

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 748 512**

51 Int. Cl.:

C08B 37/00 (2006.01)

C12P 19/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.05.2011 PCT/EP2011/058016**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.11.2011 WO11144645**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2011 E 11721756 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019 EP 2571902**

54 Título: **Procedimiento novedoso**

30 Prioridad:
20.05.2010 GB 201008401

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.03.2020

73 Titular/es:
**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (100.0%)
Rue de l'Institut, 89
1330 Rixensart, BE**

72 Inventor/es:
**CHARLES, PHILIPPE;
GELDHOF, GEOFFROY y
MANCUSO, VINCENT**

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 748 512 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento novedoso

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de la producción biosintética de lipopolisacáridos (LPS). Específicamente, la presente invención se refiere a procedimientos y composiciones mejorados para la extracción de LPS a partir de células bacterianas, tales como células obtenidas por cultivo de células bacterianas. Estos procedimientos y composiciones de la invención son útiles en la producción de LPS, derivados de LPS y, en particular, en la producción de monofosforil lípido A 3-O-desacilado (3D-MPL).

Antecedentes

10 Los lipopolisacáridos (LPS) son la principal molécula de superficie de, y se encuentran exclusivamente en, la capa externa de la membrana externa de las bacterias gramnegativas. Los LPS impiden la destrucción de las bacterias por los complementos del suero y las células fagocíticas y están implicados en la adherencia para la colonización. Los LPS son un grupo de moléculas complejas estructuralmente relacionadas de aproximadamente 10.000 Dalton de tamaño y consisten en tres regiones unidas covalentemente (como se muestra en la Figura 5):

- 15 (i) una cadena polisacáridica específica de O (antígeno O) en la región externa
- (ii) una región central oligosacáridica de núcleo
- (iii) lípido A - la región más interna que sirve como ancla hidrófoba, comprende unidades disacáridicas de glucosamina que transportan ácidos grasos de cadena larga.

Sumario de la invención

20 Es un objeto de la presente invención proporcionar procedimientos para la extracción de LPS que den como resultado rendimientos bacterianos mejorados de LPS. Los rendimientos de LPS pueden calcularse a partir de la cantidad de células bacterianas producidas (biomasa). Los rendimientos de LPS mejorados permiten que se produzcan mayores cantidades de LPS en una instalación dada, o que se produzcan cantidades equivalentes de LPS usando instalaciones más pequeñas. La presente divulgación describe un procedimiento para la extracción de LPS que muestra una mayor

25 fiabilidad y/o reproducibilidad del rendimiento de LPS extraídos de las células bacterianas. En la presente divulgación se describe adicionalmente un procedimiento más rápido para la extracción de LPS.

En consecuencia, se proporciona un procedimiento de extracción de lipopolisacáridos (LPS) a partir de células bacterianas gramnegativas que comprende la etapa de: extraer LPS a partir de las células en una composición de extracción de LPS que comprende cloroformo, metanol y agua, en la que la composición de extracción de LPS es monofásica y en la que la cantidad de agua en la composición de extracción de LPS es de entre el 0,4 y el 1,5 % (v/v), el porcentaje de metanol en la composición de extracción de LPS es de entre el 5 % y el 40 % (v/v) y en la que el porcentaje de cloroformo en la composición de extracción de LPS es de entre el 60 % (v/v) y el 95 % (v/v).

30

Breve descripción de las figuras

Figura 1 Cinética de extracción del caldo de células 101B a 50 °C

35 **Figura 2** Datos de reproducibilidad del caldo 101B

Figura 3A: Distribución de los rendimientos de extracción de 80 experimentos con un 0 % de agua

Figura 3B: Distribución del rendimiento de extracción de 55 experimentos con un 1 % de agua

Figura 4 Efecto del pH

40 La **Figura 5** muestra las tres regiones unidas covalentemente de una molécula de LPS: (i) una cadena polisacáridica específica de O (antígeno O) en la región externa; (ii) una región central oligosacáridica de núcleo; y (iii) lípido A.

La **Figura 6** muestra LPS truncados producidos por el mutante *S. minnesota* R595, e indica la ubicación del truncamiento con respecto al LPS de longitud completa.

Descripción detallada de la invención

45 Las técnicas conocidas de extracción de LPS incluyen el procedimiento de Galanos, que implica extraer LPS con una mezcla de fenol, cloroformo y éter de petróleo (PCP), seguido de evaporación del cloroformo y éter de petróleo, adición de acetona y agua para precipitar LPS y recuperación de LPS mediante centrifugación o filtración (Galanos y col., *Eur. J. Biochem.* 9: 245 (1969)). El procedimiento de Chen implica extraer LPS con una mezcla de cloroformo y metanol (CM), seguido de una serie de etapas de precipitación de metanol. El procedimiento de Galanos no es adecuado para

la producción comercial de LPS, ya que no es apto para la producción a gran escala y usa mezclas de disolventes (por ejemplo, fenol:cloroformo:éter de petróleo) que plantean problemas de salud y seguridad. El procedimiento de Chen da como resultado una fase de CM rica en LPS y fosfolípidos que normalmente requiere múltiples etapas de precipitación para obtener LPS de suficiente pureza para su uso en aplicaciones inmunoestimulantes, tales como, por ejemplo, el uso como adyuvante de vacuna. El documento WO02/078637 desvela procedimientos para la producción de LPS y 3D-MPL usando una cepa mutante rugosa profunda de bacterias gramnegativas (en particular, *Salmonella minnesota* R595). Los procedimientos del documento WO02/078637 muestran una gran variabilidad de rendimiento que varían en rendimientos del 2 % al 12 %. Se necesitan procedimientos mejorados de extracción de LPS.

Los inventores han demostrado que, mediante el uso de agua en la etapa de extracción de LPS además de un alcohol y un disolvente orgánico adicional, puede conseguirse un mayor rendimiento de LPS en comparación con un procedimiento equivalente en el que no se usa agua en la etapa de extracción de LPS. Los presentes inventores han demostrado que pueden extraerse lipopolisacáridos a partir de bacterias gramnegativas mediante el uso de una composición de extracción que comprende agua que produce más LPS, con mayor fiabilidad y en un período de tiempo más corto en comparación con composiciones equivalentes que carecen de agua y sin determinadas desventajas asociadas a otros procedimientos de extracción. Además de un rendimiento aumentado en LPS, los presentes inventores han demostrado que mediante el uso de agua en la composición de extracción de LPS (agua, alcohol y disolvente orgánico) este mayor rendimiento puede conseguirse con mayor fiabilidad y en menos tiempo que sin agua.

La expresión "rendimiento de LPS" como se usa en el presente documento significa la cantidad de LPS obtenida como porcentaje del peso de células bacterianas secas (PCS).

En consecuencia, se describe un procedimiento de extracción de lipopolisacáridos (LPS) a partir de cultivo de células bacterianas que comprende la etapa de extraer LPS a partir de las células usando una composición de extracción de LPS que comprende agua, un alcohol y un disolvente orgánico adicional. Por "extracción de LPS" o "extracción de LPS a partir de una célula bacteriana" se entiende que el LPS se retira directamente de la membrana externa bacteriana.

Se describe adicionalmente una composición de extracción de LPS. Por "composición de extracción de LPS" se entiende una composición/mezcla utilizada en la etapa de extracción de LPS en la que el lipopolisacárido se extrae directamente de las membranas de las bacterias. La composición de extracción de LPS que se describe en el presente documento comprende agua, un alcohol y un disolvente orgánico adicional, y es útil en los procedimientos de extracción de LPS de la invención. La composición de extracción de LPS como se describe en el presente documento es una composición de extracción monofásica. Por "fase única" se entiende que los líquidos forman una única solución homogénea en lugar de una mezcla en la que los líquidos son inmiscibles.

El término "agua" (H₂O) es bien conocido por los expertos en la materia. El término abarca agua pura y sustancialmente pura (H₂O) (incluyendo agua obtenida por destilación, desionización, tratamiento de intercambio iónico u ósmosis inversa) y agua que comprende impurezas menores, ya que para el experto en la materia está claro que el agua normalmente comprende algunas impurezas. Los expertos en la materia conocen bien las impurezas del agua que incluyen iones inorgánicos, moléculas orgánicas, partículas, coloides, gases disueltos, microorganismos y sus subproductos. El agua puede ser estéril porque prácticamente hay ausencia de microorganismos vivos. Como alternativa, el agua puede filtrarse.

La presente invención puede usar adicionalmente soluciones acuosas, por ejemplo, agua que comprende adicionalmente un álcali. Las composiciones que se describen en el presente documento pueden no comprender agua en la que se disuelva un ácido. Por ejemplo, el pH del agua puede ser neutro, es decir, aproximadamente de pH 7. En el presente documento se describe una composición de extracción de LPS que comprende agua, un alcohol y un disolvente orgánico, en la que el pH del agua es superior a 7. Se describe adicionalmente una composición de extracción de LPS en la que el pH de la composición de extracción de LPS no es inferior a 7. El pH del agua puede elevarse a través de la adición de uno o más álcalis seleccionados entre el grupo: hidróxido de sodio (NaOH), trietilamina (TEA) y bicarbonato de potasio (KHCO₃).

El término "agua" también abarca agua desionizada. Los expertos en la materia conocen bien la expresión agua desionizada, pero, brevemente, el agua desionizada es agua en la que se retiran sustancialmente todos los iones minerales. El nivel de desionización puede medirse a través de la conductividad y, en una realización particular, el agua desionizada tiene una conductividad máxima de 1 µsiemens/cm. No es necesario añadir el agua utilizada en la invención por separado de los otros constituyentes de la composición de extracción de LPS. Por ejemplo, el agua en la composición de extracción de LPS puede derivar de la solución de alcohol que comprende tanto alcohol como agua y, por tanto, el experto necesita solamente mezclar el alcohol y el disolvente orgánico para proporcionar la composición de LPS que comprende un alcohol, un disolvente orgánico y agua.

Como ya se ha indicado, los presentes inventores han demostrado que la adición de agua a las composiciones de extracción que comprenden un alcohol y un disolvente orgánico adicional, da como resultado un mayor rendimiento de LPS y/o una mayor uniformidad del rendimiento de LPS. En consecuencia, se proporciona una composición de extracción de LPS para su uso en el procedimiento de la invención que comprende agua, un alcohol y un disolvente orgánico adicional, en la que la cantidad de agua en la composición de extracción de LPS está entre aproximadamente

5 el 0,1 y aproximadamente el 1,5 % (v/v). Las composiciones de extracción de LPS utilizadas en el procedimiento de la invención comprenden aproximadamente del 0,4 % al 1,5 % de agua (v/v), por ejemplo, el 0,4, el 0,5, el 0,6, el 0,7, el 0,8, el 0,9, el 1,0, el 1,1, el 1,2, el 1,3, el 1,4 o el 1,5 % (v/v). En una realización del procedimiento de la invención, la cantidad de agua en las composiciones de extracción de LPS es de aproximadamente el 1 % (v/v), es decir, de entre el 0,8 y el 1,2 % (v/v).

Las composiciones de extracción de LPS que se describen en el presente documento comprenden un disolvente orgánico además de un alcohol. La expresión "disolvente orgánico" es bien conocida en la técnica. Los disolventes orgánicos son productos químicos que contienen carbono y que son capaces de disolver un soluto sólido, líquido o gaseoso en una solución.

10 Dichas composiciones de extracción de LPS pueden comprender disolventes orgánicos que pueden seleccionarse entre el grupo: cloroformo, alcanos, tolueno y éter de petróleo. El cloroformo es bien conocido por los expertos en la materia y se representa por la fórmula química CHCl_3 . Los alcanos también son bien conocidos en la técnica. Los alcanos son hidrocarburos saturados sin ninguna estructura cíclica. Las composiciones de extracción de LPS para su uso en el procedimiento de la invención pueden comprender un alcano seleccionado entre el grupo: isooctano, etano, heptano y hexano.

15 El porcentaje de disolvente orgánico que no es un alcohol en las composiciones de extracción de LPS para su uso en el procedimiento de la invención puede ser de entre aproximadamente el 60 % y aproximadamente el 95 % (v/v) y, en una realización particular de la invención, la composición de extracción de LPS comprende entre aproximadamente el 75 % (v/v) y aproximadamente el 90 % (v/v) de disolvente, además del alcohol. Las composiciones de extracción de LPS utilizadas en el procedimiento de la invención pueden comprender aproximadamente el 70, el 71, el 72, el 73, el 74 75, el 76, el 77, el 78, el 79, el 80, el 81, el 82, el 83, el 84, el 85, el 86, el 87, el 88, el 89 o el 90 % (v/v) de disolvente, además del alcohol.

20 Las composiciones de extracción de LPS utilizadas en el procedimiento de la invención comprenden metanol. El término "alcohol" como se usa en el presente documento se define como cualquier compuesto orgánico acíclico en el que un grupo hidroxilo (-OH) está unido a un átomo de carbono de un grupo alquilo o alquilo sustituido. Para aclarar, los alcoholes aromáticos no saturados, tales como el fenol (un alcohol cíclico), no se incluyen en la presente invención y, por tanto, se describe una composición de extracción de LPS, que comprende agua, un alcohol y un disolvente orgánico adicional, en la que el alcohol no es un alcohol aromático no saturado, por ejemplo, fenol.

25 El porcentaje de metanol en las composiciones de extracción de LPS utilizadas en el procedimiento de la invención puede ser de entre aproximadamente el 5 % y aproximadamente el 40 %, por ejemplo, y en una realización particular del procedimiento de la invención, la composición de extracción de LPS comprende entre aproximadamente el 10 % (v/v) y aproximadamente 30 % (v/v) de metanol. Las composiciones de extracción de LPS utilizadas en el procedimiento de la invención en particular pueden comprender el 6, el 7, el 8, el 9, el 10 11, el 12, el 13, el 14, el 15, el 16, el 17, el 18, el 19, el 20, el 21, el 22, el 23, el 24, el 25, el 26, el 27, el 28, el 29 o el 30 % (v/v) de metanol.

30 El alcohol en las composiciones de extracción de LPS utilizadas en el procedimiento de la invención es metanol. La elección del alcohol puede depender de un número de factores incluyendo el disolvente orgánico particular en la composición de extracción de LPS particular en la que determinados alcoholes son insolubles en determinados disolventes orgánicos. En consecuencia, en la invención se proporciona una composición de extracción de LPS que comprende agua, cloroformo y metanol.

35 Las composiciones de extracción de LPS como se definen en el presente documento son para su uso en los procedimientos de extracción de LPS de la invención como se describe en el presente documento. En consecuencia, se proporciona un procedimiento de extracción de lipopolisacáridos (LPS) a partir de células bacterianas que comprende la etapa de: extraer LPS a partir de las células en una composición de extracción de LPS como se define en el presente documento, que comprende agua, un alcohol y un disolvente orgánico adicional. El experto conoce bien los procedimientos de extracción de LPS.

40 Pueden alterarse diversos parámetros del procedimiento de la invención mientras permanezcan dentro del ámbito de la invención, incluyendo la temperatura, el tiempo y el pH. Los procedimientos de la invención que comprenden la etapa de extraer LPS a partir de células (etapa de extracción de LPS) en una composición de extracción de LPS que comprende agua, un alcohol y un disolvente orgánico adicional, pueden realizarse a una temperatura de entre aproximadamente 35 °C y aproximadamente 65 °C. Por ejemplo, la etapa de extracción de LPS puede realizarse a una temperatura de entre aproximadamente 45 °C y aproximadamente 55 °C, en particular 45, 46, 47, 48, 49, 50, 52, 52, 53, 54 o 55 °C. En particular, la etapa de extracción puede realizarse a aproximadamente 50 °C.

45 Pueden realizarse procedimientos de la invención que comprenden la etapa de extraer LPS a partir de las células en una composición de extracción de LPS que comprende agua, metanol y cloroformo en los que la etapa de extracción se realiza a un pH de entre aproximadamente 7 y aproximadamente 9, por ejemplo, de aproximadamente 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8 u 8,9. En realizaciones particulares de la invención, la etapa de extracción de LPS se realiza a un pH entre aproximadamente 7,8 y aproximadamente 9 y, en procedimientos aún más particulares de la invención, la etapa de extracción puede realizarse a aproximadamente pH

8,6.

5 Pueden realizarse procedimientos de la invención que comprenden la etapa de extraer LPS a partir de las células en una composición de extracción de LPS que comprende agua, metanol y cloroformo, durante aproximadamente 0,5 a aproximadamente 30 horas. En realizaciones particulares de la invención, la etapa de extracción de LPS se realiza durante de 1 a 20, adecuadamente de 0,5 a 1,5, de 1 a 2, de 1,5 a 2,5 o de 2 a 2,5 horas, por ejemplo, 0,75, 1, 1,25, 1,5, 1,75, 2 o 2,25 horas. En procedimientos particulares de la invención, la etapa de extracción puede realizarse durante aproximadamente una hora.

10 Los procedimientos de la invención pueden comprender adicionalmente las etapas de: (i) lavar las células con una solución de etanol; y opcionalmente (ii) lavar una segunda vez con etanol. El lavado con etanol antes de la etapa de extracción puede reducir la cantidad de fosfolípidos que se coextraen con el LPS en la etapa de extracción de LPS y, por tanto, el lavado puede reducir la cantidad de impurezas en la extracción de LPS. En consecuencia, se describe un procedimiento de extracción de lipopolisacáridos (LPS) a partir de células bacterianas que comprende las etapas:

- 15 (i) lavar las células con una solución de etanol;
 (ii) lavar las células una segunda vez con etanol; y
 (iii) extraer LPS de las células en una composición de extracción de LPS que comprende agua, un alcohol y un disolvente orgánico adicional.

20 Las etapas de lavado en los procedimientos de la invención pueden realizarse usando una solución de entre aproximadamente el 75 % y aproximadamente el 95 % (v/v) de etanol, el resto del lavado puede hacerse con agua. Por ejemplo, el primer lavado (i) puede realizarse con una solución de aproximadamente el 85 % (v/v) de etanol. Por ejemplo, el segundo lavado (ii) puede realizarse con una solución de aproximadamente el 90 % (v/v) de etanol.

Realizaciones adicionales de los procedimientos de la invención pueden comprender adicionalmente la etapa de, lavar las células con una solución de metanol. En consecuencia, se describe un procedimiento de extracción de lipopolisacáridos (LPS) a partir de células bacterianas que comprende las etapas:

- 25 (i) lavar las células con una solución de etanol;
 (ii) lavar las células una segunda vez con etanol;
 (iii) lavar las células con metanol; y
 (iv) extraer LPS a partir de las células en una composición de extracción de LPS que comprende agua, un alcohol y un disolvente orgánico adicional.

30 Los procedimientos de la invención se usan para extraer LPS a partir de células bacterianas, incluyendo las obtenidas a partir de cultivos de células bacterianas, de manera que el LPS pueda usarse y/o procesarse adicionalmente. En consecuencia, realizaciones adicionales de los procedimientos de la invención comprenden adicionalmente la etapa de, evaporar el agua, el alcohol y el disolvente orgánico adicional de la solución de LPS, produciendo de este modo un residuo de LPS seco después de la etapa de extracción. Adecuadamente, en el presente documento se describe un procedimiento de extracción de lipopolisacáridos (LPS) a partir de células bacterianas que comprende las etapas de:

- 35 (i) lavar las células con una solución de etanol;
 (ii) lavar las células una segunda vez con etanol;
 (iii) lavar las células con metanol;
 (iv) extraer LPS a partir de las células en una composición de extracción de LPS que comprende agua, un alcohol y un disolvente orgánico adicional; y
 (v) evaporar el agua, el alcohol y el disolvente orgánico adicional de la solución de LPS, produciendo de este modo un residuo seco de LPS.

45 Adicionalmente se describe una composición de LPS producida mediante los procedimientos de la invención. Se ha demostrado que las actividades biológicas de los LPS, tales como la toxicidad letal, la pirogenia y la adyuvancia, están relacionadas con el resto de lípido A. Por el contrario, la inmunogenia se asocia al componente polisacárido específico de O (antígeno O). Se conoce desde hace tiempo tanto al LPS como al lípido A por sus fuertes efectos adyuvantes, pero la alta toxicidad de estas moléculas ha impedido su uso en formulaciones de vacunas. Por tanto, se ha realizado un esfuerzo significativo para reducir la toxicidad del LPS o el lípido A manteniendo al mismo tiempo su adyuvancia.

50 El mutante *Salmonella minnesota* R595 se aisló en 1966 a partir de un cultivo de la cepa (*lisa*) parental (Luderitz y col. 1966 *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 133: 349-374). Las colonias seleccionadas se cribaron por su susceptibilidad a la lisis mediante un panel de fagos y solo aquellas colonias que mostraron un intervalo estrecho de sensibilidad (susceptibles a uno o dos fagos solamente) se seleccionaron para su estudio adicional. Este esfuerzo condujo al aislamiento de una cepa mutante *rugosa profunda* que es defectuosa en la biosíntesis de LPS y se denomina *S. minnesota* R595.

55 En comparación con otros LPS, los producidos por *S. minnesota* R595 están truncados y tienen una estructura relativamente simple (véase la Figura 6), ya que:

(i) no contienen ninguna región específica de O - una característica que es responsable del cambio del fenotipo liso de tipo silvestre al fenotipo rugoso mutante y da como resultado una pérdida de virulencia

(ii) la región núcleo es muy corta - esta característica aumenta la susceptibilidad de la cepa a una diversidad de productos químicos, y

5 (iii) el resto de lípido A está altamente acilado con hasta 7 ácidos grasos.

En consecuencia, las células bacterianas utilizadas en los procedimientos de la invención pueden ser las de una cepa bacteriana mutante rugosa profunda de *Salmonella* o *Escherichia*. Por la expresión 'cepa bacteriana mutante rugosa profunda' se entiende una cepa de bacteria gramnegativa que tiene un fenotipo rugoso profundo. Un fenotipo rugoso profundo es uno en el que el resto polisacárido unido al lípido A consiste en solo aproximadamente 2-3 residuos de ácido 2-ceto-3-desoxi-D-manooctulónico (KDO). En particular, la cepa bacteriana mutante rugosa profunda se selecciona entre el género *Salmonella*. Si la cepa bacteriana mutante rugosa profunda se selecciona entre el género *Salmonella*, puede ser de la especie *Salmonella minnesota*, en particular, la cepa *Salmonella minnesota* R595. Pueden usarse otras cepas bacterianas mutantes rugosas profundas, por ejemplo: *Campylobacter jejuni* (Kanipes y col. 2004 *Infection and Immunity* 72: 2452-2455), *E. coli* K12 cepa CS2429 (Klena y col. 2005 *J. Bact.* 187: 1710-1715), *E. coli* D31m4 (Qureshi y col. 1988 *J. Biol. Chem.* 263: 11971-11976), *E. coli* cepa F515 (Wiese y col. 1997 *Biochemistry* 36: 10311-10319) y *Proteus mirabilis* cepa R45 (Wiese y col. 1997 *Biochemistry* 36: 10311-10319).

El 4'-monofosforil lípido A (MPL), que puede obtenerse mediante la hidrólisis ácida de LPS extraído de una cepa mutante rugosa profunda de bacterias gramnegativas, conserva las propiedades adyuvantes del LPS mostrando al mismo tiempo una toxicidad que se reduce en un factor de más de 1000 (medido mediante dosis letal en huevos de embriones de pollo) (Johnson y col. 1987 *Rev. Infect. Dis.* 9 Supl.: S512-S516). El LPS normalmente se calienta a reflujos en soluciones de ácido mineral de concentración moderada (por ejemplo, HCl 0,1 M) durante un período de aproximadamente 30 minutos. Este procedimiento da como resultado la desfosforilación en la posición 1 y la descarboxilación en la posición 6', produciendo MPL. El monofosforil lípido A 3-O-desacilado (3D-MPL), que puede obtenerse mediante hidrólisis alcalina suave de MPL, tiene una toxicidad reducida adicional manteniendo al mismo tiempo de nuevo la adyuvancia, véase la Patente de los EE.UU. N.º 4912094 (Ribi Immunochemicals). La hidrólisis alcalina se realiza normalmente en disolvente orgánico, tal como una mezcla de cloroformo/metanol, por saturación con una solución acuosa de base débil, tal como carbonato de sodio 0,5 M a pH 10,5. Hay información adicional disponible acerca de la preparación de 3D-MPL en, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 4912094 y la publicación PCT WO02/078637 (Corixa Corporation).

30 En consecuencia, en algunas realizaciones, los procedimientos de la invención comprenden adicionalmente la etapa de, someter el LPS a hidrólisis ácida e hidrólisis básica secuencialmente, para formar 3D-MPL. También se describe un procedimiento de fabricación de un derivado de LPS a partir de bacterias gramnegativas que comprende las etapas de:

- 35 (i) lavar las células con una solución de etanol;
- (ii) lavar las células una segunda vez con etanol;
- (iii) lavar las células con metanol;
- (iv) extraer LPS a partir de las células en una composición de extracción de LPS que comprende agua, un alcohol y un disolvente orgánico adicional;
- 40 (v) evaporar el agua, el alcohol y el disolvente orgánico adicional de la solución de LPS, produciendo de este modo un residuo seco de LPS; y
- (vi) someter el LPS a hidrólisis ácida e hidrólisis básica secuencialmente, para formar 3D-MPL.

En el presente documento se describe adicionalmente la composición de 3D-MPL producida mediante los procedimientos de la invención como se describe en el presente documento.

45 Todas las referencias a las que se hace referencia en la presente solicitud, incluyendo las patentes y las solicitudes de patentes, se incorporan en el presente documento por referencia en la mayor medida posible.

A lo largo de la presente memoria descriptiva y de las reivindicaciones a continuación, a menos que el contexto requiera otra cosa, la palabra 'comprenden' y variaciones tales como 'comprende' y 'que comprende', se entenderá que implica la inclusión de un número entero, etapa, grupo de números enteros o grupo de etapas indicados pero sin excluir ningún otro número entero, etapa, grupo de números enteros o grupo de etapas.

50 El procedimiento de la presente invención se ilustra a modo de referencia a los siguientes ejemplos no limitantes:

Ejemplos

Ejemplo 1: Procedimiento de extracción de LPS

1.1 Procedimiento de lavado convencional (el siguiente procedimiento de lavado es similar para el ejemplo 2)

Este procedimiento de lavado se aplicó en caldos de células 90A, 101B y 128A utilizados en los siguientes ejemplos

de extracción de LPS 1, 2 y 3.

Una porción de caldo inactivado (normalmente 200 l que contenían de 3 a 5 kg de PCS, de 360 a 600 g de LPS¹) se cargó en un vaso de reacción inoxidable de doble camisa de 300 l con propulsor, sonda de temperatura, protegido con nitrógeno y a 25 hPa de N₂.

- 5 El caldo se calentó a 50 °C con agitación haciendo circular agua caliente en la doble envoltura del vaso de reacción.

La mezcla se concentró a 75 l por filtración (duración ~1,5 h) en una unidad de filtración de flujo tangencial (FFT), equipada con una membrana de cerámica cilíndrica KERASEP® de 7 canales con un tamaño de poro de 0,22 µm (6 mm/diámetro interno) y 0,15 m² de área de superficie, proveedor de la Ref: KERMBB-XM2 (Groupe Novasep France)). Después del análisis para determinar el residuo de peso seco y verificar que era límpido, se descartó el permeado.

10 El producto retenido se diluyó en etanol (158 l) y agua (18 l), produciendo un volumen total de 250 l. La mezcla se calentó a 50 °C y se agitó posteriormente 30 minutos a esta temperatura. La mezcla se concentró hasta 50 l por filtración de flujo tangencial (duración ~2 h) y el filtrado se recogió para su análisis.

15 El producto retenido se lavó adicionalmente a 50 °C mediante la adición de etanol (180 l) y agua (20 l) (duración ~2 h). La filtración a 50 l se realizó después de 30 minutos de agitación posterior. Los permeados de ambos lavados se analizaron para determinar el residuo seco y se descartaron. El etanol/agua (~90/10) contenido en el producto retenido se reemplazó después por metanol en modo de diálisis a 50 °C en la unidad de FFT.

¹ Basado en un máximo de contenido de LPS del 12 % en las células R595 sometidas a ensayo mediante el procedimiento de extracción total de fenol de Galanos

20 Un volumen total de 360 l de metanol, por fracción de 20 l, se añadió a la mezcla de producto retenido mientras se filtraba la mezcla, para producir una suspensión celular de 50 l en metanol (contenido de etanol residual típico <1 %), sustancialmente libre de impurezas hidrófobas (fosfolípidos) (duración ~3 h). Se analizó el producto permeado para determinar el residuo seco y se desechó.

25 Normalmente, se eliminó el 20 % del PCS total en los permeados durante los lavados con etanol y el reemplazo del etanol mediante etapas de metanol. En este punto, podía tomarse una muestra de la mezcla de producto retenido para determinar el PCS y el material se procesó adicionalmente a escala de laboratorio (137 ml) o escala de planta piloto (260 l).

1.2.2 Procedimiento de extracción (escala de planta piloto) sin agua (como se realizó para la extracción del caldo 90B)

30 Después de las etapas de lavado que se han descrito anteriormente, (en 144 l de caldo 90A que contenía 4 kg de PCS), la suspensión celular lavada de 50 l en metanol se extrajo en cloroformo/metanol. Se añadieron 190 l de cloroformo y 20 l de metanol. La mezcla se calentó adicionalmente a 50 °C durante 16 h. Se tomaron muestras al azar durante la extracción y se filtraron. Después, la cantidad de LPS extraído se sometió a ensayo evaporando el disolvente del producto filtrado para permitir el cálculo del rendimiento en comparación con el PCS medido en el caldo.

35 Después, la suspensión se filtró en la unidad de TFF y el producto permeado se envió a un vaso de recolección de acero inoxidable de 300 l, con doble camisa, protegido con nitrógeno y a 25 hPa de N₂. El producto filtrado se enfrió haciendo circular agua fría (8 °C) en el vaso de doble camisa.

Cuando se obtuvo un volumen residual de 50 l de producto retenido, la filtración se detuvo (duración ~3 h)

1.3. Procedimiento de concentración convencional (solo escala de planta piloto)

40 El producto permeado recogido (filtrado) se concentró en un evaporador de tubo ascendente de alimentación continua al vacío (30 °C, 200 hPa) hasta un volumen de 17 l (volumen mínimo de trabajo de este equipo). Se produjo precipitación parcial durante la evaporación, debido a la evaporación preferencial de cloroformo y al enriquecimiento en metanol. La velocidad de evaporación típica es de 50-150 l/h, dependiendo de la temperatura del vacío/condensador (duración: 2-4 h).

45 El evaporador se vació y después se lavó con cloroformo recién preparado (17 l) para solubilizar cualquier material precipitado durante la evaporación.

El lavado y el concentrado combinados (volumen total: 34 l) se evaporaron adicionalmente en un Buchi ROTAVAPOR® R-220 de 20 l (BÜCHI Labortechnik AG) con baño de agua a 50 °C y con una presión inicial de 350 hPa. La velocidad de evaporación típica es de 8-10 l/h (duración: 3-4 h).

50 Cuando se obtuvo un volumen de aproximadamente 3 l, se añadió agua (3 l) y la mezcla se concentró nuevamente a 3 l. Esta operación se repitió 2 veces hasta obtener una presión final de 40 hPa, lo que indicó que solo quedaba agua (todos los disolventes se habían eliminado). Durante este desplazamiento de metanol/agua, la velocidad de evaporación típica es de 2,5 l/h (duración típica ~3 h).

Se añadieron otros 3 l de agua para producir ~6 l de suspensión de LPS en agua, que se almacenó a 4 °C, normalmente durante 7 días. La suspensión se muestreó y se analizó para determinar el residuo seco, con el fin de estimar la cantidad de LPS (*también denominada ECM, extracto de cloroformo/metanol*):
Rendimiento de 189 g de LPS para la extracción del caldo 90A.

- 5 El rendimiento promedio del experimento N = 80 realizado con 0 % de agua durante la extracción (véase Figura 3) fue del 6,5 %, mostrando una distribución muy amplia, con un 95 % de los resultados entre el 1 y el 12 % de rendimiento.

Ejemplo 2 - Extracción usando agua

El lavado de las células, 222 l del caldo 131A que contenía 5 kg de PCS se realizó como se ha descrito en la sección 1.1.

10 2.1 Procedimiento:

2.1.1 Extracción (escala de planta piloto con un 1 % de agua) (como se realizó para la extracción del caldo 131A)

15 Se añadieron cloroformo (195 l) y agua (2,5 l) a las células R595 lavadas (50 l en metanol) para proporcionar una relación de disolvente de 78/22/1 CHCl₃/MeOH/H₂O. La mezcla se calentó a 50 °C y se agitó después durante la noche (16 h) a esta temperatura.

Después, la suspensión se filtró en la unidad de TFF y el producto permeado se envió a un vaso de recolección de acero inoxidable de 300 l, con doble camisa, protegido con nitrógeno y a 25 hPa de N₂. El producto filtrado se enfrió haciendo circular agua fría (8 °C) en el vaso de doble camisa.

20 Cuando se obtuvo un volumen residual de 50 l de producto retenido, se detuvo la filtración (duración ~3 h). Se añadieron cloroformo (40 l) y metanol (10 l) al producto retenido para su extracción adicional y la mezcla se volvió a calentar a 50 °C y se filtró hasta un volumen de 50 l. Los 50 l adicionales de producto permeado también se enviaron al vaso de recolección. Después, los 50 l restantes de producto retenido se descartaron.

La concentración se realizó como se ha descrito en la sección 1.3, produciendo 568 g de LPS.

25 El rendimiento promedio en estas condiciones fue del 9,1 % con un 95 % de los resultados comprendidos entre el 6 y el 12 % de rendimiento como se muestra en la Figura 3.

Ejemplo 3 - Extracción de laboratorio con y sin agua

Se lavaron 130 l de caldo inactivo 101B (2,99 kg de PCS) usando el procedimiento descrito en 1.1, produciendo 50 l de células lavadas. Se tomaron muestras de células lavadas para extracciones de laboratorio a escala reducida.

30 Con el fin de comprender mejor el procedimiento de extracción, esta etapa se redujo a escala y se sometieron a ensayo diferentes condiciones de extracción y se estableció una cinética de hasta 48 h de extracción. Se usaron células lavadas del caldo 101B para esos experimentos.

35 A 30 ml de una suspensión de células R595 lavadas en metanol se le añadieron 106 ml de cloroformo y, en caso necesario, 1,36 ml de agua en un matraz de fondo redondo equipado para el reflujo y con atmósfera inerte de nitrógeno. La suspensión se agitó a 50 °C. Se tomaron muestras al azar (10 ml) durante la extracción (hasta 48 h) y se filtraron en un filtro de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,22 µm. El filtrado se evaporó a sequedad para determinar la cantidad de LPS extraído y seguir la cinética de extracción. El rendimiento se calculó a partir del volumen total del experimento x el contenido de LPS dividido por el PCS del caldo original.

2.2 Resultados

La Tabla 1 muestra ese efecto sobre el rendimiento del 1 % de agua en el tampón de extracción de cloroformo:metanol.

40 **Tabla 1: Efecto del agua sobre el contenido de LPS durante la extracción (realizado a escala PP en 16 h a 50 °C)**

Caldo de células Lote N.º	Volumen de caldo inactivo	% de agua	LPS en ECM (g)	% de Rendimiento (LPS/PCS del caldo)
90A	144 l (4 kg de PCS)	0	189	4,7
131A	222 l (5 kg de PCS)	1	568	11,4

Puede observarse que el contenido de LPS después de la extracción con un 1 % de agua (131A) aumentó significativamente, en comparación con el contenido de LPS después de la extracción con un 0 % de agua (90A).

45 **Cinética:** Además de un aumento en el rendimiento de LPS, los ejemplos demuestran que la adición de agua al tampón de extracción aumentó la cinética de extracción (véanse la Figura 1 y la Figura 2, experimento a escala de laboratorio del caldo de células 101B).

Se muestra que después de 8 horas se alcanzó una meseta (1,15 g/l) en la extracción realizada con un 1 % de agua presente. Sin embargo, en ausencia de agua, solo se disolvieron 0,17 g/l después de 8 horas; después de 30 horas, la cantidad era de 0,47 g/l (y seguía creciendo, a un alto valor hipotético, pero después de mucho tiempo).

5 Estos experimentos se repitieron dos veces en el mismo caldo (101B). La muestra se tomó después de 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h, 30 h y 48 h de extracción.

Reproducibilidad: Además del rendimiento y la velocidad con la que puede extraerse el LPS, el 1 % de agua también aumentó la reproducibilidad con la que se extrae el LPS (véanse las Figuras 3A y 3B y 2).

En la figura 3 se muestra que la distribución y la desviación típica se agudizan con un 1 % de agua.

10 En la tabla 2 se muestra que la reproducibilidad se mejora usando un 1 % de agua; cuando se usa un 0 % de agua, se observa una diferencia del 40 % entre los rendimientos obtenidos del 1^{er} y el 2^o ensayo.

Tabla 2: Extracciones % de rendimiento a 50 °C con un 0 % y un 1 % de agua a escala de laboratorio, se tomaron muestras después de 1 h y 30 h (del caldo de células 101B).

Lote	Agua	Tiempo de extracción	g de LPS/l (en 137 ml)	Rendimiento (a partir de LPS/PCS caldo 101B)*
n.º 1	1 %	1 h	0,95	7,3 %
		30 h	1,16	8,9 %
n.º 2	1 %	1 h	1,12	8,4 %
		30 h	1,17	8,9 %
n.º 1	0 %	1 h	0,05	0,4 %
		30 h	0,45	3,4 %
n.º 2	0 %	1 h	0,03	0,2 %
		30 h	0,26	2 %

* Basado en una equivalencia de 1794 mg de PCS (2,99 kg/50 l/30 ml)x 1000) del caldo 101B muestreado para cada experimento de extracción

Ejemplo 3 - Efecto del pH

15 Se lavaron 130 l de caldo inactivo 101B (2,99 kg de PCS) usando el procedimiento descrito en 1.1, produciendo 50 l de células lavadas. Se tomaron muestras de células lavadas para extracciones de laboratorio a escala reducida.

20 Se añadieron 120 ml de cloroformo y 1,5 ml de agua a 25 ml de una suspensión de células lavada en metanol que contenía la base deseada (por ejemplo, 15,15 mg de TEA, 50 mg de KHCO₃, 25 µl de NaOH al 32 %) en un matraz de fondo redondo equipado para el reflujo y en atmósfera inerte de nitrógeno. La suspensión se agitó a 50 °C durante 16-18 h. Se tomó una muestra (10 ml) y se filtró en un filtro de PTFE de 0,22 µm. El filtrado se secó por evaporación para determinar la cantidad de LPS extraído (g/l).

El efecto del pH se sometió a ensayo a pH 8,61 (NaOH), 8,29 (TEA), 7,84 (KHCO₃) y pH4 (ácido acético).

Los resultados se compararon con extracción con agua al 1 % a pH = 7,1.

25 La elevación del pH se obtuvo disolviendo 1,6 equivalentes de la base deseada (basado en un contenido de LPS del 12 %) en la cantidad de agua utilizada para alcanzar la relación del 1 % de C:M:A. La solución acuosa se añadió a la suspensión metanólica y se agitó 1 h antes de la adición de CHCl₃ y el calentamiento a 50 °C. En el caso del ácido acético, el ácido se añadió directamente a la mezcla de metanol y agua.

En la Figura 4 se muestra que el rendimiento de LPS aumentó con el pH, del 7,8 % a pH 4 (ácido acético) al 11,1 % a pH 8,6 (NaOH). (Nota: el aumento de contenido seco debido a la adición de KHCO₃ y NaOH se tuvo en cuenta para el cálculo del rendimiento). Se eliminaron el TEA y el ácido acético por evaporación si aún estaban presentes.

30 4. Conclusión

Los presentes inventores han demostrado que la adición de agua genera condiciones de extracción más fiables (reproducibilidad) y aumenta el rendimiento de LPS.

Además, los inventores han demostrado que un aumento en el pH del tampón de extracción acuoso aumenta el rendimiento de LPS.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de extracción de lipopolisacáridos (LPS) a partir de células bacterianas gramnegativas que comprende la etapa de, extraer LPS a partir de las células en una composición de extracción de LPS que comprende cloroformo, metanol y agua, en la que la composición de extracción de LPS es monofásica y en la que la cantidad de agua en la composición de extracción de LPS es de entre el 0,4 y el 1,5 % (v/v), el porcentaje de metanol en la composición de extracción de LPS es de entre el 5 % y el 40 % (v/v) y en la que el porcentaje de cloroformo en la composición de extracción de LPS es de entre el 60 % (v/v) y el 95 % (v/v).
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la cantidad de agua es del 0,8 al 1,2 % (v/v).
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la cantidad de agua es del 1 % (v/v).
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el porcentaje de metanol en la composición de extracción de LPS es de entre el 10 % y el 30 % (v/v).
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el porcentaje de cloroformo en la composición de extracción de LPS es de entre el 75 % (v/v) y el 90 % (v/v).
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la extracción de LPS se realiza a una temperatura de entre aproximadamente 35 °C y aproximadamente 65 °C.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la extracción de LPS se realiza a un pH de entre 7,8 y 9.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la extracción de LPS se realiza en aproximadamente 0,5 a aproximadamente 20 horas.
9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende adicionalmente las etapas de:
 - i. Lavar las células con una solución de etanol o etanol; y, opcionalmente,
 - ii. Lavar las células una segunda vez con etanol o metanol.
10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende adicionalmente la etapa de: evaporar el agua, el alcohol y el disolvente orgánico adicional de la solución de LPS, produciendo de este modo un residuo seco de LPS.
11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la célula bacteriana es la de una cepa bacteriana mutante rugosa profunda de *Salmonella* o *Escherichia*.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que las células bacterianas son las de *Escherichia coli*.
13. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que las células bacterianas son las de *Salmonella minnesota*.
14. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que las células bacterianas son las de *Salmonella minnesota* R595.
15. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende adicionalmente la etapa de: someter el LPS a hidrólisis ácida e hidrólisis básica secuencialmente, para formar 3D-MPL.

Figura 1

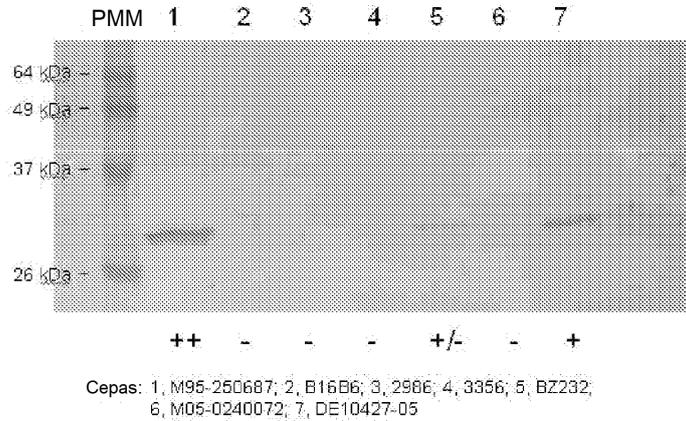
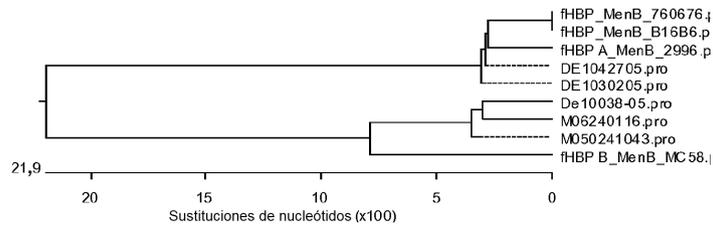


Figura 2.



Nombre de la secuencia	Pos = 1
Consenso	CS...--GGGTAADICGLSLADLTAPLIDHDEHLSLTLDSVDFKDESLASAGAKKTSWGD...SLWTGSLNEDSDRFTFDLQIDVSGITLSDPFDVYVSDHSAVALSISLIDHDFKID
Secuencias	<p>DE1030205.pro DE1042705.pro M05240116.pro M05241043.pro</p>

Nombre de la secuencia	Pos = 130
Consenso	ELINRSLVQLGQSTFAPFLVPGG-KATYNSKAFSSDVAAGSLTFTYDFAAQGSRKIDRLKTPFQPTLAAALKADEKTRAVLQPTFQSGEATYSLALGKLSL1666ATVNFQDNDI1616AKD
Secuencias	<p>DE1030205.pro DE1042705.pro M05240116.pro M05241043.pro</p>

Figura 3

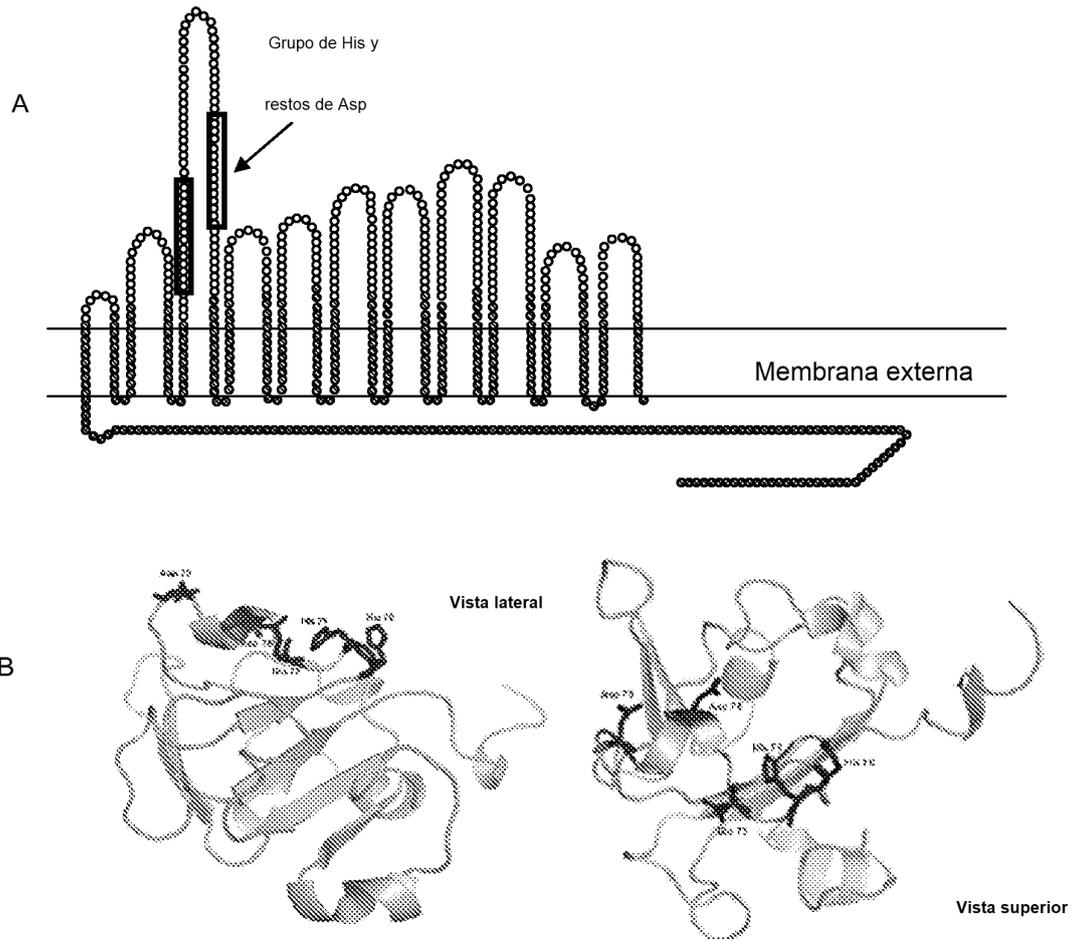
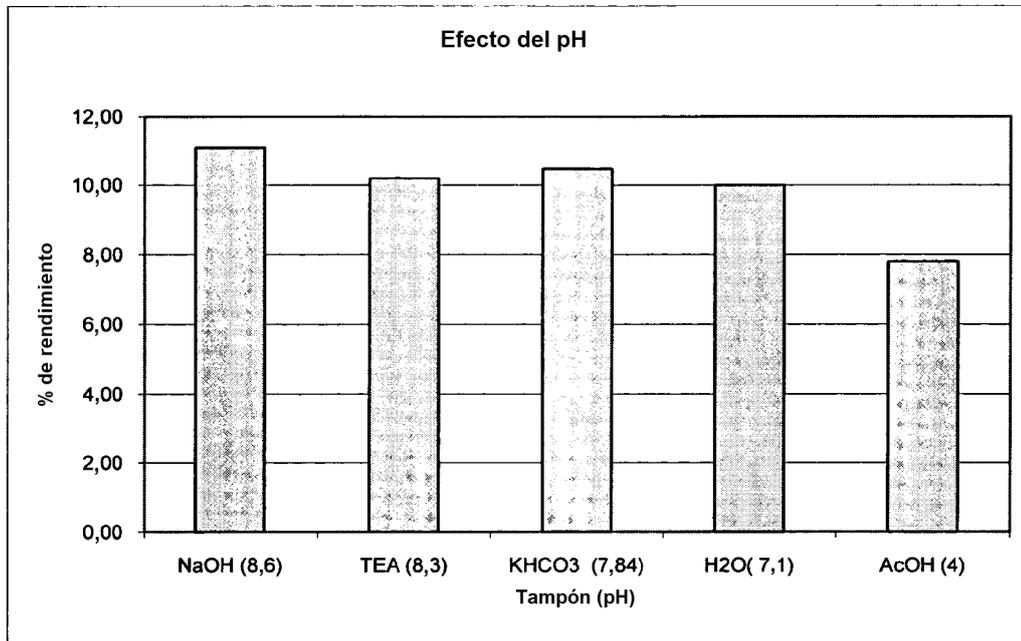


Figura 4: Efecto del pH



La **Figura 6** muestra LPS truncado producido por el mutante *S. Minnesota* R595 e indica la ubicación del truncamiento con respecto al LPS de longitud completa.

