

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12N 1/20 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02807697.4

[45] 授权公告日 2010 年 1 月 6 日

[11] 授权公告号 CN 100577790C

[22] 申请日 2002.3.28 [21] 申请号 02807697.4
[30] 优先权

[32] 2001.3.30 [33] US [31] 60/280,089

[86] 国际申请 PCT/US2002/009731 2002.3.28

[87] 国际公布 WO2002/078637 英 2002.10.10

[85] 进入国家阶段日期 2003.9.29

[73] 专利权人 科里克萨有限公司

地址 美国华盛顿州

[72] 发明人 K·R·米尔斯 D·S·斯尼德

[56] 参考文献

US4912094 1990.3.27

WO9843670 1998.10.18

US5057598 1991.10.15

WO9956776 1999.11.11

Chemical Structure and Biological Activity of Bacterial and Synthetic Lipid A. RIETSCHEL 等. Reviews of Infectious Diseases September, October, Vol. 9 No. supplement 5. 1987

Complete Structural Determination of Lipopolysaccharide obtained from Deep Rough Mutant of E. Coli. QURESHI 等. Journal of Biological Chemistry, Vol. 263 No. 24. 1988

审查员 王翔宇

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 程泳

权利要求书 1 页 说明书 18 页 附图 1 页

[54] 发明名称

生产 3-O-钝化-4'-单磷酸基脂 A(3D-MLA)的方法

[57] 摘要

此处公开了生产脂多糖(LPS)的方法,其包括:(a)在培养基中培育深度粗糙突变体细菌菌株的培养物;(b)将该培养物在稳定期保持至少大约5小时;(c)从培养物中收获细胞;和(d)从细胞中提取LPS。该方法允许LPS的生产,其中该LPS可用于生产具有至少大约20mol%己酰基同系物基团的3-O-脱酰基化单磷酸基脂A(3D-MLA)。此处还公开了从深度粗糙突变体细菌菌株细胞的培养物中提取脂多糖(LPS)的方法,其包括:(a)用基本上由至少大约75wt%的具有1-4个碳原子的脂族醇和平衡水所组成的溶液提取细胞,从而产生出具有减少的磷脂含量的细胞;和(b)用含有氯仿和甲醇的溶液提取具有减少的磷脂含量的细胞,从而获得LPS的氯仿和甲醇溶液(CM)。该方法提供了LPS的

CM溶液,其具有减少的磷脂含量,并通过相对简单和不贵的加工步骤来生产。

1. 生产脂多糖组合物的方法，其包括：

- (a) 在培养基中培育深度粗糙突变体细菌菌株的培养物；
- (b) 将该培养物在稳定期保持至少 5 小时；
- (c) 从培养物中收获细胞；和
- (d) 从细胞中提取脂多糖组合物。

2. 权利要求 1 的方法，其中深度粗糙突变体细菌菌株属于沙门氏菌属。

3. 权利要求 2 的方法，其中沙门氏菌属的深度粗糙突变体细菌菌株属于明尼苏达沙门氏菌种。

4. 权利要求 3 的方法，其中明尼苏达沙门氏菌种的深度粗糙突变体细菌菌株为明尼苏达沙门氏菌 R595 菌株。

5. 权利要求 1 的方法，其中培养基为 M9。

6. 权利要求 1 的方法，其中保持进行 5 至 6 小时。

7. 权利要求 1 的方法，进一步包括从 LPS 生产 3D-MLA 的步骤，其中至少 20 mol% 的 3D-MLA 含有 6 个脂肪酸。

8. 权利要求 1 的方法，其进一步包含将 LPS 经过顺次的酸水解和碱水解从而形成 3D-MLA。

9. 由权利要求 8 的方法生产出的 3D-MLA，所述 3D-MLA 具有至少 20mol% 的含有 6 个脂肪酸部分的同系物，其中所述同系物是指具有相同脂肪酸数量的脂 A 种类的群体。

生产 3-O-脱乙酰基-4'-单磷酸基 脂 A (3D-MLA) 的方法

相关申请的引用

本申请是 2001 年 3 月 30 日申请的 U.S. 临时申请 No. 60/280,089 的非临时申请, 其要求 U.S. 临时申请 No. 60/280,089 的利益。

关于在联邦政府资助的研究和开发下所取得的发明之权利的声明是不适用的

发明背景

1. 发明领域

本发明主要涉及 3-O-脱乙酰基单磷酸基脂 A (3D-MLA) 的生物合成生产领域。更特别地, 其涉及改善所期望的 3D-MLA 同系物的收率或者将纯化 3D-MLA 的脂多糖 (LPS) 前体的成本减到最少的方法。

2. 相关领域描述

很久以前就已经认识到肠细菌脂多糖 (LPS) 是免疫系统的有效刺激物。亚微克数量的 LPS 能够引起多种反应, 包括有益的和有害的。这些反应中的一些是有害的, 其中一些可以是致命的, 这一事实阻碍了 LPS 本身的临床应用。已经观察到负责内毒素活性的最主要原因的 LPS 成分是脂 A。

因此, 已经作了许多努力来减弱 LPS 或脂 A 的毒性而不减少这些化合物的免疫刺激益处。这些成果中著名的为 Edgar Ribi 和其同事的成果, 该成果导致生产出脂 A 衍生物 3-O-脱乙酰基-4'-单磷酸基脂 A (3D-MLA; 含有 3D-MLA 的组合物以商品名 MPL[®]从 Corixa 公司 (Seattle, WA) 商购可得)。3D-MLA 显示出具有与脂 A 基本上同样的免疫刺激特性, 但是具有较低的内毒性 (Myers 等人, U.S. Pat.

No. 4, 912, 094)。Myers 等人还报道了生产 3D-MLA 的方法，该方法如下。首先，将从革兰氏阴性细菌（例如明尼苏达沙门氏菌（*Salmonella minnesota*）R595）深度粗糙突变体菌株获得的 LPS 或脂 A 在中等强度的无机酸溶液（例如 0.1N HCl）中回流大约 30 分钟。这导致在脂 A 还原性末端葡糖胺的 1 位上的去磷酸化和在脂 A 非还原性葡糖胺的 6' 位上的去糖基化（decarbohydrate）。其次，将去磷酸化并去糖基化的脂 A（亦称为单磷酰基脂 A 或 MLA）进行碱水解，例如通过将其溶解在有机溶剂如氯仿：甲醇（CM）2:1（v/v）中，并用 pH 10.5 的 0.5M Na₂CO₃ 水溶液使该溶液饱和，然后快速蒸发溶剂。这导致选择性地去除在脂 A 的 3 位上的 β -羟基肉豆蔻酸部分，从而获得 3-O-脱酰基化-4'-单磷酰基脂 A（3D-MLA）。

通过上述方法生产所得的 3D-MLA 的质量高度依赖于从革兰氏阴性细菌获得的 LPS 的纯度和组成。例如，LPS 的脂 A 成分为含有大约 5-7 个脂肪酸部分的紧密相关种类的混和物。从上面的讨论中清楚的看出，在 3D-MLA 的形成中除去了 1 个脂肪酸部分，从而得到具有大约 4-6 个脂肪酸部分的 3D-MLA。一般认为，根据保留的或增强的免疫刺激益处、减低的毒性和其他所期望的特性（Qureshi 和 Takayama, "The Bacteria", Vol. XI (Iglewski 和 Clark 编), Academic Press, 1990, pp. 319-338) 的组合，具有至少 6 个脂肪酸部分的 3D-MLA 是优选的。

又例如，从革兰氏阴性细菌中 LPS 进行商业规模的提取一般包括 Chen 方法（Chen 等人, *J. Infect. Dis.* 128:543 (1973)）；即用 CM 提取，这导致形成富含 LPS 和磷脂的 CM 相，从中随后能够纯化出 LPS。可是，从富含 LPS 和磷脂的 CM 相中纯化 LPS 一般需要多重沉淀步骤来获得对于在免疫刺激应用中的使用（例如用作疫苗佐剂）足够纯的 LPS。

因此，期望获得方便地制备高纯度 LPS 组合物的方法。此外，期望获得产生 LPS 组合物的方法，该组合物含有具有增加的己酰基同系物水平的 3D-MLA。

已知的发酵技术已用于制备含有能够容易纯化的 LPS 的革兰氏阴性细菌培养物。这些已知的技术一般包括在稳定期的早期收获细菌培养物，这与标准细菌学准则一致。可是发现根据已知条件所产生的 LPS 的酰基化程度是可变的。例如，明尼苏达沙门氏菌 R595 的脂 A 中庚酰基种类的含量依赖于批次而可以在 20%-80% 之间变化 (Rietschel 等人, *Rev. Infect. Dis.* 9:S527 (1987))。这种庚酰基同系物含量的可变性将导致从这些 LPS 批次中制备的 3D-MLA 中己酰基同系物含量的显著差异。

发明概述

在一个实施方案中，本发明涉及生产脂多糖 (LPS) 的方法，其包括：

- (a) 在培养基中培育深度粗糙突变体细菌菌株的培养物；
- (b) 将该培养物在稳定期保持至少大约 2 小时；
- (c) 从培养物中收获细胞；和
- (d) 从细胞中提取 LPS。

该方法允许 LPS 的生产，其中该 LPS 可生产出具有相对高比例的 (即至少大约 20 mol%) 含有 6 个脂肪酸部分的同系物的 3D-MLA。

在另一个实施方案中，本发明涉及从深度粗糙突变体细菌菌株细胞的培养物中提取脂多糖 (LPS) 的方法，其包括：

- (a) 用基本上由至少大约 75 wt% 的具有 1-4 个碳原子的脂族醇和平衡水所组成的溶液提取细胞，从而产生出具有减少的磷脂含量的细胞；
- (b) 用含有氯仿和甲醇的溶液 (CM) 提取具有减少的磷脂含量的细胞，从而获得 LPS 的 CM 溶液。

该方法提供了 LPS 的 CM 溶液，其具有减少的磷脂含量，并因此适合于进行进一步的修饰和纯化而得到 3D-MLA。该方法包括相对简单和不贵的步骤。

附图简述

下面的附图形成本说明的一部分，并被包括在本发明之中来进一步证明本发明的某些方面。通过参考一个或多个这些附图并结合此处给出的特定实施方案的详细描述可以更好地理解本发明。

图 1 显示了在乙醇提取期间用不同温度获得的乙醇提取物和 LPS 样品的 TLC 板。左边的平板从左至右显示了于 22℃、37℃ 和 50℃ 的温度时的乙醇提取物。该平板最右边的样品为真正的 LPS 样品。右边的平板显示了从各个制备物中获得的 LPS。道 3、4 和 5 中的样品分别相应于从经过在 22℃、37℃ 和 50℃ 用乙醇预提取的细胞中获得的 LPS。在 $R_f \sim 0.6$ 的浓重的带相应于磷脂和脂肪酸杂质。这些杂质的水平通过增加乙醇提取的温度而减少，其在于 50℃ 预提取的样品中是非常低的。

说明性实施方案的描述

在一个实施方案中，本发明涉及生产脂多糖（LPS）的方法，其包括：

- (a) 在培养基中培育深度粗糙突变体细菌菌株的培养物；
- (b) 将该培养物在稳定期保持至少大约 2 小时；
- (c) 从培养物中收获细胞；和
- (d) 从细胞中提取 LPS。

脂多糖是革兰氏阴性细菌外膜的外小叶中主要的脂类组分。除了其他成分之外，革兰氏阴性细菌的脂多糖部分还含有脂 A。正如已经描述的，脂 A 能够进行去糖基化和部分去磷酸化从而生产单磷酸基脂 A（MLA），MLA 能够在 3 位选择性地脱酰基化从而产生 3-O-脱酰基化-4'-单磷酸基脂 A（3D-MLA）。

可是，通过革兰氏阴性细菌产生的脂 A 一般含有许多具有相同的总的脂 A 结构但在它们含有的脂肪酸部分的数量上不同的种类。具有相同脂肪酸数量的脂 A 种类的群体此处被称为“同系物”。通过革兰氏阴性细菌如明尼苏达沙门氏菌 R595 的标准商业规模培养可生产出具有 4-7 个脂肪酸部分的脂 A 同系物。因此，从例如明尼苏达沙门氏

菌 R595 脂 A 中生产出的 3D-MLA 具有一般为 3-6 个脂肪酸部分的同系物组成（因为 3D-MLA 经历了 1 个脂肪酸部分的损失）。

3D-MLA（通过脂 A 和 MLA）同系物组成中的异质性可归因于两个原因：(1)在脂 A 装配中生物合成的可变性和(2)在加工成 3D-MLA 期间从脂 A 主链上脂肪酸部分的损失。虽然不想受制于理论，但是除了其他解释之外相信是由于参与脂 A 生物合成最终步骤的酰基转移酶的非完全底物特异性，所以生物合成的可变性才会发生。在一般于 3D-MLA 产生中使用的酸和碱水解期间也可能发生从脂 A 主链上脂肪酸部分的损失。

令人惊讶地发现通过改变培养产生脂 A 的深度粗糙突变体细菌菌株的过程的参数能够改变 3D-MLA 同系物组成。特别是发现在收获之前将深度粗糙突变体细菌菌株的培养物在稳定期保持至少大约 5 小时可导致如此生产的脂 A 同系物比例的改变，以致一般地至少大约 20 mol%的随后从脂 A 生产出的 3D-MLA 含有 6 个脂肪酸。优选地，至少大约 50 mol%的 3D-MLA 含有 6 个脂肪酸。已经发现在稳定期大约 5.5 小时的保持时间是特别有效的。这有别于本领域中已知的一般的培养程序，在一般的培养程序中收获几乎在培养进入稳定期之后立即进行；在已知的程序中，LPS 的同系物含量是高度可变的，并导致具有可变己酰基同系物含量的 3D-MLA。

“深度粗糙突变体细菌菌株”表示具有深度粗糙表型的革兰氏阴性细菌。“深度粗糙”表型表示连接到脂 A 上的多糖部分只由大约 2-3 个 2-酮-3-脱氧-D-甘露辛酮糖酸（mannooctulonic acid）（KDO）残基组成。优选地，深度粗糙突变体细菌菌株选自沙门氏菌（*Salmonella*）属。如果深度粗糙突变体细菌菌株属于沙门氏菌属，则更优选地其属于明尼苏达沙门氏菌种，更加优选地其为明尼苏达沙门氏菌 R595 菌株。可以使用其他深度粗糙突变体细菌菌株，除了别的以外例如奇异变形菌（*Proteus mirabilis*）菌株。

可以使用任何适合于培养深度粗糙突变体细菌菌株的技术。一般地，这将包括至少一种商业规模生物反应器的使用。在一个实施方案

中，技术包括将深度粗糙突变体细菌菌株的细胞接种入相对小的（例如 15L）生物反应器中，培养深度粗糙突变体细菌菌株直至稳定期，随后将 15L 细胞培养液无菌转移到大（例如 750L）生物反应器中。

该培养可以在任何已知或发现能够让深度粗糙突变体细菌菌株生长的培养基上进行。在一个优选的实施方案中，培养基为 M9，其为补充了葡萄糖和酪蛋白氨基酸的无机盐混和物。M9 的组成对于本领域的普通技术人员是熟知的。

将深度粗糙突变体细菌菌株在稳定期保持至少大约 5 小时之后，可以从培养物中收获细胞并从细胞中提取 LPS。虽然下面描述了用于从细胞中提取 LPS 的优选的技术，但是可以使用已知的技术来从培养物中收获细胞和从细胞中提取 LPS。

收获可以通过任何已知的技术来进行。在一个优选的实施方案中，将细胞培养物在稳定期保持至少大约 5 小时之后，将生物反应器的内含物抽至切向过滤装置以分离开用过的培养基和细胞。

然后通过任何适当的技术从细胞中提取 LPS。已知的技术包括 Galanos 方法，其包括用苯酚、氯仿和石油醚的混和物（PCP）提取 LPS，随后蒸发掉氯仿和石油醚，添加丙酮和水以沉淀 LPS，和通过离心或过滤回收 LPS（Galanos 等人，*Eur. J. Biochem.* 9:245 (1969)）；和上面引用的 Chen 方法，其包括用氯仿和甲醇（CM）的混和物提取 LPS，随后进行一系列的甲醇沉淀步骤。

Chen 方法的改进描述于下，其对于用于商业应用的 LPS 及其衍生物的生产是优选的。

不管提取技术，结果是基本上纯的干燥 LPS，其可以通过顺次的酸水解和碱水解进一步进行加工从而形成 3D-MLA，Ribi（U.S. Pat. No. 4,436,727）和 Myers 等人（U.S. Pat. No. 4,912,094）教导了这一点，因此于此处引用这些文献作为参考。概括这些参考文献的技术为用于形成 3D-MLA 的优选实施方案，将 LPS 与有机或无机酸反应，然后经过冻干而生产出 MLA。无机酸优选地为盐酸、硫酸或磷

酸。有机酸优选地为甲苯磺酸或三氯乙酸。反应可以在大约 90℃ 至大约 130℃ 的温度进行足够的时间以完全水解，通常进行大约 15 分钟至大约 60 分钟。MLA 可以用溶剂（优选的为丙酮）处理以溶解脂肪酸和其他杂质，然后除去富含杂质的脂肪酸溶剂。

此后将 MLA 经历温和的碱处理以选择性地从 MLA 的 3 位上去除 β -羟基肉豆蔻酸（在温和的碱性条件下，只有在 3 位上的 β -羟基肉豆蔻酸是不稳定的）。温和的碱处理可以在含水的或有机的介质中进行。除了别的以外，合适的有机溶剂还包括甲醇或其他醇、二甲亚砜（DMSO）、二甲基甲酰胺（DMF）、氯仿、二氯甲烷或者其混和物。也可以使用水和与水易混和的有机溶剂的联合物。

用于进行水解的碱优选地选自氢氧化物、碳酸盐、磷酸盐或胺。除了别的以外，举例说明的无机碱还包括氢氧化钠、氢氧化钾、碳酸钠、碳酸氢钾、碳酸氢钠和碳酸氢钾。除了别的以外，举例说明的有机碱还包括烷基胺（除了别的以外，例如二乙胺和三乙胺）。

在含水的介质中，pH 一般为大约 10 至大约 14，优选地为大约 10 至大约 12。水解反应一般在大约 20℃ 至大约 80℃ 进行，优选地在大约 50℃ 至大约 60℃ 进行，该反应进行大约 10 分钟至大约 48 小时的时间。

用于碱水解的一个优选技术包括将 MLA 溶解在 CM 2:1 (v/v) 中，用 pH 10.5 的 0.5M Na_2CO_3 缓冲水溶液使该溶液饱和，然后在真空抽吸装置（大约 100 mmHg）下于 45-50℃ 快速蒸发溶剂。

在另一个实施方案中，本发明涉及从深度粗糙突变体细菌菌株细胞的培养物中提取脂多糖（LPS）的方法，其包括：

- (a) 用基本上由至少大约 75 wt% 的具有 1-4 个碳原子的脂族醇和平衡水所组成的溶液提取细胞，从而产生出具有减少的磷脂含量的细胞；
- (b) 用含有氯仿和甲醇的溶液提取具有减少的磷脂含量的细胞，从而获得 LPS 的氯仿和甲醇溶液。

深度粗糙突变体细菌菌株细胞、其培养物和制备培养物的方法如上所述。优选地，深度粗糙突变体细菌菌株选自沙门氏菌属或埃希氏

菌 (*Escherichia*) 属。如果深度粗糙突变体细菌菌株属于沙门氏菌属, 则更优选地其属于明尼苏达沙门氏菌种, 更加优选地其为明尼苏达沙门氏菌 R595 菌株。如果深度粗糙突变体细菌菌株属于埃希氏菌属, 则更优选地其属于大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 种, 更加优选地其为大肠杆菌 D31m4 菌株。

第一个提取步骤可以用任何短链脂族醇来进行。脂族醇可以是线性的、分枝的或环状的。优选地, 脂族醇具有 2-4 个碳原子并易于和水混和。更优选地, 脂族醇为乙醇。

含有脂族醇的溶液可以含有任何比例的 75 wt% 或更高的脂族醇。优选地, 溶液含有大约 85 wt% 至大约 95 wt% 的脂族醇。溶液的平衡基本上是水。作为脂族醇和溶液的水成分的不完全纯或其他污染的结果, 可以存在微量的其他化合物。

进行第一个提取步骤的温度可以是任何对于从培养细胞中充分提取磷脂有效的温度。优选地, 温度为大约 35℃ 至大约 65℃。更优选地, 温度为大约 45℃ 至大约 55℃。

第一个提取步骤的其他参数 (除了别的以外) 为例如脂族醇溶液的添加速率、溶液和细胞的接触持续时间以及搅拌或不搅拌, 这些参数可由本领域的一般技术人员按常规进行改变。

第一个提取步骤导致形成 (i) 富含磷脂的脂族醇溶液相和 (ii) 具有减少的磷脂含量的细胞。细胞膜的 LPS 成分基本上完全和具有减少的磷脂含量的细胞分离开。

第二个提取步骤包括用氯仿: 甲醇 (CM) 的溶液提取具有减少的磷脂含量的细胞。

在第二个提取步骤中可以使用已知适合用于从细胞膜提取 LPS (例如在 Chen 方法中) 的任何比例的氯仿和甲醇。一般地, 氯仿和甲醇的比例为大约 2:1 至大约 9:1。具有和 CM 相等特性的溶剂混和物也可以用于从具有减少的磷脂含量的细胞中获得 LPS。

本方法超过 Chen 方法的优点为在第一个提取步骤中除去了磷脂。本发明的第二个提取步骤对于具有减少的磷脂含量的细胞来进

行,从而导致形成基本上无磷脂的富含 LPS 的溶液,然而 Chen 方法的 CM 提取导致形成含有相当高水平的磷脂的 LPS 溶液。产生相对无磷脂的 LPS 制备物的其他可选择的方法如 Galanos 的方法(见上)就不那么令人期望,因为它们不适宜于大规模产生,它们使用引起健康和担忧的溶剂混和物(例如苯酚:氯仿:石油醚),或者两者都有。

由于 LPS 溶液中磷脂的明显缺乏,根据本方法的 LPS 的进一步纯化一般比 Chen 方法更简单和更便宜。已经发现通过将氯仿和甲醇从 LPS 溶液中蒸发能够形成足够纯度的干燥 LPS 剩余物。

可选择地,可以例如通过上述的酸水解和碱水解来进一步加工 LPS,从而产生 MLA 或 3D-MLA。

按照上述方法所生产出的 3D-MLA 可用于多种用途。一个优选的用途为作为用于药物组合物的免疫刺激剂或佐剂,该药物组合物含有免疫原性的多核苷酸、多肽、抗体、T-细胞或抗原呈递细胞(APC)。免疫刺激剂或佐剂本质上是指任何能够提高或增强对于外源抗原的免疫反应(抗体和/或细胞介导的)的物质。

根据本发明生产出的 MLA 或 3D-MLA 可以刺激的一种免疫反应是 Th1 类型的。

已经观察到单磷酰基脂 A (MLA) (优选的为 3-O-脱酰基化单磷酰基脂 A (3D-MLA)) 与铝盐的联合剂作为用于引起主要 Th1 型反应的佐剂是有效的。高水平的 Th1 型细胞因子(例如 IFN- γ 、TNF α 、IL-2 和 IL-12)倾向于促进诱导针对所施用抗原的细胞介导的免疫反应。相反地,高水平的 Th2 型细胞因子(例如 IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-10)倾向于促进诱导体液的免疫反应。在应用含有 MLA 或 3D-MLA 的药物组合物之后,患者将支持包括 Th1 和 Th2 型反应的免疫反应。当反应主要为 Th1 型时, Th1 型细胞因子的水平将增长至比 Th2 型细胞因子的水平更高的程度。这些细胞因子的水平可以容易地用标准的测定法进行评定。为了了解细胞因子的家族,可见 Mosmann 和 Coffman, *Ann. Rev. Immunol.* 7:145-173, 1989。

在一个优选的实施方案中，佐剂系统包括单磷酸基脂 A (MLA) (优选的为 3D-MLA) 和皂苷衍生物 (如 Quil A 或其衍生物，包括 QS21 和 QS7 (Aquila Biopharmaceuticals 公司, Framingham, MA); 七叶皂苷; 毛地黄皂苷; 或者石头花 (*Gypsophila*) 或昆诺藜 (*Chenopodium quinoa*) 皂苷) 的联合物，例如 WO 94/00153 中所描述的 QS21 和 3D-MLA 佐剂的联合物，或者 WO 96/33739 中所描述的其中 QS21 用胆固醇淬灭的具有较少反应原性的组合物。其他优选的配剂含有水包油的乳状液和生育酚。WO 95/17210 中描述了另一个特别优选的佐剂配剂，其使用水包油乳状液中的 QS21、3D-MLA 和生育酚。

将下面的实施例包括在内以说明本发明的优选实施方案。本领域的技术人员应当意识到，下面的实施例中所公开的技术代表了由发明者发现能够在本发明的实施中很好地起作用的技术，因此可以认为这些技术构成了用于其实施的优选模式。可是，根据本公开内容，本领域的技术人员应当意识到在公开的特定实施方案中可以作出许多改变，并且仍获得同样或相似的结果，但并不离开本发明的精神和范围。

实施例 1 - 一般方法

A. 培养基的制备

细胞生长在 M9 培养基上进行，M9 培养基可通过将无机盐的无菌溶液、酪蛋白氨基酸和葡萄糖组合在一起制备。M9 盐溶液一般在发酵罐中制备，其含有下列盐：2.0g/L NaCl、0.2g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、3.0g/L KH_2PO_4 、6.0g/L Na_2HPO_4 和 1.0g/L NH_4Cl 。然后向发酵罐中无菌地加入 20% (w/v) 酪蛋白氨基酸 (20ml/L) 和 50% (w/v) 葡萄糖 (32ml/L) 的无菌溶液，从而获得完全的培养基。

B. 种子生长

一般地，一个无菌的 250ml 锥形瓶中装入 50ml 无菌的 M9 培养基。将一个种子瓶的明尼苏达沙门氏菌 R595 (大约 10^8 cfu) 解冻并加入锥形瓶中，然后用纱布塞子塞住瓶口。将培养物于 37°C 培养 6-8

小时，直至明显出现旺盛的生长。

C. 细胞生长

明尼苏达沙门氏菌 R595 的培养物在装备了 2.5L 玻璃容器的 BioFlo III 发酵罐 (New Brunswick Scientific 公司) 中生长。在一般的运作中，容器装入 2.0L 的 M9 盐溶液并经过高压灭菌，然后无菌地加入酪蛋白氨基酸和葡萄糖的无菌溶液。发酵罐装备有用于防沫剂 (0.1% SAG-471, Witco 公司) 和 NH_4OH (30%) 的给料管以及用于 pH、 dO_2 和泡沫的探针。通过 NH_4OH 给料将培养基调节至 pH 6.9。然后将发酵罐用全部的种子培养物进行接种，并在空气喷射 (一般为 2.0 Lpm) 和搅拌 (一般为 50 rpm) 的同时于 37℃ 进行培养。通过于 590nm 测量光密度监测培养的生长期。通过离心或切向流过滤 (tangential flow filtration) 收获细胞，并用水洗涤，然后冻干。

D. 脂多糖 (LPS) 的提取

根据经过较小修改的 Qureshi 等人 (1986) 的程序分离出 LPS。在一般的运作中，首先将干燥的细胞在 90% 乙醇 (v/v) 中以 20mg/ml 的浓度于室温搅拌 1 小时，然后通过真空过滤进行回收。将细胞经过第二次乙醇提取，随后顺次用丙酮和乙醚 (每次 15 分钟，都为 40mg/ml，基于起始重量) 进行提取，然后让结果所得的醚粉末空气干燥过夜。其间，制备苯酚 (89%) : 氯仿 : 石油醚 19:45:72 (v/v/v，缩写为 PCP) 的溶液并让其静置过夜。将醚粉末以 70mg/ml 的浓度悬浮在 PCP (倾去过量的水) 中。将溶液搅拌 30 分钟，然后离心 (3000g, 15 分钟, 0-5℃)。将上清液部分倒入圆底烧瓶中，然后用 PCP 再次提取细胞沉淀。合并上清液部分，然后在 40℃ 旋转蒸发直至所有的挥发性溶剂大部分被除去。然后测量剩下的体积。逐滴加入水直至明显出现持续的混浊，然后在迅速搅拌的同时向苯酚溶液中加入 5 体积的丙酮并随后加入 1 体积的乙醚 (都在冰浴中冷冻)。将溶液置于冰浴中 30 分钟，然后通过离心 (5000g, 15 分钟, 0-5℃) 回收沉淀出的 LPS。重力过滤上清液部分以回收任何没

有剩余在沉淀中的 LPS 一般来说是必需的。用最小体积的冷丙酮洗涤一次 LPS，并通过离心/过滤进行回收，然后在真空中干燥。基于初始的细胞干重，一般的收率为 4-5%。

E. 4'-单磷酰基脂 A (MLA) 的制备

将 LPS 以 10mg/ml 的浓度悬浮在水中，并于 45-55℃ 用水浴超声处理 (bath-sonication) 以帮助分散固体物质。结果所得的溶液应当是轻微混浊的，但无肉眼可见的固体。向该溶液中加入 1 体积的 0.2N HCl，然后将其置于沸水浴中 15 分钟。在冰浴中淬灭反应，然后用 5 体积 (相对于起始的 LPS 溶液) 的氯仿:甲醇 2:1 (v/v) 提取。将二相溶液涡旋振荡，并通过低速离心 (500-1000g) 分离两相。回收较低的相并在氮气中蒸发，从而收获粗制的 MLA。

F. 3-O-脱酰基化-4'-单磷酰基脂 A (3D-MLA) 的制备

将粗制的 MLA 以大约 1-5mg/ml 的浓度溶解在氯仿:甲醇 2:1 (v/v) 中，并将 3.0ml 的该溶液转移至 16×100 mm 的试管中。将附加的 0.4ml 甲醇加入试管中，然后将其置于 50℃ 的水浴中 10 分钟。通过加入 40μl 的 0.5M KHCO₃ (pH 10.5) 来起始反应，并将溶液于 50℃ 温育 20 分钟。在这段时间的最后，将试管从水浴中取出，并通过在添加 2.0ml 0.1N HCl (冷冻的) 之后进行涡旋振荡来淬灭反应。通过下列步骤来回收 3D-MLA: 加入 1.0ml 甲醇，涡旋振荡，离心 (500-1000g)，和在氮气中将较低 (有机) 相蒸发至干。

实施例 2 - 分析方法

A. MLA 和相关样品的薄层层析法 (TLC)

所有的 TLC 分析用覆盖有 Silica Gel 60 (E Merck) 的 5×10 cm 平板来进行。样品一般以 10mg/ml 的氯仿:甲醇 4:1 (v/v) 溶液应用于 TLC 平板，在操作时通过用毛细吸管将 3μl 溶液 (30μg 样品) 以小点的方式列成 5mm 的线来进行应用。用含有氯仿/甲醇/水/氢氧化铵 50:31:6:2 (v/v) 的溶剂系统来展开平板。展开的平板上的条带通过下列步骤来显现: 喷洒 10% (w/v) 磷钼酸的乙醇溶液，随后

于 150-160℃ 进行焦化。在一些情况下, 点的相对强度可通过于 520nm 的扫描波长用 Shimadzu CS9000U Dual Wavelength Flying Spot Scanner (Shimadzu 公司) 进行扫描光密度分析法来定量。

B. MLA/3D-MLA 的高效液相色谱法 (HPLC) 分析

首先将需要分析的样品转变成游离酸形式, 这是通过用 2ml 的 0.1N HCl 洗涤 3-5mg 样品于 5ml 氯仿: 甲醇 (2:1 v/v) 中所形成的溶液来实现的。将二相系统涡旋振荡, 离心, 然后将较低 (有机) 相转移至试管中并在氮气流中蒸发。然后将剩余物通过用重氮甲烷处理进行甲基化。简要地说, 重氮甲烷的醚溶液通过下列步骤来制备: 将 60-100mg 1-甲基-3-硝基-1-亚硝基胍 (MNNG, Aldrich) 置于 2 英钱的小瓶中, 每毫克 MNNG 加入 60 μ l 乙醚, 然后每毫克 MNNG 加入 9 μ l 的 5N NaOH, 同时于 <-10℃ 搅拌溶液。在反应完全之后, 通过下列步骤将柠檬黄色的醚相干燥: 将其转移到含有几颗 NaOH 的第二个小瓶中, 然后将其涡旋振荡, 这都在 <-10℃ 进行。将经酸洗涤的样品溶解在 1ml 氯仿: 甲醇 4:1 (v/v) 中, 并置于 <-10℃ 的浴中, 然后在搅拌的同时逐滴加入重氮甲烷溶液直至暗黄色的色调持续出现。然后将溶剂在氮气流中于环境温度蒸发, 并进一步在真空中干燥至少 30 分钟。

色谱分析在 C_{18} 反相柱 (Nova-Pak, 4 μ m 的颗粒直径, 8mm $\times$ 10cm [Waters]) 上进行。将甲基化的样品以 100 μ g/ml 的浓度溶解在氯仿: 甲醇 4:1 (v/v) 中, 并通过 0.45 μ m 的 PTFE 注射器过滤器。一般使用 20-25 μ l 的注射体积, 随后以 2ml/分钟的流速用 20-80% 异丙醇的乙腈溶液的线性梯度洗脱 60 分钟, 同时在 210nm 进行监测。

C. LPS 同系物含量的 HPLC 分析

LPS 倾向于为高度异质的物质, 这是由于下列部分中的可变性:

1) O-抗原和核心区域中糖残基的数量; 2) 在核心区域中和在脂 A 中的磷酸酯上的极性取代; 和 3) 连接到脂 A 主链上的脂肪酸的数量和位置。正是该后面的可变性来源对于 3D-MLA (MPL[®]) 的同系物含量具有影响。LPS 水解成 MLA 和 3D-MLA 消除了 O-抗原和核心区域中的

可变性，可是由于 O- 联接的脂肪酸不可控的损失其也引入了附加的异质性。这妨碍了准确获知完整的 LPS 中的酰基化模式。作为避开这一点的办法，开发出了一种方法，即在不会导致 O- 联接的脂肪酸损失的温和条件下去除磷酸酯和核心区域。然后可以用 HPLC 分析结果所得的去磷酸化脂 A（零磷酰基脂 A，或 ZPL），从而获得亲本 LPS 中酰基化模式的准确反映。

该方法一般按照下述进行。将 0.5-5.0mg 的 LPS 样品于 27℃ 在 200μl 浓缩的氢氟酸中水解 3-4 小时。该反应必须在紧紧盖住的特氟隆管中并在有良好通风的通风橱内进行。通过在氮气流中于环境温度蒸发来除去 HF，然后将水解产物溶解在氯仿:甲醇 4:1 (v/v) 中并转移到 16×100 mm 的玻璃试管中，随后在氮气流中蒸发溶剂。使用水浴超声处理将剩余物悬浮在 1.0ml 0.1% 三乙胺中，加入 1.0ml 40mM NaOAc，然后将试管悬浮在沸水浴中 30-45 分钟。通过在冰浴中冷却来淬灭反应，并通过用 5ml 氯仿:甲醇 2:1 (v/v) 提取来回收 ZPL。将有机相转移至小的螺口瓶中，然后在氮气中蒸发溶剂。ZPL 通过加入 200μl 的 10mg/ml 盐酸 O-(3,5-二硝基苄基)羟胺（Regis Technologies 公司）的吡啶溶液进行衍生化，紧紧盖住小瓶，然后于 60℃ 温育 3 小时。在氮气中蒸发除去吡啶，剩余物进一步在真空中干燥 >30 分钟。然后将剩余物悬浮在 500μl 氯仿:甲醇 2:1 (v/v) 中，并上载至 0.5-1.0ml 已经在同样的溶剂中预平衡的 Accell-QMA（乙酸盐形式；Waters）床上。用总共 5.0ml 的氯仿:甲醇 2:1 (v/v) 以分成几个小部分的方式漂洗柱，并收集洗脱液至 16×100 mm 的试管中。向洗脱液中加入 2.0ml 的 0.1N HCl，将二相系统涡旋振荡，于 500-1000g 简短离心，然后将较低（有机）相转移至另一个试管中并在氮气中蒸发。将剩余物溶解在 100-300μl 氯仿:甲醇 4:1 (v/v) 中，然后通过 0.45μm 的 PTFE 注射器过滤器进行过滤。用氯仿:甲醇 4:1 (v/v) 漂洗过滤器两次，并将滤液在氮气中蒸发。滤液最后溶解在 50-150μl 氯仿:甲醇 4:1 (v/v) 中，并转移至自动注射器小瓶中以用于 HPLC 分析。HPLC 条件如下：C₁₈ 反相柱（例如

Waters)；10 μ l 注射体积；20-80%异丙醇的乙腈溶液的线性梯度，经过 60 分钟，流速为 2ml/分钟；于 254nm 进行监测。

实施例 3 - 来自不同时间收获的培养物中的 MLA/3D-MLA 的同系物组成的比较

用下列参数进行一系列发酵罐的运行：2.0L M9 培养基（起始 pH 6.84-6.87），2Lpm 的空气流量，于 50rpm 进行搅拌，37℃，无 pH 控制。通过于 590nm 测量光密度监测培养，并在获得所期望的生长阶段时终止培养。按照上述方法处理和提取细胞以获得 LPS 样品，然后将该样品水解成 MLA 和 3D-MLA，并用 HPLC 进行分析（见实施例 1 和 2）。结果概括在表 1 中。

表 1. 来自不同年龄收获的细胞中的 MLA 和 3D-MLA 的同系物组成

运行	描述	收获时的 培养年龄	稳定期中的 时间	MLA		3D-MLA
				3-O-脱酰基 化己酰基	庚酰基	3-O-脱酰基化 己酰基
A	指数期晚期	6.75 小时	N/A	12.4%	12.2%	9.9%
B	稳定期早期	9.5 小时	~ 0.5 小时	9.2%	6.8%	9.2%
C	稳定期晚期	15 小时	~ 6 小时	19.5%	13.2%	21.5%

这些数据表明明尼苏达沙门氏菌 R595 的培养物在稳定期期间改变了它们的 LPS 的酰基化模式，结果导致源自该 LPS 的 MLA 中 3-O-脱酰基化己酰基加上庚酰基种类的全部含量的增加，并顺次引起从该 MLA 制备的 3D-MLA 中 3-O-脱酰基化己酰基种类的含量增加。

实施例 4 - 来自不同时间收获的培养物中的 LPS 的同系物组成的比较

用下列参数进行一系列发酵罐的运行：2.0L M9 培养基（起始 pH 6.84-6.87），2Lpm 的空气流量，于 225rpm 进行搅拌，37℃，无 pH

控制。通过于 590nm 测量光密度监测培养物的生长阶段。按照实施例 1 中描述的方法处理和提取细胞以获得 LPS 样品。按照实施例 2 中描述的方法将 LPS 样品水解成 ZPL 并用 HPLC 进行分析。结果概括在表 2 中。

表 2. 来自不同年龄收获的细胞中的 LPS 的同系物组成

运行	描述	收获时的培养 年龄	稳定期中的 时间	同系物含量		
				3-O-酰基 己酰基	3-O-脱酰基 化己酰基	庚酰基
A	稳定期早期	9 小时	~ 0.5 小时	76%	0%	24%
B	稳定期晚期	15 小时	~ 6 小时	48%	17%	19%

在来自稳定期早期细胞的 LPS 中没有检测到 3-O-脱酰基化己酰基成分（运行 A）。因此，从该 LPS 制备的 3D-MLA 中己酰基化同系物的唯一来源为庚酰基化的物质（24%）。相反地，来自在稳定期晚期收获的细胞的 LPS 含有庚酰基和 3-O-脱酰基化己酰基种类（分别为 19%和 17%）。这些种类都对于从该 LPS 制备的 3D-MLA（MPL®）中的己酰基含量有所贡献。想不到的是发现细胞在某些条件下产生 3-O-脱酰基化己酰基 LPS 种类。

实施例 5 - 预提取温度对于明尼苏达沙门氏菌 R595 LPS 的纯度的影响

明尼苏达沙门氏菌 R595 的细胞用与实施例 1 中概述的基本上相同的条件在 80L 发酵罐（New Brunswick Scientific）中生长。细胞通过切向流过滤进行浓缩而不是离心，所得的浆状物含有 51.5mg 干细胞质量/ml。制备三种溶液，在这些溶液中 150ml 细胞悬浮液的等分试样各与 600ml 乙醇混和。将乙醇溶液于 22℃、37℃和 50℃搅拌 1 小时，并过滤。将细胞在相同条件（除了使用 95%乙醇之外）下进行第二次乙醇提取。通过抽吸过滤回收细胞，然后于 50℃在氯仿：

甲醇 4:1 (v/v) 中提取过夜。将溶液过滤, 然后将滤液旋转蒸发至干, 从而得到 LPS 制备物。将于各个温度所获得的第一和第二次乙醇提取滤液的样品以及从预提取的细胞中获得的 LPS 根据实施例 2 中的方法用薄层层析法进行分析。TLC 板的图象显示在图 1 中。

图 1 显示了在乙醇提取期间用不同温度获得的乙醇提取物和 LPS 样品的 TLC 板。左边的平板从左至右显示了于 22°C、37°C 和 50°C 的温度时的乙醇提取物。该平板最右边的样品为真正的 LPS 样品。右边的平板显示了从各个制备物中获得的 LPS。道 3、4 和 5 中的样品分别相应于从经过在 22°C、37°C 和 50°C 用乙醇预提取的细胞中获得的 LPS。在 $R_f \sim 0.6$ 的浓重的带相应于磷脂和脂肪酸杂质。这些杂质的水平通过增加乙醇提取的温度而减少, 其在于 50°C 预提取的样品中是非常低的。

从图 1 的 TLC 板中可以明显地看出在升高的温度下用乙醇进行预提取对于去除杂质是有效的, 否则这些杂质会被氯仿: 甲醇 4:1 (v/v) 共提取。于 50°C 的预提取导致形成基本上无这些杂质的 LPS。

实施例 6 - 有和没有经过乙醇提取而获得的 LPS 的比较

三批明尼苏达沙门氏菌 R595 的细胞用与实施例 1 中概述的基本上相同的条件在 750L 发酵罐 (B. Braun) 中生长。通过切向流过滤收获细胞, 从每批中获得细胞悬浮液的样品并冻干。细胞块经过两次 1 小时的于 50°C 用 90% 乙醇进行的预提取。在两次提取之间用切向流过滤回收细胞。然后细胞在回流的同时用氯仿: 甲醇 4:1 (v/v) 提取过夜。通过切向流过滤回收提取物并蒸发至干。将冻干的细胞样品在回流的氯仿: 甲醇 4:1 (v/v) 中提取过夜, 然后将溶液过滤并将滤液蒸发至干。有和没有经过乙醇预提取而获得的 LPS 样品基本上按照实施例 2 中描述的方法用 TLC 进行分析。于大约 $R_f = 0.01-0.90$ 扫描 TLC 板, 并对于每个样品计算出 LPS 区域 ($R_f = 0.01-0.20$) 中的强度与总强度的比率。结果给出在表 3 中。

表 3. 来自有和没有用乙醇预提取的细胞的 LPS 纯度

运行	批号	LPS 区域中总强度的百分数 ¹	
		没有乙醇预提取	有乙醇预提取
A	48020-B2698C	7	86
B	48020-C0598A	11	83
C	48020- C0598B	14	88

注¹: LPS 区域中总强度的百分数 = $[(R_f = 0.01-0.20 \text{ 中的强度}) / (R_f = 0.01-0.90 \text{ 中的强度})] \times 100$

表 3 中的结果证明, 在于 50℃ 用 90%乙醇预提取明尼苏达沙门氏菌 R595 细胞之后获得的 LPS 显著比从没有预提取的细胞中获得的材料更纯。

此处公开和要求的的所有方法可以根据本公开内容进行和实行, 而不需要不适当的试验。虽然本发明的组合物和方法已经用优选的实施方案进行了描述, 但是对于本领域的技术人员来说显而易见的是可以对此处描述的方法的步骤或步骤顺序施行改变而不会离开本发明的理念、精神和范围。更明确地, 明显的是可以用某些化学和生理学相关的试剂替代此处描述的试剂, 而同时可获得相同或相似的结果。所有这些对于本领域的技术人员来说明显的类似替代和修改可认为处于附加的权利要求所定义的本发明的精神、范围和理念之中。

图1

