

346460

P-36.575

ES/GSAS/
Case A 309

Memoria descriptiva



4 FNE. 1968

para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

a nombre de THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED

entidad / ~~de nacionalidad~~ británica

con domicilio en 183-193, Euston Road, Londres, Inglaterra.

por: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN LIPOPOLISA
CARIDO NO TOXICO, PURIFICADO" (Clase Internacional C12d
C07g).

22.12.1967

- 1 -

**POOR
QUALITY**



Este invento se refiere a un procedimiento me-
jorado para depurar lipopolisacáridos bacterianos y en
particular a fracciones no tóxicas aisladas del fluido
que sobrenada en cultivos bacterianos gram-negativos ai-
reados intensivamente.

Los lipopolisacáridos procedentes de bacterias
gram-negativas, designados en lo que sigue como LPS, son
sustancias antígenas que comprenden polisacárido, lípido,
y en su forma natural, componentes de proteínas asociados.
Ciertos lipopolisacáridos tóxicos se han denominado "en-
dotoxinas", mientras que otras fracciones no tóxicas se
han denominado "haptenos naturales". Estos materiales se
obtienen usualmente extrayendo las bacterias con un lí-
quido que contiene un agente químico o disolvente, tal
como fenol, ácido tricloroacético, o éter. Se ha sugerido,
sin embargo, que los complejos originales son en cierto
modo modificados o degradados por esos agentes. Por ejem-
plo, algunos al menos de los componentes de proteína y lí-
pido pueden ser escindidos con reactivo extractor que
contenga fenol, o bien el contenido en lípido puede ser
reducido por el uso de éter o acetona. Fracciones que re-
presentan alta y baja toxicidad han sido aisladas por Ana-
ker y otros, J. of Bacteriology, 1964, 88, 1705-1720, y,
en esa misma publicación, 1966, 91, 1427-1433, o según un
método descrito en la Memoria Descriptiva de la Patente
Británica número 1.005.193 (Patente para los EE.UU. núme-
ro 3.132.995). Todos estos métodos, sin embargo, adolecen
del inconveniente de usar los agentes químicos antes men-
cionados para liberar primero las mezclas de LPS de las
células, con los cambios consiguientes en la estructura



de esos complejos, y no se logra con ellos proveer productos uniformes de toxicidad baja o despreciable con un rendimiento y una pureza suficientemente elevados.

5 Se ha comprobado ahora que puede producirse una fracción de LPS no tóxica con un rendimiento satisfactorio usando como material de partida el líquido que sobrenada en los cultivos bacterianos gram-negativos, tal como un cultivo de Escherichia coli, cultivados en condiciones de aireación intensa. Además, la depuración y la separación del LPS no tóxico puede lograrse eficazmente por absorción de la fracción de endotoxinas sobre un intercambia-
10 dor aniónico, el cual es selectivo en ese aspecto, hasta que la toxicidad deja de ser detectable, con tal de que el fraccionamiento vaya precedido del aislamiento de una
15 fracción de LPS predominantemente desde el medio líquido por precipitación salina y subsiguiente diálisis.

De acuerdo con el presente invento, por consiguiente, en un aspecto se ha provisto un procedimiento para la preparación de un lipopolisacárido no tóxico depurado, que comprende precipitar los lipopolisacáridos de
20 lo que sobrenada del cultivo de bacterias gram-negativas, tal como E. coli, cultivadas en condiciones de aireación intensa, dializar el precipitado vuelto a disolver, aplicar la solución de los lipopolisacáridos a un intercambiador aniónico que retiene de preferencia el lipopolisacárido tóxico (endotoxinas) hasta que el producto eluido
25 y aislado es sustancialmente homogéneo y no tóxico.

En otro aspecto, el invento proporciona un preparado antigénico, que comprende un LPS no tóxico depurado aislado de la parte que sobrenada en los cultivos de bac-
30



terias gram-negativas, tales como bacterias E. coli, que está exento de endotoxinas. El procedimiento, como se ha definido en lo que antecede, puede incluir otra operación de secado por congelación o de evaporación a baja temperatura, para presentar el LPS no tóxico depurado en una forma seca exenta de disolvente.

Los lipopolisacáridos son liberados en el fluido del cultivo mediante cultivos bacterianos gram-negativos bajo condiciones de aireación intensa en un medio provisto de todos los elementos nutritivos necesarios para el desarrollo. Para obtener los mejores resultados, el pH del medio de desarrollo se mantiene en torno a un valor de 6 a 8, dependiendo en cierta medida del tipo de organismo empleado. Se ha comprobado que la mayoría de las cepas de Escherichia coli, Serratia marcescens, Salmonella typhosa de la familia de las Enterobacteriáceas, y las cepas de pastenrella multosida y Vibrio cholerae, segregan LPS en esas condiciones. Para los fines del presente invento se ha comprobado que son convenientes elementos nutritivos que contengan tanto sucrosa como caseína ácida hidrolizada, además de otros ingredientes y factores de desarrollo usuales.

A continuación de la fase de desarrollo, el fluido de cultivo del medio es separado de las células bacterianas por medio de filtración o centrifugación y el LPS no tóxico, juntamente con la endotoxina, son precipitados por una sal tal como sulfato amónico, a bajas temperaturas. El precipitado es luego recogido, vuelto a suspender en agua destilada, y dializado para eliminar las impurezas de bajo peso molecular susceptibles de di-



5 fusión, y clarificado, por ejemplo por centrifugación. Para obtener los mejores resultados, esa depuración inicial se repite, y se concentra la solución por secado por congelación antes de ser nuevamente depurado y fraccionado el soluto.

10 El intercambiador aniónico preferido para los fines del presente invento es la dietilaminoetilcelulosa, y el eluyente preferido, usado juntamente con ese intercambiador particular, es un tampón acuoso de baja intensidad iónica (\sphericalangle 0,01 M) para un pH = 8, para obtener las fracciones no tóxicas. A continuación, un tampón de intensidad iónica más alta, (de aproximadamente 1,0 M) a un pH comprendido entre 5,5 y 8,5, de preferencia para un pH de 7-8,5, eluye las endotoxinas. A este respecto se ha comprobado que es satisfactorio un tampón volátil, tal como carbonato amónico ácido.

15 La dietilaminoetil celulosa separa el LPS no tóxico de la endotoxina muy eficazmente. Puede mezclarse convenientemente con la solución que contiene tanto los componentes no tóxicos como los tóxicos, separarse por filtrado después de haberse alcanzado equilibrio, y eluirse simplemente en un filtro o centrifugadora. Alternativamente, puede usarse el intercambiador como una columna cromatográfica. Dependiendo de la cantidad de endotoxina u otras impurezas en el material de partida, puede ser necesario aplicar la solución de LPS al intercambiador más de una vez, y usualmente dos veces, para obtener un producto homogéneo, es decir, uniforme.

20 Además de la separación con el intercambiador aniónico, pueden eliminarse algunas impurezas residuales



no tóxicas mediante el uso de xerogeles tal como un dex-
trano reticulado con puentes de glicerilo o preparados
de gel de acrilamida conocidos como "Bio-Geles". En el
procedimiento de depuración puede por tanto incorporarse
5 una operación usando tal material, usualmente como una
columna cromatográfica.

El absorbente de xerogel, tal como un prepara-
do de dextrana conocido como Sephadex G100 se emplea más
ventajosamente a continuación de la separación efectuada
10 por el intercambiador aniónico. Aunque ya se han usado
materiales reticulados para depurar mezclas de LPS cru-
das, el uso preferido de los mismos de acuerdo con el pre-
sente invento, juntamente con y a continuación de una ope-
ración de separación por medio de un intercambiador anió-
15 nico, mejora considerablemente la eficacia del material
reticulado, y proporciona el producto deseado con la pu-
reza y con el rendimiento conseguidos anteriormente. En
este contexto se usa el término "reticulado" en el sen-
tido de abarcar no solamente los materiales macromolecu-
20 lares convenientemente enlazados para formar estructuras
parecidas a tamices, capaces de retener moléculas de ta-
maños apropiados, sino con la intención de incluir otros
materiales que poseen inherentemente enlaces químicos que
representan estructuras equivalentes a las macromoleculas
25 reticuladas anteriores, con respecto a su capacidad para
retener impurezas no deseables. Algunos de tales materia-
les pueden ser conocidos en la técnica como tamices molé-
culares.

Con anterioridad a su uso, los materiales reti-
30 culados son convenientemente equilibrados con un tampón,

346460



tal como un carbonato amónico ácido, y pueden ser preparados como una columna cromatográfica para ese fin. La solución que contiene también el LPS no tóxico es luego filtrada a través de la columna. La primera fracción principal es separada de las fracciones siguientes, y contiene el material deseado no tóxico en una forma suficientemente depurada. El material así obtenido puede ser luego recuperado desde la solución, por ejemplo, por secado por congelación o por evaporación a baja temperatura.

5

Las características químicas, físicas y bioquímicas del LPS no tóxico obtenido de acuerdo con el presente invento, pueden variar de acuerdo con las especies o serotipos de las bacterias, tal material, cuando se obtiene a partir de la E. coli, mostraba una mayor cantidad de glucosamina en comparación con la de endotoxina. En este caso particular, el contenido en glucosamina era de aproximadamente el 27%. Tanto el contenido en aminoácidos como el contenido en ácidos grasos superiores, eran inferiores al de la endotoxina correspondiente.

10

15

20

Aunque el LPS provisto por el presente invento está caracterizado por ser un material no tóxico, debe entenderse que ello no ha de tomarse en un sentido absoluto, sino con relación a la endotoxina. La toxicidad de las fracciones en las diferentes etapas de depuración puede ser determinada convenientemente por inyección interperitoneal en grupos de ratones con dosis graduadas de las fracciones, permitiendo calcular los valores de LD₅₀ (Dosis Letal) y compararlos (Haskins y otros, 1961).

25

30

Aunque el LPS no tóxico provisto por el presente invento no estimula anticuerpos detectables por aná-



lisis de difusión en gel, induce una resistencia no específica a corto plazo a las infecciones con organismos heterólogos gramnegativos. Por ejemplo, la administración de LPS no tóxico procedente de la E. coli, protegía los ratones contra la posterior exposición letal a la S. typhosa.

En otro aspecto; por consiguiente, el presente invento proporciona una vacuna, que comprende una dosis eficaz de un LPS no tóxico depurado aislado de la parte que sobrenada en el cultivo de bacterias gramnegativas, en asociación con un excipiente aceptable farmacéuticamente.

Los ejemplos que siguen ilustran este invento:

EJEMPLO 1

Se desarrolló una cepa Shaw de E. coli 078K80 en depósitos durante 42 horas a 35°C en un medio acuoso intensamente aireado conteniendo caseína hidrolizada ácida (5% en peso/volumen), sucrosa (3% en peso/volumen) y extracto de levadura (10% en peso/volumen), ajustada a un pH de 6,5. Antes de la inoculación, el medio fue clarificado, calentado a 85° y esterilizado por filtrado de Seitz.

Las bacterias fueron retiradas de la suspensión por medio de un separador centrífugo "de Laval" y la parte que sobrenadaba fue esterilizada por filtrado, a través de un filtro Seitz. Se disolvió sulfato amónico (aproximadamente 700 g. por litro) en el cultivo que sobrenadaba, y se dejó reposar la solución a 4°C durante 6 días. El precipitado floculento pardo fue recuperado por centrifugado, vuelto a suspender en agua destilada y dializado



para eliminar la sal. El LPS fué vuelto a precipitar a 4°C por adición de sulfato amónico (65 g. por cada 100 ml. de solución). El material vuelto a precipitar fué vuelto a disolver y fué tratado como anteriormente para eliminar la sal, fué clarificado por centrifugación y se-
5 cado por congelación, obteniéndose un polvo pardo.

Una solución de LPS crudo así obtenida de las etapas de precipitación salina (600 mg. en 30 ml. de NH_4HCO_3 de 0,005 M) fué aplicada a una columna de Büchner
10 (8 cm. por 10 cm. de diámetro) conteniendo dietilaminoetil celulosa (Whatman DE11, capacidad 1 milliequivalente OH/g) equilibrada para un pH de 8 y suspendida en NH_4HCO_3 de 0,005 M. Se efectuó elución sucesivamente con (i) NH_4HCO_3
15 de 0,01 M (1.250 ml) y (ii) tampon de acetato amónico y ácido acético de 1M para un pH de 5,5 (500 ml). Una só- la fracción de material débilmente absorbente del ultra- violeta (a 230, 260 y 275 milimicras) fué eluída con tam- pón (i) resultando ser LPS no tóxico casi puro (95%). La
20 masa del material restante fué eluída con tampon (ii), viéndose que contenía endotoxina. Ambas fracciones prote- gían a los ratones contra una exposición posterior a S. typhosa 24 horas después de la inyección.

Ambas fracciones fueron además depuradas por separado por filtrado en gel en una columna Sephadex G100
25 (de 167,5 cm. por 1,2 cm de diámetro). Las fracciones pri- meras principales de materias absorbentes de luz ultra- violeta en cada experimente contenían el respectivo LPS no tóxico depurado y endotoxina. La fracción no tóxica estaba exenta de cualesquiera cantidades apreciables de
30 impurezas, lo que se comprobó mediante filtrado en gel,



electroforesis y análisis ultracentrífugo. Se comprobó que el material aislado de esa fracción era no tóxico para 0,6 miligramos en 20 gm. para ratones o para 25 mg/kg en conejillos de indias. No se hicieron otros ensayos por encima de esos niveles.

Químicamente ese LPS no tóxico contenía el 4,32% de N, el 8,89% de P, el 26-27% de glucosamina, el 1,2-1,4% de amino ácido y el 0,1% de ácido graso ($\geq C_4$). No pudieron detectarse cantidades apreciables de pentosa o ácido 2-ceto-3-deoxioctulónico. El producto era diferenciable de los haptenos naturales obtenidas por el método de extracción fenólica descrito por Anacker y otros (J. of Bacteriology, 1964 88, 1705), por cuanto tenía un contenido apreciable en fósforo y no tenía máximo de absorción para 260 milimicras.

Se comprobó que una solución que contenía 0,007 microgramos de LPS no tóxico en 0,85% de solución salina protegía al 50% de los ratones de un grupo contra una exposición letal a S. typhosa (cepa TY2) con un contenido de 3 dosis letales LD₅₀.

EJEMPLO 2

En otro experimento se obtuvo una fracción de endotoxina no tóxica de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 1, siendo la única diferencia el uso de una columna Sephadex G100 antes de la cromatografía en dietilaminoetil celulosa, y no después de ella. El producto fue aislado con rendimiento menor, pero tenía características sustancialmente idénticas a las obtenidas en el Ejemplo 1.

EJEMPLO 3

En otro experimento, una solución acuosa del LPS

22.12.1967

- 10 -

346460



crudo obtenida de las etapas de precipitación salida y diálisis como las descritas en el Ejemplo 1, fué mezclada con una pasta acuosa desaireada de dietilaminoetil celulosa, la cual había sido previamente equilibrada a un pH de 7-8. Se añadió suficiente dietilaminoetilcelulosa para adsorber la masa de la endotoxina y demás componentes que no fuesen el LPS no tóxico (30-40 gr. de dietilaminoetil celulosa Whatman DELL por gramo de LPS crudo disuelto). Se dejó reposar la suspensión a la temperatura ambiente durante 30 minutos, agitando de vez en cuando. Una capa de aproximadamente 1 cm. de dietilaminoetil celulosa, equilibrada a un pH de 7-8 y en suspensión en agua destilada, fué colocada en una columna de Büchner (de 10 cm. de diámetro) y cubierta con un círculo de papel de filtro Whatman número 1 (de 10 cm. de diámetro), La suspensión conteniendo el LPS fué vertida cuidadosamente en el embudo y se recogió el eluente. Se efectuó posterior elución para eliminar el LPS no tóxico restante, usando NH_4HCO_3 de 0,01 M hasta que la absorción de luz ultravioleta del eluente (a 230 milimicras) indicó que virtualmente había sido eliminado de la columna la totalidad del LPS no tóxico. El LPS no tóxico en el eluente fué luego depurado de una forma similar, cuando fué necesario, a fin de eliminar impurezas residuales.

El LPS no tóxico depurado era de un grado de pureza igualmente elevado y tenía idénticas propiedades a las del preparado descrito en el Ejemplo 1.

La preparación cruda de endotoxina fué sacada de la columna de Büchner, en la primera etapa de depuración, por elución con tampón de acetado amónico de 1 M



a un pH de 5,5-8, después de que el LPS no tóxico había sido eluido de la columna. La endotoxina fué además depurada por filtrado en Gel, como se ha descrito en el ejemplo 1.

5 Los altos rendimientos obtenidos por ese método y su facilidad de aplicación lo hacían especialmente adecuado para la preparación en gran escala de LPS no tóxico.

10 La presente solicitud que corresponde a la presentada en Gran Bretaña, con fecha 27 de octubre de 1966, bajo el Nº 48.317/66, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

N O T A

15 Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de la presente solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

20 1.- Un procedimiento para la preparación de un lipopolisacárido no tóxico, purificado que comprende precipitar los lipopolisacáricos de lo que sobrenada del cultivo de bacterias Gram negativas, desarrolladas en condiciones de aireación intensa, dializar el precipitado vuelto a disolver, y aplicar la solución de los lipopolisacáridos a un intercambiador aniónico que retiene de preferencia el lipopolisacárido tóxico (endotoxina), hasta

30

22.12.1967

- 12 - 346460



que el producto eluido y aislado es sustancialmente homogéneo y no tóxico.

2.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en que las bacterias son de la familia de las Enterobacteriáceas.

3.- Un procedimiento según la reivindicación 2, en que las bacterias son de la cepa de Escherichia coli.

4.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en que el intercambiador aniónico es dietilaminoetil celulosa.

5.- Un procedimiento según la reivindicación 4, en que el eluente es un tampón acuoso de pH 8 que tiene una intensidad iónica inferior a 0,01 M.

6.- Un procedimiento según la reivindicación 5, en que el tampón contiene carbonato amónico ácido.

7.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en que las impurezas no tóxicas son eliminadas mediante el uso de xerogeles.

8.- Un procedimiento según la reivindicación 7, en que el xerogel es un material reticulado.

9.- Un procedimiento según la reivindicación 8, en que el material reticulado es una preparación de dextrano reticulado con puentes de glicerilo.

10.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en que el xerogel es usado a continuación de la separación efectuada por el intercambiador aniónico.

11.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que el medio de desarrollo para las bacterias es mantenido a un pH del orden de 6 a 8.



12.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que el lipopolisacárido no tóxico es precipitado con sulfato amónico a bajas temperaturas.

5

13.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que incluye la operación de secar por congelación la fracción de eluente que contiene el lipopolisacárido no tóxico depurado.

14.- Un procedimiento para la preparación de un lipopolisacárido no tóxico, purificado.

10

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y para los fines que se han especificado.

La presente Memoria consta de 14 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 4 ENE. 1960

P.A.

[Handwritten signature]
Alcalde del Ayuntamiento
de Madrid

RM

346460

22.12.1967

- 14 -