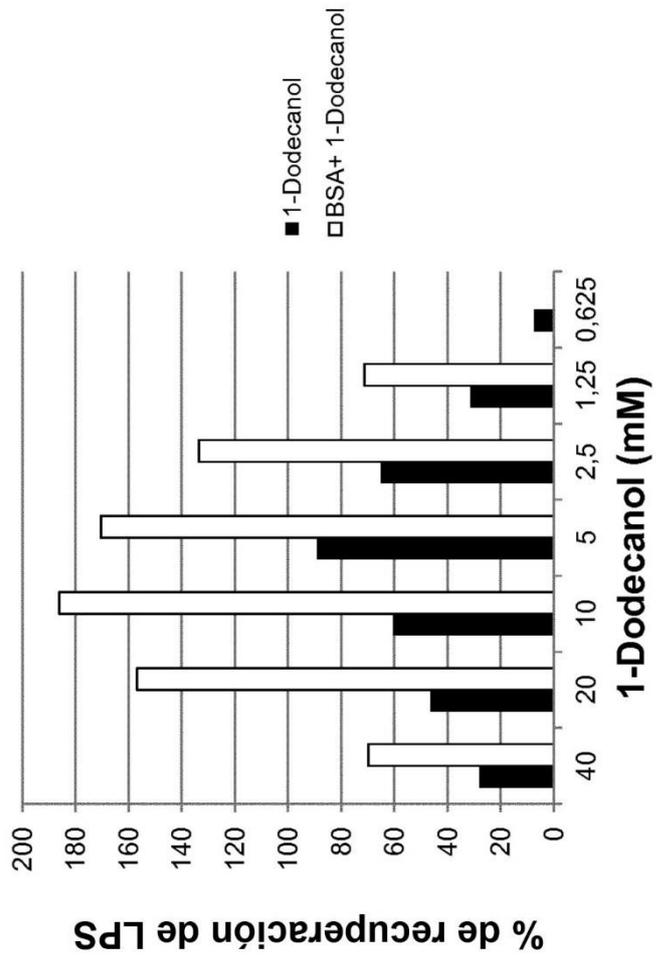


Figura 7



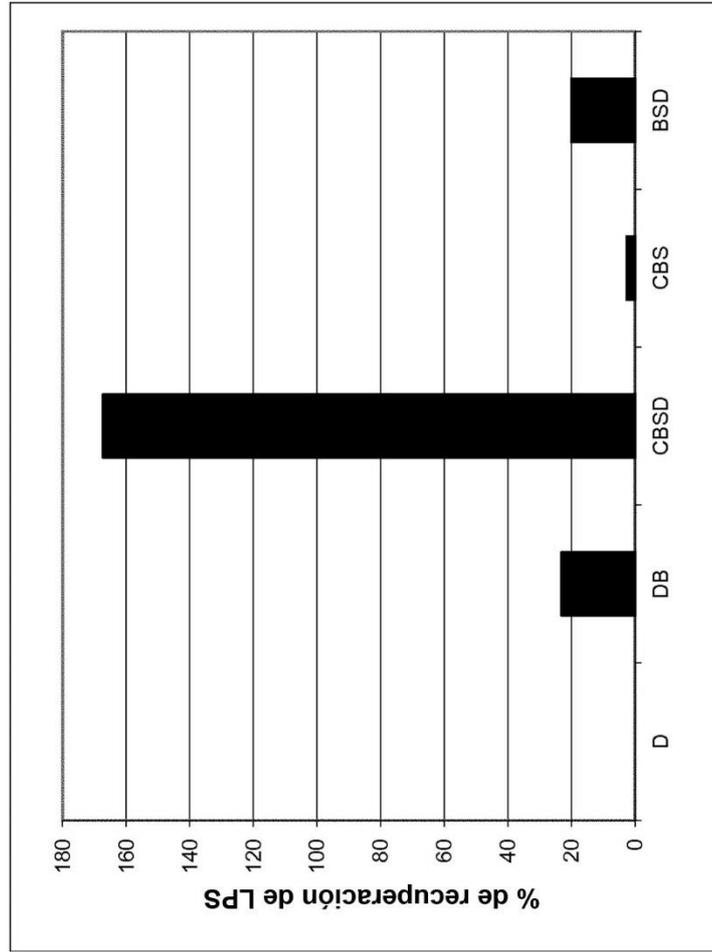


Figura 8

Figura 9

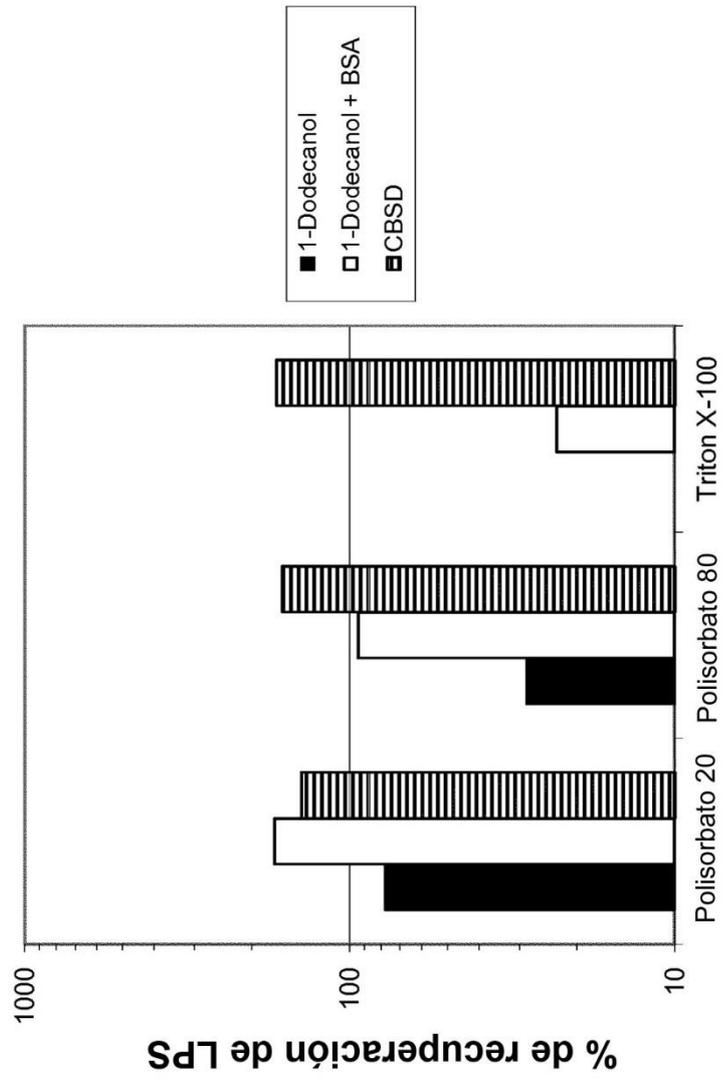


Figura 10

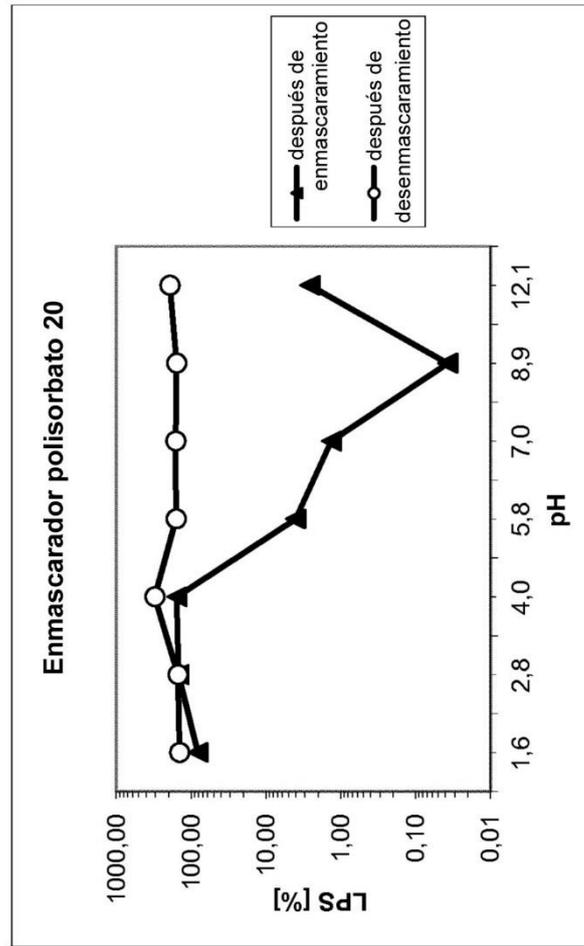
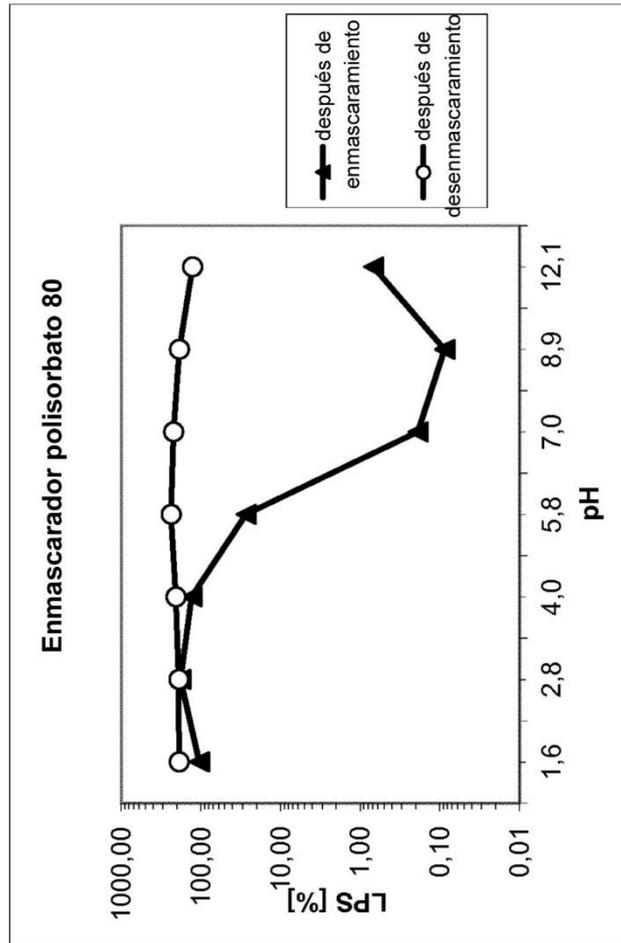


Figura 11



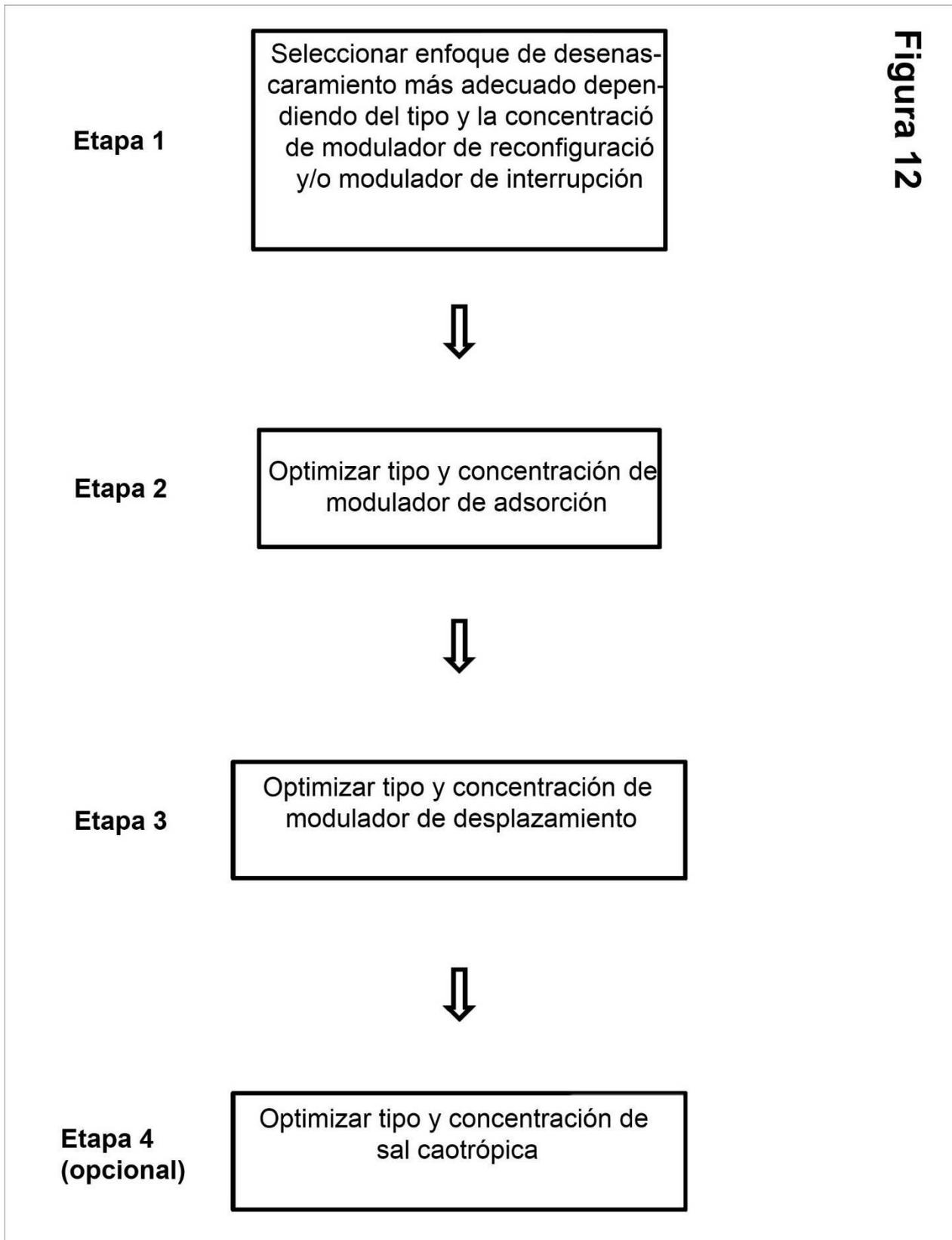


Figura 12

Figura 13

Etapa 1

Enfoque de desenmascaramiento	Sal caotrópica [CaCl ₂] (M)	Modulador de adsorción [BSA] (mg/ml)	Modulador de desplazamiento [SDS] (%)	Modulador de reconfiguración [1-Dodecanol] (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



Etapa 2

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

Etapa 3

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



Etapa 4

Enfoque de desenmascaramiento	Influenciador de unión de H [CaCl ₂] (mM)
C	1000
C	100
C	10



Figura 14

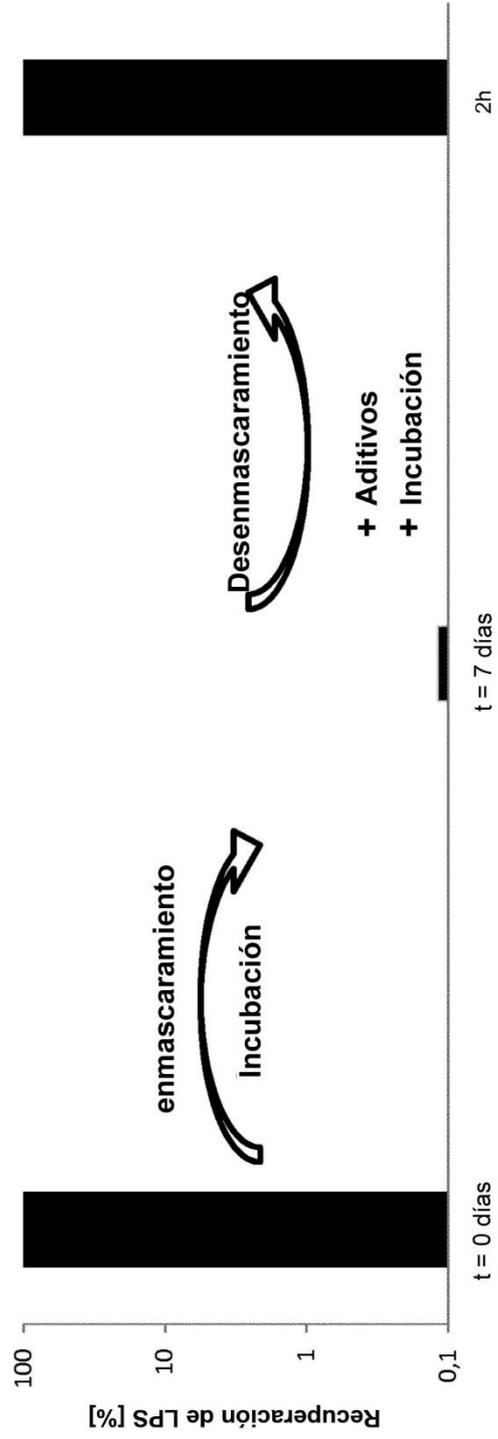


Figura 15

