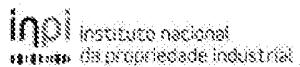


---

(11) Número de Publicação: **PT 1461418 E**



(51) Classificação Internacional:  
**C12N 1/20** (2013.01)

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

---

(22) Data de pedido: **2002.03.28**

(30) Prioridade(s): **2001.03.30 US 280089 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2004.09.29**

(45) Data e BPI da concessão: **2013.04.24  
128/2013**

(73) Titular(es):

**CORIXA CORPORATION  
SUITE 200, 1124 COLUMBIA STREET SEATTLE,  
WA 98104**

US  
US

(72) Inventor(es):

**KENT R. MYERS  
D. SCOTT SNYDER**

US  
US

(74) Mandatário:

**ANTÓNIO INFANTE DA CÂMARA TRIGUEIROS DE ARAGÃO  
RUA DO PATROCÍNIO, Nº 94 1399-019 LISBOA**

PT

(54) Epígrafe: **MÉTODOS PARA A PRODUÇÃO DE 3-O-DESACILADO-4- $\omega$ -MONOFOSFORILLÍPIDO A (3D-MLA)**

(57) Resumo:

É AQUI DIVULGADO UM MÉTODO PARA PRODUZIR LIPOPOLISSACÁRIDO (LPS), COMPREENDENDO: (A) CRESCER UMA CULTURA DE UMA ESTIRPE BACTERIANA MUTANTE RUGOSA PROFUNDA NUM MEIO; (B) MANTER A CULTURA NA FASE ESTACIONÁRIA DURANTE, PELO MENOS, CERCA DE 2 H; (C) COLHER AS CÉLULAS DA CULTURA E; (D) EXTRAIR O LPS A PARTIR DAS CÉLULAS. O MÉTODO PERMITE A PRODUÇÃO DE UM LPS QUE PODE SER UTILIZADO PARA PRODUZIR UM MONOFOSFORIL-LÍPIDO A 3-O-DESACILADO (3D-MLA) COM, PELO MENOS, 20% EM MOL DO GRUPO CONGÉNERE DE HEXA-ACILO. É TAMBÉM AQUI DIVULGADO UM MÉTODO DE EXTRACÇÃO DE LIPOPOLISSACÁRIDO (LPS) A PARTIR DE UMA CULTURA DE CÉLULAS DE ESTIRPE BACTERIANA MUTANTE RUGOSA PROFUNDA, COMPREENDENDO: EXTRAIR AS CÉLULAS COM UMA SOLUÇÃO CONSISTINDO ESSENCIALMENTE DE, PELO MENOS, 75% EM PESO DE UM ÁLCOOL ALIFÁTICO COM 1 A 4 ÁTOMOS DE CARBONO E A ÁGUA DE EQUILÍBRIO, PRODUZINDO ASSIM CÉLULAS COM REDUZIDO CONTEÚDO EM FOSFOLÍPIDO; E (B) EXTRAIR AS CÉLULAS COM REDUZIDO CONTEÚDO EM FOSFOLÍPIDO COM UMA SOLUÇÃO COMPREENDENDO CLOROFÓRMIO E METANOL, PROPORCIONANDO ASSIM UMA SOLUÇÃO DE LPS EM CLOROFÓRMIO E METANOL (CM). ESTE MÉTODO PROPORCIONA SOLUÇÕES DE LPS EM CM QUE APRESENTAM UM REDUZIDO TEOR EM FOSFOLÍPIDO E SÃO PRODUZIDOS EM VÁRIOS PASSOS DE UM PROCESSO SIMPLES E NÃO DISPENDIOSO.

## **RESUMO**

### **"MÉTODOS PARA A PRODUÇÃO DE 3-O-DESACILADO-4'-MONOFOSFORIL-LÍPIDO A (3D-MLA)"**

É aqui divulgado um método para produzir lipopolissacárido (LPS), compreendendo: (a) crescer uma cultura de uma estirpe bacteriana mutante rugosa profunda num meio; (b) manter a cultura na fase estacionária durante, pelo menos, cerca de 2 h; (c) colher as células da cultura e; (d) extrair o LPS a partir das células. O método permite a produção de um LPS que pode ser utilizado para produzir um monofosforil-lípido A 3-O-desacilado (3D-MLA) com, pelo menos, 20% em mol do grupo congénere de hexa-acilo. É também aqui divulgado um método de extração de lipopolissacárido (LPS) a partir de uma cultura de células de estirpe bacteriana mutante rugosa profunda, compreendendo: extraer as células com uma solução consistindo essencialmente de, pelo menos, 75% em peso de um álcool alifático com 1 a 4 átomos de carbono e a água de equilíbrio, produzindo assim células com reduzido conteúdo em fosfolípido; e (b) extraer as células com reduzido conteúdo em fosfolípido com uma solução compreendendo clorofórmio e metanol, proporcionando assim uma solução de LPS em clorofórmio e metanol (CM). Este método proporciona soluções de LPS em CM que apresentam um reduzido teor em fosfolípido e são produzidos em vários passos de um processo simples e não dispendioso.

## **DESCRIÇÃO**

### **"MÉTODOS PARA A PRODUÇÃO DE 3-O-DESACILADO-4'-MONOFOSFORIL-LÍPIDO A (3D-MLA)"**

#### **ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

##### **1. Campo da Invenção**

A presente invenção refere-se, no geral, ao campo da produção bioquímica de 3-O-desacilado-4'-monofosforil-lípido A (3D-MLA). De um modo mais particular, refere-se a métodos para melhorar o rendimento dos congéneres de 3D-MLA desejados ou minimizar o custo da purificação de precursores do lipopolissacárido (LPS) de 3D-MLA.

##### **2. Descrição da Técnica Relacionada**

Tem sido desde há muito reconhecido que os lipopolissacáridos enterobacterianos (LPS) são estimuladores potentes do sistema imunitário. Uma variedade de respostas, tanto benéficas como prejudiciais, pode ser provocada por quantidades na ordem das submicrogramas de LPS. O facto de algumas das respostas serem prejudiciais, e algumas destas poderem ser fatais, tem impedido a utilização clínica de LPS *per se*. Tem sido observado que o componente de LPS mais responsável pela actividade endotóxica é o lípido A.

Consequentemente, tem sido feito um grande esforço para atenuar os atributos tóxicos de LPS ou lípido A, sem diminuir os benefícios imunoestimulantes destes compostos. De entre estes esforços foram notáveis os de Edgar Ribi e seus associados, o que resultou na produção do derivado do lípido A de 3-O-desacilado-4'-monofosforil-lípido A (3D-MLA; composições compreendendo 3D-MLA estão disponíveis comercialmente sob o nome comercial MPL® de Corixa Corporation (Seattle, WA)). O 3D-MLA demonstrou ter, essencialmente, as mesmas propriedades imunoestimulantes que o lípido A mas menor endotoxicidade (Myers et al., Pat. U.S. N° 4912094). Myers et al., também relataram um método para a produção de 3D-MLA, como se segue. Em primeiro lugar, o LPS ou lípido A obtido a partir de uma estirpe mutante profundamente rugosa de uma bactéria gram-negativa (e. g., *Salmonella Minnesota* R595) é submetida a refluxo em soluções de ácido mineral de força moderada (e. g., HCl 0,1 N), durante um período de, aproximadamente, 30 min. Isto leva à desfosforilação na posição 1 da extremidade redutora da glucosamina e descarbo-hidratação na posição 6 da glucosamina não-redutora do lípido A. Em segundo lugar, o lípido A descarbo-hidratado desfosforilado (a.k.a. monofosforil-lípido A ou MLA), é submetido a hidrólise básica por, por exemplo, dissolução num solvente orgânico, tal como clorofórmio:metanol (CM) 2:1 (v/v), saturando a solução numa solução aquosa de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 M a pH 10,5 e evaporação flash do solvente. Isto leva a uma remoção selectiva da porção do ácido β-hidroximirístico na posição 3 do lípido A, resultando em 3-O-desacilado-4'-monofosforil-lípido A (3D-MLA).

A qualidade do 3D-MLA produzido pelo método acima descrito é altamente dependente da pureza e da composição do LPS obtido a partir da bactéria gram-negativa. Por exemplo, o componente

lípido A de LPS é uma mistura de espécies estreitamente relacionadas, que contém entre cerca de 5-7 porções de ácido gordo. Na formação de 3D-MLA, como se torna claro a partir da discussão acima, uma porção de ácido gordo é removida, proporcionando 3D-MLA com entre cerca de 4-6 porções de ácido gordo. É geralmente suportado que o 3D-MLA com, pelo menos, 6 porções de ácido gordo é preferido em termos de combinação de benefícios imunoestimulantes mantidos ou melhorados, toxicidade reduzida e outras propriedades desejáveis (Qureshi e Takayama, em "The Bacteria", vol. XI (Iglewski e Clark, eds.), Academic Press, 1990, pp 319-338).

Outro exemplo, a extracção de LPS de bactérias gram-negativas à escala comercial, envolve, tipicamente, o método de Chen (Chen et al., J. Infect. Dis. 128:543 (1973)); nomeadamente, a extracção com CM, o que leva a uma fase de CM rica em LPS e fosfolípido, a partir do qual o LPS pode ser posteriormente purificado. No entanto, a purificação de LPS a partir da fase CM rica em LPS e fosfolípidos requer, tipicamente, vários passos de precipitação para se obter LPS com pureza suficiente para utilizar em aplicações de imunoestimulantes, tais como, por exemplo, a utilização como um adjuvante de vacinas.

Deste modo, seria desejável dispor de métodos para preparar convenientemente composições de LPS altamente puras. Além disso, seria desejável ter métodos para gerar composições de LPS cujas composições têm 3D-MLA com níveis aumentados de congéneres de hexa-acilo.

As técnicas de fermentação conhecidas têm sido utilizadas para preparar culturas de bactérias gram-negativas compreendendo

LPS facilmente purificáveis. Estas técnicas conhecidas envolvem, tipicamente, a colheita das culturas bacterianas em fase estacionária precoce, mantendo-as de acordo com as práticas bacteriológicas convencionais. No entanto, tem sido observado que o grau de acilação de LPS produzido de acordo com as condições conhecidas é variável. Por exemplo, o conteúdo em espécies hepta-acilo no lípido A de *S. Minnesota* R595 pode variar de 20% a 80%, dependendo do lote (Rietschel et al., Rev. Infect. Dis. 9: S527 (1987)). Esta variabilidade no conteúdo em congénere hepta-acilo resultaria nas diferenças significativas no conteúdo em congénere hexa-acilo em 3D-MLA, preparado a partir desses lotes de LPS.

## SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Numa forma de realização, a presente invenção refere-se a um método para a produção de lipopolissacárido (LPS), compreendendo:

- (a) o crescimento de uma cultura de uma estirpe bacteriana mutante profundamente rugosa num meio;
- (b) manutenção da cultura na fase estacionária durante, pelo menos, cerca de 2 h;
- (c) colheita das células da cultura e;
- (d) extracção de LPS a partir das células.

O método permite a produção de um LPS que proporciona 3D-MLA com uma proporção relativamente elevada (*i. e.*, pelo menos,

cerca de 20% em mol) de congêneres que compreendem seis porções de ácido gordo.

#### BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

As figuras seguintes formam parte da presente descrição e estão incluídas para demonstrar ainda certos aspectos da presente invenção. A invenção pode ser melhor compreendida por referência a uma ou mais destas figuras em combinação com a descrição detalhada das formas de realização específicas aqui apresentadas.

A Figura 1 mostra placas de TLC de extractos de etanol e amostras de LPS, obtidos com diferentes temperaturas durante as extracções com etanol. A placa da esquerda mostra, indo da esquerda para a direita, os extractos com etanol a temperaturas de 22 °C, 37 °C e 50 °C. A amostra mais à direita desta placa é uma amostra de LPS autêntica. A placa à direita mostra o LPS obtido de cada preparação. As amostras nas pistas 3, 4 e 5 correspondem ao LPS das células submetidas a pré-extracções com etanol a 22 °C, 37 °C e 50 °C, respectivamente. As bandas pesadas a  $R_f \sim 0,6$ , correspondem a impurezas do fosfolípido e do ácido gordo. Os níveis destas impurezas são reduzidos aumentando a temperatura da extracção com etanol, e são muito reduzidas na amostra que foi previamente extraída a 50 °C.

## DESCRIÇÃO DAS FORMAS DE REALIZAÇÃO ILUSTRATIVAS

Numa forma de realização, a presente invenção refere-se a um método para a produção de lipopolissacárido (LPS), compreendendo:

- (a) o crescimento de uma cultura de uma estirpe bacteriana mutante profundamente rugosa num meio;
- (b) manutenção da cultura na fase estacionária durante, pelo menos, cerca de 2 h;
- (c) colheita das células da cultura; e
- (d) extracção de LPS a partir das células.

Os lipopolissacáridos são o principal componente lipídico na camada exterior da membrana externa de bactérias gram-negativas. A fracção de lipopolissacárido de uma bactéria gram-negativa comprehende, entre outros componentes, lípido A. Como foi descrito, o lípido A pode ser descarbo-hidratado e parcialmente desfosforilado para proporcionar monofosforil-lípido A (MLA) e o MLA pode ser selectivamente desacilado na posição 3 para proporcionar o 3-O-desacilado-4'-monofosforil-lípido A (3D-MLA).

No entanto, o lípido A produzido por bactérias gram-negativas comprehende, tipicamente, um número de espécies que tem a mesma estrutura geral do lípido A, mas diferem no número de porções de ácidos gordos que contêm. Grupos de espécies de lípido A com o mesmo número de ácidos gordos são aqui referidos como "congéneres". Os congénères do lípido A com 4 a 7 porções de ácido gordo são produzidos pela cultura à

escala comercial convencional, de bactérias gram-negativas, tais como *S. minnesota* R595. Como resultado, o 3D-MLA produzido a partir de, e. g., lípido A de *S. minnesota* R595, tem uma composição congénere variando, tipicamente, de 3 a 6 porções de ácido gordo (porque o 3D-MLA sofreu perda de uma porção de ácido gordo).

A heterogeneidade na composição congénere de 3D-MLA (via lípido A e MLA) é atribuível a duas fontes: (1) variabilidade bioquímica na montagem do lípido A e (2) perda de porções de ácido gordo da estrutura do lípido A durante o processamento para 3D-MLA. Apesar de não estar limitado pela teoria, acredita-se que a variabilidade bioquímica ocorre por causa da especificidade do substrato não absoluta das aciltransferases envolvidas nos passos terminais da biossíntese do lípido A, entre outras explicações. A perda de porções de ácido gordo da estrutura do lípido A, também pode ocorrer durante a hidrólise ácida e alcalina tipicamente utilizada na produção de 3D-MLA.

Surpreendentemente, descobriu-se que a composição congénere de 3D-MLA pode ser alterada através da alteração dos parâmetros de um processo de cultura de uma estirpe bacteriana mutante rugosa profunda que produz lípido A. Especificamente, descobriu-se que a manutenção da cultura da estirpe bacteriana mutante rugosa profunda na fase estacionária durante, pelo menos, cerca de 5 h antes da colheita, resulta numa mudança nas proporções de congéneres de lípido A assim produzidos, de tal forma que, tipicamente, pelo menos, cerca de 20% em mol de 3D-MLA produzidos mais tarde a partir do lípido A, contêm 6 ácidos gordos. De um modo preferido, pelo menos, cerca de 50% em mol do 3D-MLA, contêm seis ácidos gordos. A manutenção no tempo de fase estacionária de cerca de 5,5 h, foi considerada particularmente

eficaz. Isto é em contraste com os processos típicos de cultura conhecidos na técnica, em que a colheita ocorre quase imediatamente após a introdução da cultura em fase estacionária; no processo conhecido, o conteúdo em congénere do LPS é altamente variável e resulta em 3D-MLA com conteúdo em congénere hexa-acílo variável.

Por "estirpe bacteriana mutante rugosa profunda" entende-se uma estirpe de uma bactéria gram-negativa com um fenótipo rugoso profundo. Um fenótipo "rugoso profundo" significa que a porção de polissacárido ligada ao lípido A consiste em apenas cerca de 2-3 resíduos de ácido 2-ceto-3-desoxi-D-manooctulónico (KDO). De um modo preferido, a estirpe bacteriana mutante rugosa profunda é seleccionada do género *Salmonella*. De um modo mais preferido, se a estirpe bacteriana mutante rugosa profunda é do género *Salmonella*, é da espécie *Salmonella minnesota* e, de um modo ainda mais preferido, é da estirpe *Salmonella minnesota R595*. Podem ser utilizadas outras estirpes bacterianas mutantes rugosa profunda, tais como a *Proteus mirabilis*cepas, entre outras.

Pode ser utilizada qualquer técnica adequada para o crescimento de uma estirpe bacteriana mutante rugosa profunda. Tipicamente, isto implicará a utilização de, pelo menos, um biorreactor de escala comercial. Numa forma de realização, a técnica envolve a inoculação de um biorreactor relativamente pequeno (por exemplo, 15 L), com células da estirpe bacteriana mutante rugosa profunda, crescimento da estirpe bacteriana mutante rugosa profunda até uma fase estacionária, seguido por transferência asséptica do caldo de células 15-L para um biorreactor maior (e. g., 750 L).

O crescimento pode ser efectuado em qualquer meio conhecido ou descoberto para permitir o crescimento da estirpe bacteriana mutante rugosa profunda. Numa forma de realização preferida, o meio é M9, uma mistura de sais inorgânicos suplementados com dextrose e ácidos casamino. A composição de M9 é bem conhecida pelos especialistas na técnica.

Após a estirpe bacteriana mutante rugosa profunda ter sido mantida em fase estacionária durante, pelo menos, cerca de 5 h, as células podem ser colhidas a partir da cultura e extraír-se o LPS a partir das células. Podem ser empregues técnicas conhecidas para colheita de células a partir da cultura e extraír-se o LPS a partir das células, embora uma técnica preferida para a extracção de LPS a partir das células seja descrita abaixo.

A colheita pode ser efectuada por qualquer técnica conhecida. Numa forma de realização preferida, após a cultura de células ter sido mantida na fase estacionária durante, pelo menos, cerca de 5 h, o conteúdo do biorreactor é bombeado para um dispositivo de filtração tangencial, para separar o meio gasto das células.

O LPS é depois extraído a partir das células, através de qualquer técnica apropriada. As técnicas conhecidas incluem o método de Galanos, que envolve a extracção de LPS com uma mistura de fenol, clorofórmio e éter de petróleo (PCP), seguido por evaporação do clorofórmio e éter de petróleo, adição de acetona e água para precipitar o LPS, e recuperação de LPS por centrifugação ou filtração (Galanos et al., Eur. Eur. J. Biochem. 9:245 (1969)), e o método de Chen, citado acima, que envolve a extracção de LPS com uma mistura de clorofórmio e

metanol (CM), seguido por uma série de passos de precipitação com metanol.

Um aperfeiçoamento do método de Chen é descrito a seguir e é preferido para a produção de LPS e seus derivados para aplicações comerciais.

Independentemente da técnica de extracção, o resultado é um LPS seco substancialmente puro, que pode depois ser processado por hidrólise ácida sequencial e hidrólise básica para formar 3D-MLA, tal como é ensinado por Ribi, Pat. U.S. Nº 4436727, e Myers et al., Pat. U.S. Nº 4912094. Para resumir os ensinamentos destas referências como uma forma de realização preferida para a formação de 3D-MLA, o LPS é feito reagir com um ácido orgânico ou inorgânico e, em seguida, liofilizado para produzir MLA. O ácido inorgânico é, de um modo preferido, ácido clorídrico, ácido sulfúrico ou ácido fosfórico. O ácido orgânico é, de um modo preferido, o ácido toluenossulfónico ou ácido tricloroacético. A reacção pode ser efectuada a uma temperatura entre cerca de 90 °C e cerca de 130 °C, durante um período de tempo suficiente para completar a hidrólise, geralmente entre cerca de 15 min e cerca de 60 min. O MLA pode ser tratado com um solvente, de um modo preferido, acetona, para dissolver os ácidos gordos e outras impurezas, e o solvente de ácido gordo rico em impurezas é removido.

Depois disso, o MLA é submetido a tratamento alcalino suave para remover selectivamente o ácido  $\beta$ -hidroximirístico da posição 3 do MLA (sob condições alcalinas moderadas, apenas o ácido  $\beta$ -hidroximirístico na posição 3 está instável). O tratamento alcalino moderado pode ser efectuado em meios aquosos ou orgânicos. Os solventes orgânicos apropriados incluem o

metanol ou outros álcoois, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), clorofórmio, diclorometano ou suas misturas, entre outros. Podem também ser empregues combinações de água e solventes orgânicos miscíveis com água.

A base alcalina utilizada para efectuar a hidrólise é, de um modo preferido, seleccionada de hidróxidos, carbonatos, fosfatos ou aminas. As bases inorgânicas ilustrativas incluem hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, carbonato de sódio, bicarbonato de potássio, bicarbonato de sódio e bicarbonato de potássio, entre outros. As bases orgânicas ilustrativas incluem alquilaminas (tais como a dietilamina e a trietilamina, entre outras), entre outras.

Em meio aquoso, o pH está, tipicamente, entre cerca de 10 e cerca de 14, de um modo preferido, entre cerca de 10 e cerca de 12. A reacção de hidrólise é, tipicamente, efectuada desde cerca de 20 °C até cerca de 80 °C, de um modo preferido, entre cerca de 50 °C até cerca de 60 °C, durante um período de cerca de 10 min a cerca de 48 h.

Uma técnica preferida para a hidrólise alcalina envolve a dissolução de MLA em CM 2:1 (v/v), saturando a solução com um tampão aquoso de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 0,5 M a pH 10,5, e, em seguida, evaporação flash do solvente a 45–50 °C sob um aspirador de vácuo (aproximadamente, 100 mm de Hg).

Numa outra forma de realização, a presente divulgação refere-se a um método de extracção de lipopolissacárido (LPS) a partir de uma cultura de células da estirpe bacteriana mutante rugosa profunda, compreendendo:

- (a) extracção das células com uma solução consistindo essencialmente em, pelo menos, cerca de 75% em peso de um álcool alifático com 1 a 4 átomos de carbono e a água de equilíbrio, produzindo assim células com um reduzido conteúdo em fosfolípido;
- (b) extracção das células com reduzido conteúdo em fosfolípido com uma solução compreendendo clorofórmio e metanol, proporcionando assim uma solução de LPS em clorofórmio e metanol.

As células da estirpe bacteriana mutante rugosa profunda, a sua cultura e os métodos de preparação da cultura são como descrito acima. De um modo preferido, a estirpe bacteriana mutante rugosa profunda é seleccionada do género *Salmonella* ou *Escherichia*. De um modo mais preferido, se a estirpe estirpe bacteriana mutante rugosa profunda for do género *Salmonella*, é da espécie *Salmonella minnesota* e, de um modo ainda mais preferido, é a estirpe *Salmonella minnesota* R595. Se a estirpe bacteriana mutante rugosa profunda for do género *Escherichia*, de um modo mais preferido, é da espécies *Escherichia coli* e, de um modo ainda mais preferido, é a estirpe *Escherichia coli* D31m4.

O primeiro passo de extracção pode ser efectuado com qualquer tipo de álcool alifático de cadeia curta. O álcool alifático pode ser linear, ramificado ou cíclico. De um modo preferido, o álcool alifático tem de 2 a 4 átomos de carbono e é miscível com água. De um modo mais preferido, o álcool alifático é etanol.

A solução compreendendo o álcool alifático pode compreender qualquer proporção de álcool alifático de 75% em peso ou

superior. De um modo preferido, a solução comprehende entre cerca de 85% em peso e cerca de 95% em peso de álcool alifático. Essencialmente, o equilíbrio da solução é a água. Podem estar presentes vestígios de outros compostos como resultado da purificação incompleta ou outra contaminação do álcool alifático e dos componentes da água da solução.

A temperatura à qual o primeiro passo de extracção é efectuado pode ser qualquer temperatura que seja eficaz no fornecimento de extracção suficiente de fosfolípido a partir das células cultivadas. De um modo preferido, a temperatura está entre cerca de 35 °C e cerca de 65 °C. De um modo mais preferido, a temperatura está entre cerca de 45 °C e cerca de 55 °C.

Outros parâmetros do primeiro passo de extracção, tais como taxa de adição da solução de álcool alifático, a duração do contacto da solução e das células e a agitação ou a falta dela, entre outros, podem ser rotineiramente variados por um especialista na técnica.

O primeiro passo de extracção resulta (i) numa fase de solução de álcool alifático rica em fosfolípidos e (ii) células com um reduzido conteúdo em fosfolípido. O componente LPS das membranas celulares separa-se, de um modo substancial, completamente das células com um conteúdo em fosfolípido reduzido.

O segundo passo de extracção envolve a extracção das células com um conteúdo reduzido de fosfolípido, com uma solução de clorofórmio:metanol (CM).

Qualquer proporção de clorofórmio e metanol conhecida por ser adequada para utilização na extracção de LPS a partir de membranas de células (tal como no método de Chen), pode ser utilizada no segundo passo de extração. Tipicamente, a proporção de clorofórmio para metanol é de cerca de 2:1 a cerca de 9:1. As misturas de solventes com propriedades equivalentes às de MC podem também ser utilizadas para obter LPS, a partir das células, com um reduzido conteúdo em fosfolípido.

Uma vantagem do presente método em relação ao método de Chen reside na remoção de fosfolípido no primeiro passo de extracção. Considerando que a extracção de CM do método Chen resulta numa solução de LPS que contém níveis substanciais de fosfolípidos, o segundo passo de extração da presente invenção, sendo realizado em células com um conteúdo reduzido em fosfolípido, resulta numa solução rica em LPS que é substancialmente desprovida de fosfolípidos. Os métodos alternativos de produção de preparações de LPS que são relativamente livres de fosfolípidos, tal como o método de Galanos (ver acima), são menos desejáveis porque não são favoráveis à produção em larga escala, porque utilizam misturas de solventes que apresentam problemas para a saúde e segurança (e. g., fenol:clorofórmio:éter de petróleo) ou ambos.

Dada a ausência substancial de fosfolípido a partir da solução de LPS, a purificação posterior do LPS de acordo com este método é, geralmente, mais simples e menos dispendiosa do que sob o método de Chen. Verificou-se que pode ser formado um resíduo de LPS seco de pureza suficiente, por evaporação do clorofórmio e metanol a partir da solução de LPS.

Opcionalmente, o LPS pode ser depois processado, tal como os passos de hidrólise ácida e hidrólise básica descritos acima, para a produção de MLA ou 3D-MLA.

O 3D-MLA produzido seguindo os métodos descritos acima pode ser utilizado para vários objectivos. Uma utilização preferida é como um imunoestimulante ou adjuvante para composições farmacêuticas compreendendo um polinucleótido imunogénico, polipéptido, anticorpo, célula-T ou células apresentando抗原 (APC). Um imunoestimulante ou adjuvante refere-se a, essencialmente, qualquer substância que aumenta ou potencia uma resposta imunitária (anticorpo e/ou mediado por célula), a um抗原 exógeno.

Uma resposta imunitária que o MLA ou 3D-MLA, produzidos de acordo com a presente invenção, pode estimular é o tipo Th1. Tem sido observado que uma combinação de monofosforil-lípido A (MLA), de um modo preferido, monofosforil-lípido A 3-des-O-acilado (3D-MLA), juntamente com um sal de alumínio, é eficaz como um adjuvante para desencadear uma resposta predominantemente do tipo Th1. Os níveis elevados de citocinas do tipo Th1 (e. g., IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-2 e IL-12), tendem a favorecer a indução de respostas imunitárias mediadas por células a um抗原 administrado. Em contraste, os níveis elevados de citocinas do tipo Th2 (e. g., IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10), tendem a favorecer a indução de respostas imunitárias humorais. Após a aplicação de uma composição farmacêutica compreendendo MLA ou 3D-MLA, um doente irá apoiar uma resposta imunitária que inclui respostas de tipo Th1 e Th2. Quando a resposta é, predominantemente, do tipo Th1, o nível de citocinas do tipo Th1 irá aumentar para um grau maior do que o nível de citocinas de tipo Th2. Os níveis destas citocinas podem ser

prontamente avaliados utilizando ensaios convencionais. Para uma revisão das famílias de citocinas, ver Mosmann e Coffman, Ann. Rev. Immunol. 7:145-173, 1989.

Numa forma de realização preferida, o sistema de adjuvante inclui a combinação de um monofosforil-lípido A (MLA), de um modo preferido, 3D-MLA, com um derivado de saponina (tal como Quil A ou seus derivados, incluindo QS21 e QS7 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA); Escina; Digitonin, ou *Gypsophila* ou *Chenopodium quinoa* saponinas), tais como a combinação de adjuvante QS21 e 3D-MLA, como descrito no documento WO 94/00153, ou uma sua composição menos reactogénica em que o QS21 é atenuado com colesterol, como descrito no documento WO 96/33739. Outras formulações preferidas compreendem uma emulsão óleo-em-água e tocoferol. Outra formulação de adjuvante particularmente preferida, empregando QS21, 3D-MLA e tocoferol numa emulsão de óleo-em-água, está descrita no documento WO 95/17210.

Os exemplos a seguir estão incluídos para demonstrar formas de realização preferidas da invenção. Deverá ser evidente para os especialistas na técnica que as técnicas divulgadas nos exemplos que se seguem representam técnicas descobertas pelo inventor para funcionar bem na prática da invenção e, assim, podem ser consideradas para constituir modos preferidos para a sua prática.

## **Exemplo 1 - Métodos Gerais**

### **A. Preparação do meio**

O crescimento celular foi efectuado em meio M9, que é preparado por combinação de soluções estéreis de sais inorgânicos, de ácidos casamino e dextrose. A solução de sal M9 é, tipicamente, preparada no fermentador e contém os seguintes sais: 2,0 g/L de NaCl, 0,2 g/L de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 3,0 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6,0 g/L de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 1,0 g/L de NH<sub>4</sub>Cl. As soluções estéreis de ácidos casamino a 20% (p/v) (20 mL/L) e dextrose 50% (p/v) (32 mL/L) são depois adicionados assepticamente ao fermentador para proporcionar o meio completo.

### **B. Crescimento das sementes**

Tipicamente, um frasco Erlenmeyer de 250 mL esterilizado foi carregado com 50 mL de meio M9 estéril. Um frasquinho de semente de *Salmonella minnesota* R595 (ca. 10<sup>8</sup> ufc) foi descongelado e adicionado ao frasco, que foi em seguida tapado com um tampão de gaze. A cultura foi incubada a 37 °C, durante 6-8 horas, até que fosse evidente o crescimento robusto.

### **C. Crescimento celular**

As culturas de *Salmonella minnesota* R595 foram cultivadas num fermentador BioFlo III (New Brunswick Scientific, Inc.), equipado com um recipiente de vidro de 2,5 L. Numa corrida típica, o recipiente foi carregado com 2,0 L de solução de sais M9, autoclavado e as soluções estéreis dos ácidos casamino e

dextrose foram depois adicionadas assepticamente. O fermentador foi equipado com linhas de alimentação de agente anti-espuma (SAG-471 a 0,1%, Witco Corp) e NH<sub>4</sub>OH (30%), bem como sondas de pH, dO<sub>2</sub> e espuma. O meio foi ajustado para pH 6,9 utilizando a alimentação NH<sub>4</sub>OH. O fermentador foi depois inoculado com a cultura de sementes inteira e foi incubado a 37 °C, com borbulhamento de ar (tipicamente 2,0 LPM) e agitação (tipicamente 50 rpm). A fase de crescimento da cultura foi monitorizada através de medição da densidade óptica a 590 nm. As células foram colhidas por centrifugação ou filtração de fluxo tangencial, lavadas com água e liofilizadas.

#### D. Extracção do lipopolissacárido (LPS)

O LPS foi isolado de acordo com o procedimento de Qureshi *et al.* (1986) com pequenas modificações. Numa corrida típica, as células secas foram inicialmente agitadas a uma concentração de 20 mg/mL em etanol a 90% (v/v), à temperatura ambiente durante 1 h e, em seguida, foram recuperadas por filtração a vácuo. As células foram submetidas a uma segunda extracção com etanol, seguidas por extracções sequenciais com acetona e éter dietílico (15 min cada, ambas com 40 mg/mL com base no peso inicial), e o pó de éter resultante foi deixado a secar ao ar, de um dia para o outro. Entretanto, uma solução de fenol (89%):clorofórmio:éter de petróleo 19:45:72 (v/v/v; abreviado PCP), foi preparada e deixada a repousar, de um dia para o outro. O pó de éter foi suspenso em PCP, que foi decantado do excesso de água, a uma concentração de 70 mg/mL. A solução foi agitada, durante 30 min e, em seguida, foi centrifugada (3000 xg, 15 minutos, 0–5 °C). A fracção do sobrenadante foi decantada para um balão de fundo redondo e o

sedimento de células foi extraído uma segunda vez com PCP. As fracções de sobrenadante foram combinadas e evaporadas em evaporador rotativo a 40 °C até todos os solventes voláteis terem sido, em grande parte, removidos. O volume restante foi então medido. Foi adicionada água, gota a gota, até ser evidente uma turbidez persistente e, em seguida, foram adicionados 5 volumes de acetona seguidos por 1 volume de éter dietílico (ambos arrefecidos num banho de gelo), à solução de fenol com mistura rápida. A solução foi colocada num banho de gelo durante 30 min e, em seguida, os precipitados de LPS foram recuperados por centrifugação (5000 xg, 15 minutos, 0-5 °C). Foi necessário, no geral, filtrar por gravidade a fração de sobrenadante para recuperar qualquer LPS que não permaneceu no sedimento. O LPS foi lavado uma vez num volume mínimo de acetona fria, recuperado por centrifugação/filtração e foi, depois, seco sob vácuo. Os rendimentos típicos foram de 4-5% com base no peso seco inicial das células.

#### E. Preparação de 4'-monofosforil-lípido A (MLA)

O LPS foi suspenso em água a uma concentração de 10 mg/mL, utilizando um banho de sonicação a 45-55 °C, para ajudar a dispersar o material sólido. A solução resultante deverá ser ligeiramente turva, sem sólido visível a olho nu. A esta solução foi adicionado 1 volume de HCl 0,2 N, e foi depois colocado num banho de água a ferver durante 15 min. A reacção foi arrefecida num banho de gelo e, em seguida, foi extraída com 5 volumes (em relação à solução inicial de LPS) de clorofórmio:metanol 2:1 (v/v). A solução bifásica foi agitada em vortex e as fases foram separadas por centrifugação a baixa velocidade (500-1000 x g). A

fase inferior foi recuperada e evaporada sob azoto, obtendo-se MLA bruto.

F. Preparação do 3-O-desacilado-4'-monofosforil-lípido A (3D-MLA)

O MLA em bruto foi dissolvido em clorofórmio:metanol 2:1 (v/v), a uma concentração de entre cerca de 1-5 mg/mL, e 3,0 mL desta solução foram transferidos para um tubo de ensaio de 16x100 mm. Foram adicionados mais 0,4 mL de metanol ao tubo, e foi depois colocado num banho de água a 50 °C, durante 10 min. A reacção foi iniciada por adição de 40 µL de KHCO<sub>3</sub> 0,5 M, pH 10,5 e a solução foi incubada a 50 °C, durante 20 min. No final deste intervalo de tempo, o tubo foi removido do banho de água e a reacção foi atenuada pela adição de 2,0 mL de HCl 0,1 N (gelado), seguido por agitação em vortex. O 3D-MLA foi recuperado pela adição de 1,0 mL de metanol, submetido a vortex, centrifugação (500-1000 x g) e evaporação da fase inferior (orgânica) até à secura sob azoto.

**EXEMPLO 2 – Métodos analíticos**

A. Cromatografia em camada fina (TLC) de MLA e amostras relacionadas

Todas as análises de TLC foram efectuadas utilizando placas de 5 x 10 cm revestidas com Sílica Gel 60 (E Merck). As amostras foram aplicadas, no geral, às placas de TLC como soluções de 10 mg/mL em clorofórmio:metanol 4:1 (v/v), com solução de 3 µL (30 µg de amostra) aplicados em pequenos pontos numa linha de

5 mm, utilizando uma pipeta capilar. As placas foram desenvolvidas com um sistema de solventes compreendendo clorofórmio/metanol/água/hidróxido de amónio 50:31:6:2 (v/v). As bandas nas placas desenvolvidas foram visualizadas por pulverização com uma solução de ácido fosfomolibídico a 10% (p/v) em etanol, seguida por carbonização a 150-160 °C. Em alguns casos, as intensidades relativas das manchas foram quantificadas por densitometria de varrimento com um Scanner Flying Spot de Comprimento de Onda Duplo Shimadzu CS9000U (Shimadzu Corp), utilizando um comprimento de onda de varrimento de 520 nm.

B. Análise de MLA/3D-MLA por cromatografia líquida de elevado desempenho (HPLC)

As amostras a serem analisadas foram inicialmente convertidas na forma de ácido livre, por lavagem de uma solução de 3-5 mg de amostra em 5 mL de clorofórmio:metanol (2:1 v:v), com 2 mL de HCl 0,1 N. O sistema bifásico foi submetido a vortex, centrifugado e a fase inferior (orgânica) foi transferida para um tubo de ensaio e evaporada sob uma corrente de azoto. O resíduo foi então metilado por tratamento com diazometano. Resumidamente, uma solução etérea de diazometano foi preparada pela colocação de 60-100 mg de 1-metil-3-nitro-1-nitrosoguanidina (MNNG; Aldrich) num frasquinho de 2 dram, adicionando-se 60 µL de éter dietílico por mg de MNNG, em seguida, adicionando-se 9 µL de NaOH 5 N por mg de MNNG, agitando-se a solução a <-10 °C. Após a conclusão da reacção, a fase de éter amarelo limão foi seca, transferindo-a para um segundo frasco que continha vários sedimentos de NaOH e submeteu-se a rotação, ao mesmo tempo, a <-10 °C. A amostra lavada com ácido foi dissolvida em 1 mL de clorofórmio:metanol

4:1 (v:v), colocada num banho a <-10 °C e foi adicionada uma solução de diazometano, gota a gota, com agitação até uma tonalidade amarelo pálido persistir. O solvente foi em seguida evaporado à temperatura ambiente sob uma corrente de azoto e foi ainda seco sob vácuo durante, pelo menos, 30 min.

As análises cromatográficas foram efectuadas numa coluna C<sub>18</sub> de fase inversa (Nova-Pak, tamanho de partícula de 4 µm, 8 mm x 10 cm [Waters]). As amostras metiladas foram dissolvidas em clorofórmio: metanol 4:1 (v/v), a uma concentração de 100 µg/mL, e feitas passar através de um filtro de seringa de PTFE 0,45 µm. Foi tipicamente utilizado um volume de injecção de 20-25 mL, seguido de eluição com um gradiente linear de 20 a 80% de isopropanol em acetonitrilo ao longo de 60 min, a um caudal de 2 mL/min, com monitorização a 210 nm.

### C. Análise do conteúdo em congénere de LPS por HPLC

O LPS tende a ser um material altamente heterogéneo devido à variabilidade em 1) número de resíduos de açúcar nas regiões de O-antigénio e do núcleo, 2) substituições polares na região do núcleo e nos fosfatos do lípido A e 3) número e localização dos ácidos gordos ligados à estrutura do lípido A. É esta última fonte de variabilidade que é de interesse em relação ao conteúdo em congénere de 3D-MLA (MPL®). A hidrólise de LPS em MLA e 3D-MLA remove a variabilidade nas regiões de O-antigénio e do núcleo, no entanto, também introduz heterogeneidade adicional devido à perda não controlada de ácidos gordos O-ligados. Isto evita que o padrão de acilação no LPS intacto seja conhecido com exactidão. Como uma forma de contornar isso, foi desenvolvido um método no qual os fosfatos e a região do núcleo são removidos

sob condições moderadas que não resultam em perda de ácidos gordos O-ligados. O lípido A desfosforilado resultante (zero fosforil-lípido A ou ZPL) pode depois ser analisado por HPLC, obtendo-se uma reflexão precisa do padrão de acilação no LPS parental.

O método foi tipicamente efectuado como se segue. Entre 0,5-5,0 mg de amostra de LPS foram hidrolisadas em 200 µL de ácido fluorídrico concentrado durante 3-4 h a 27 °C. Esta reacção deve ser efectuada num tubo de Teflon bem fechado e num exaustor bem ventilado. O HF foi removido por evaporação sob uma corrente de azoto à temperatura ambiente e o hidrolisado foi, depois, dissolvido em clorofórmio:metanol 4:1 (v/v) e transferido para um tubo de ensaio de vidro de 16x100 mm, e o solvente foi evaporado sob uma corrente de azoto. O resíduo foi suspenso em 1,0 mL de trietilamina a 0,1% utilizando um banho de ultrassons, foi adicionado 1,0 mL de NaOAc 40 mM e o tubo foi suspenso num banho de água a ferver durante 30-45 min. A reacção foi parada por arrefecimento num banho de gelo e o ZPL foi recuperado por extracção com 5 mL de clorofórmio:metanol 2:1 (v/v). A fase orgânica foi transferida para um frasquinho de tampa de rosca e o solvente foi evaporado sob azoto. O ZPL foi derivatizado por adição de 200 µL de HCl de O-(3,5-dinitrobenzil)hidroxilamina a 10 mg/mL (Regis Technologies, Inc.) em piridina, fechando bem o frasquinho, depois, incubado a 60 °C, durante 3 h. A piridina foi evaporada sob azoto e o resíduo foi, depois, seco sob vácuo durante >30 min. O resíduo foi, depois, suspenso em 500 µL de clorofórmio:metanol 2:1 (v/v) e carregado num leito de 0,5-1,0 mL de Accell-QMA (na forma de acetato; Waters) que tinha sido pré-equilibrado no mesmo solvente. A coluna foi lavada com um total de 5,0 mL de clorofórmio:metanol 2:1 (v/v) em várias pequenas porções e o eluato foi recolhido num tubo de ensaio de

16x100 mm. Foram adicionados 2,0 mL de HCl 0,1 N ao eluato, o sistema bifásico foi submetido a vortex, centrifugado brevemente a 500-1000 x g, e a fase inferior (orgânica) foi transferida para um outro tubo de ensaio e evaporada sob azoto. O resíduo foi dissolvido em 100-300 µL de clorofórmio:metanol 4:1 (v/v) e filtrado através de um filtro de seringa de PTFE 0,45 µm. O filtro foi lavado duas vezes com clorofórmio:metanol 4:1 (v/v) e o filtrado foi evaporado sob azoto. O filtrado foi, finalmente, recolhido em 50-150 µL de clorofórmio:metanol 4:1 (v/v) e transferido para um frasquinho auto-injector para análise por HPLC. As condições de HPLC foram as seguintes: coluna C<sub>18</sub> de fase inversa (e. g., Waters), volume de injecção de 10 µL, gradiente linear de 20 a 80% de isopropanol em acetonitrilo durante 60 min a um caudal de 2 mL/min, monitorizada a 254 nm.

**Exemplo 3 – Comparação da composição congénere de MLA/3D-MLA de culturas colhidas em diferentes tempos**

Uma série de corridas de fermentador foi efectuada com os seguintes parâmetros: 2,0 L de meio M9 (pH inicial de 6,84-6,87), 2 Lpm de fluxo de ar, sob agitação a 50 rpm, 37 °C, sem controlo de pH. As culturas foram monitorizadas medindo a densidade óptica a 590 nm e foram interrompidas quando o estágio de crescimento desejado foi alcançado. As células foram processadas e extraídas como descrito acima, para produzir amostras de LPS, que foram, em seguida, hidrolisadas em MLA e 3D-MLA e analisadas por HPLC (ver Exemplos 1 e 2). Os resultados estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1. Composição congénere do MLA e 3D-MLA a partir de células colhidas em diferentes fases.

Corrida	Descrição	Idade da cultura no momento da colheita	Tempo na fase estacionária	MLA		3D-MLA
				3-O-hexa-acilo desacilado	Hepta-acilo	3-O-hexa-acilo desacilado
A	Tardia exponencial	6,75 h	N/A	12,4%	12,2%	9,9%
B	Fase estacionária precoce	9,5 h	~0,5 h	9,2%	6,8%	9,2%
C	Fase estacionária tardia	15 h	~6 h	19,5%	13,2%	21,5%

Os dados mostram que as culturas de *S. minnesota* R595 altera o padrão de acilação dos seus LPS durante a fase estacionária, resultando num aumento no conteúdo total de hexa-acilo 3-O-desacilado mais espécies hepta-acilo em derivados de MLA deste LPS, e isto, por sua vez, dá origem a um aumento no conteúdo de espécies hexa-acilo 3-O-desaciladas em 3D-MLA preparados a partir deste MLA.

Exemplo 4 – Comparação da composição congénere de LPS a partir de culturas colhidas em diferentes tempos

Uma série de corridas de fermentador foi realizada com os seguintes parâmetros: 2,0 L de meio M9 (pH inicial de 6,84-6,87), o fluxo de ar de 2 Lpm, agitação a 225 rpm, 37 °C, sem controlo de pH. A fase de crescimento das culturas foi

monitorizada por medição da densidade óptica a 590 nm. As células foram processadas e extraídas como descrito no Exemplo 1, para produzir amostras de LPS. As amostras de LPS foram hidrolisadas com ZPL e analisadas por HPLC, como descrito no Exemplo 2. Os resultados estão resumidos na Tabela 2.

Tabela 2. Composição congénere de LPS a partir de células colhidas em diferentes idades.

Corrida	Descrição	Idade da cultura no momento da colheita	Tempo em fase estacionária	Conteúdo em congénere		
				hexa-acilo	hexa-acilo 3-O-desacilado	Hepta-acilo
A	Fase estacionária precoce	9 h	~0,5 h	76%	0%	24%
B	Fase estacionária tardia	15 h	~6 h	48%	17%	19%

Não foi detectado componente hexa-acilo 3-O-desacilado no LPS das células em fase estacionária precoce (corrida A). Assim, a única fonte de congéneres hexa-acilados em 3D-MLA preparado a partir deste LPS seria o material hepta-acilado (24%). Em contraste, o LPS a partir de células colhidas na fase estacionária tardia, continha espécies hepta-acilo e hexa-acilo 3-O-desacilado (19% e 17%, respectivamente). Ambas as espécies poderão contribuir para o conteúdo em hexa-acilo em 3D-MLA (MPL®) preparado a partir deste LPS. Foi inesperado verificar que as

células produzem espécies hexa-acilo 3-O-desacilado de LPS sob certas condições.

**EXEMPLO DE REFERÊNCIA 5 - Efeito da temperatura de pré-extracção na pureza de LPS de *S.minnesota* R595**

As células de *S. minnesota* R595 foram cultivadas num fermentador de 80 L (New Brunswick Scientific), utilizando essencialmente as mesmas condições, conforme descrito no Exemplo 1. As células foram concentradas por filtração de fluxo tangencial, mas não foram centrifugadas, e a pasta continha 51,5 mg de massa celular seca por mL. Foram preparadas três soluções em que alíquotas de 150 mL da suspensão de células foram, cada uma delas, combinadas com 600 mL de etanol. As soluções de etanol foram agitadas durante 1 h a 22 °C, 37 °C e 50 °C e foram filtradas. As células foram submetidas a uma segunda extracção do etanol sob as mesmas condições, excepto utilizando etanol a 95%. As células foram recuperadas por filtração por sucção e em seguida foram extraídas, de um dia para o outro, em clorofórmio:metanol 4:1 (v/v) a 50 °C. As soluções foram filtradas e os filtrados foram evaporados em evaporador rotativo até à secura, proporcionando as preparações de LPS. As amostras do primeiro e segundo filtrados da extracção com etanol obtidos a cada temperatura, bem como o LPS obtido a partir das células pré-extraídas, foram analisados por cromatografia em camada fina, de acordo com o método descrito no Exemplo 2. As imagens das placas de TLC são apresentadas na Figura 1.

A Figura 1 mostra as placas de TLC de extractos com etanol e amostras de LPS obtidas com diferentes temperaturas durante as extracções com etanol. A placa da esquerda mostra, indo da

esquerda para a direita, os extractos com etanol a temperaturas de 22 °C, 37 °C e 50 °C. A amostra mais à direita desta placa é uma amostra de LPS autêntico. A placa à direita mostra o LPS obtido em cada preparação. As amostras nas pistas 3, 4 e 5 correspondem ao LPS de células submetidas a pré-extracções com etanol a 22 °C, 37 °C e 50 °C, respectivamente. As bandas pesadas em  $R_f \sim 0,6$  correspondem a impurezas do fosfolípido e de ácidos gordos. Os níveis destas impurezas são reduzidos aumentando a temperatura da extracção com etanol, e são muito baixas na amostra que foi pré-extraída a 50 °C.

É evidente a partir das placas de TLC na Figura 1, que a pré-extracção com etanol a temperaturas elevadas, é eficaz na remoção de impurezas, que de outra forma são co-extraídas com clorofórmio:metanol 4:1 (v/v). A pré-extracção a 50 °C resulta em LPS que é largamente livre dessas impurezas.

**EXEMPLO DE REFERÊNCIA 6 – Comparação de LPS obtido com e sem pré-extracção com etanol**

Três lotes de células *S. minnesota* R595 foram cultivados num fermentador de 750 L (B. Braun), utilizando as mesmas condições como descrito no Exemplo 1. As células foram recolhidas por filtração de fluxo tangencial e foi obtida uma amostra da suspensão de células a partir de cada lote e liofilizada. A maior parte das células foram submetidas a duas pré-extracções com etanol a 90%, a 50 °C durante 1 h. As células foram recuperadas por filtração de fluxo tangencial entre extracções. As células foram depois extraídas de um dia para o outro, com clorofórmio:metanol 4:1 (v/v), sob refluxo. O extracto foi recuperado por filtração de fluxo tangencial e evaporado até à

secura. As amostras de células liofilizadas foram extraídas, de um dia para o outro, sob refluxo de clorofórmio:metanol 4:1 (v/v), e as soluções foram filtradas e os filtrados foram evaporados até à secura. As amostras de LPS obtidas com e sem pré-extracção com etanol foram analisadas por TLC, essencialmente como descrito no Exemplo 2. As placas de TLC foram digitalizadas a partir de cerca de  $R_f = 0,01$  a  $0,90$ , e a razão de intensidade na região de LPS ( $P_f = 0,01$  a  $0,20$ ) para a intensidade total foi calculada para cada amostra. Os resultados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Pureza de LPS a partir de células com e sem pré-extracção com etanol.

Corrida	Número do lote	Percentagem da intensidade total na região LPS <sup>1</sup>	
		sem pré-extracção com etanol	com pré-extracção com etanol
A	48020-B2698C	7	86
B	48020-C0598A	11	83
C	48020-C0598B	14	88
Nota: 1 por cento da intensidade total na região LPS = $[(\text{intensidade em } R_f = 0,01 \text{ a } 0,20) / (\text{intensidade em } R_f = 0,01 \text{ a } 0,90)] \times 100$			

Os resultados na Tabela 3 demonstram que o LPS obtido após pré-extracção de células de *S. minnesota* R595 com etanol a 90% a 50 °C é, substancialmente, mais puro do que o material obtido a partir de células sem pré-extracção.

Todos os métodos divulgados e reivindicados aqui podem ser feitos e executados sem sofrerem experimentação à luz da presente divulgação.

Lisboa, 28 de Junho de 2013

## REIVINDICAÇÕES

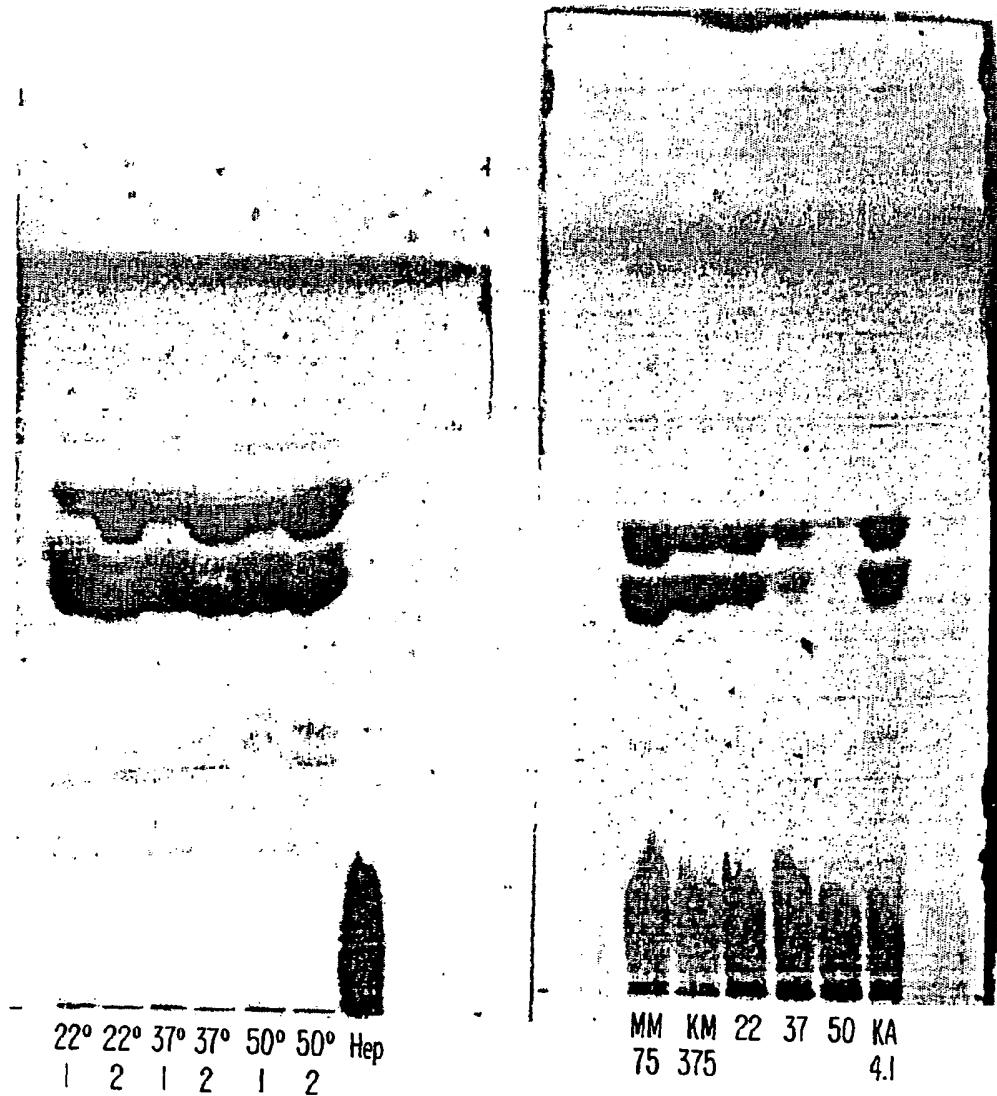
1. Método para produzir uma composição de lipopolissacárido (LPS), compreendendo:
  - (a) O crescimento de uma cultura de uma estirpe bacteriana mutante rugosa profunda num meio;
  - (b) Manutenção da cultura na fase estacionária durante, pelo menos, cerca de 5 h;
  - (c) Colheita das células da cultura; e
  - (d) Extracção de LPS a partir das células
2. Método da reivindicação 1, em que a estirpe bacteriana mutante rugosa profunda é do género *Salmonella*.
3. Método da reivindicação 2, em que a estirpe bacteriana mutante rugosa profunda do género *Salmonella* é da espécie *Salmonella Minnesota*.
4. Método da reivindicação 3, em que a estirpe bacteriana mutante rugosa profunda da espécie *Salmonella Minnesota* é a estirpe *Salmonella minnesota R595*.
5. Método de qualquer uma das reivindicações 1 a 4, em que o meio é M9.
6. Método de qualquer uma das reivindicações 1 a 5, em que a manutenção é efectuada durante entre 5 h e cerca de 6 h.

7. Método de qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que o LPS pode ser utilizado para produzir um monofosforil-lípido A 3-O-desacilado com, pelo menos, 20% em mol do grupo congénere de hexa-acilo.
8. Método de qualquer uma das reivindicações até 7, compreendendo ainda submeter o LPS a hidrólise ácida sequencial e hidrólise básica, para formar monofosforil-lípido A 3-O-desacilado.

Lisboa, 28 de Junho de 2013

1/1

Lavagens com EtOH



**FIG. I.**