

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

|  |   |
|--|---|
| (22) Data de pedido: <b>2002.03.28</b>               | (73) Titular(es):<br><b>CORIXA CORPORATION</b>            |
| (30) Prioridade(s): <b>2001.03.30 US 280089 P</b>    | <b>SUITE 200, 1124 COLUMBIA STREET SEATTLE,</b>           |
| (43) Data de publicação do pedido: <b>2012.06.20</b> | <b>WA 98104</b> <b>US</b>                                 |
| (45) Data e BPI da concessão: <b>2014.08.13</b>      | (72) Inventor(es):  |
| <b>211/2014</b>                                      | <b>KENT R. MYERS</b> <b>US</b>                            |
|  | <b>SNYDER, D. SCOTT</b> <b>US</b>                         |
|  | (74) Mandatário:  |
|  | <b>ANTÓNIO INFANTE DA CÂMARA TRIGUEIROS DE ARAGÃO</b>     |
|  | <b>RUA DO PATROCÍNIO, Nº 94 1399-019 LISBOA</b> <b>PT</b> |

(54) Epígrafe: **MÉTODOS PARA A PRODUÇÃO DE 4'-MONOFOSFORIL LÍPIDO A 3-O-DESACTIVADO (3D-MLA)**

(57) Resumo:

AQUI DIVULGADO UM MÉTODO PARA PRODUZIR LIPOPOLISSACÁRIDO (LPS), COMPREENDENDO: (A) FAZER CRESCER UMA CULTURA DE UMA ESTIRPE BACTERIANA MUTANTE PROFUNDA RUGOSA NUM MEIO; (B) MANTER A CULTURA NA FASE ESTACIONÁRIA DURANTE, PELO MENOS, CERCA DE 5 H; (C) COLHER AS CÉLULAS DA CULTURA; E (D) EXTRAIR O LPS DAS CÉLULAS. O MÉTODO PERMITE A PRODUÇÃO DE UM LPS, O QUAL PODE SER UTILIZADO PARA PRODUZIR UM MONOFOSFORIL LÍPIDO A 3-O-DESACILADO (3D-MLA) POSSUINDO, PELO MENOS, CERCA DE 20% EM MOLES DO GRUPO CONGÉNERE HEXA-ACILO. É TAMBÉM AQUI DIVULGADO UM MÉTODO DE EXTRACÇÃO DE LIPOPOLISSACÁRIDO (LPS) A PARTIR DE UMA CULTURA DE CÉLULAS DE ESTIRPE BACTERIANA MUTANTE PROFUNDA RUGOSA, COMPREENDENDO: (A) EXTRAIR AS CÉLULAS COM UMA SOLUÇÃO CONSISTINDO ESSENCIALMENTE DE, PELO MENOS, CERCA DE 75% EM PESO DE UM ÁLCOOL ALIFÁTICO, POSSUINDO DESDE 1 A 4 ÁTOMOS DE CARBONO E A ÁGUA DE EQUILÍBRIO PRODUZINDO, DESSE MODO, CÉLULAS COM TEOR REDUZIDO EM FOSFOLÍPIDO; E (B) EXTRAIR AS CÉLULAS COM TEOR REDUZIDO EM FOSFOLÍPIDO COM UMA SOLUÇÃO COMPREENDENDO CLOROFÓRMIO E METANOL PRODUZINDO, DESSE MODO, UMA SOLUÇÃO DE LPS EM CLOROFÓRMIO E METANOL (CM). ESTE MÉTODO PROPORCIONA SOLUÇÕES DE LPS EM CM QUE POSSUEM TEOR REDUZIDO EM FOSFOLÍPIDO E SÃO PRODUZIDOS POR PASSOS PROCESSUAIS RELATIVAMENTE SIMPLES E POUCO DISPENDIOSOS.

## RESUMO

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

É aqui divulgado um método para produzir lipopolissacárido (LPS), compreendendo: (a) fazer crescer uma cultura de uma estirpe bacteriana mutante profunda rugosa num meio; (b) manter a cultura na fase estacionária durante, pelo menos, cerca de 5 h; (c) colher as células da cultura; e (d) extrair o LPS das células. O método permite a produção de um LPS, o qual pode ser utilizado para produzir um monofosforil lípido A 3-O-desacilado (3D-MLA) possuindo, pelo menos, cerca de 20% em moles do grupo congénere hexa-acilo. É também aqui divulgado um método de extracção de lipopolissacárido (LPS) a partir de uma cultura de células de estirpe bacteriana mutante profunda rugosa, compreendendo: (a) extrair as células com uma solução consistindo essencialmente de, pelo menos, cerca de 75% em peso de um álcool alifático, possuindo desde 1 a 4 átomos de carbono e a água de equilíbrio produzindo, desse modo, células com teor reduzido em fosfolípido; e (b) extrair as células com teor reduzido em fosfolípido com uma solução compreendendo clorofórmio e metanol produzindo, desse modo, uma solução de LPS em clorofórmio e metanol (CM). Este método proporciona soluções de LPS em CM que possuem teor reduzido em fosfolípido e são produzidos por passos processuais relativamente simples e pouco dispendiosos.

## **DESCRIÇÃO**

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

#### **ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

##### **1. Campo da Invenção**

A presente invenção refere-se, de um modo geral, ao campo da produção biossintética de 4'-monofosforil lípido A 3-O-desacilado (3D-MLA). Mais particularmente, refere-se a métodos para melhorar o rendimento de 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 (LPS) enterobacterianos são estimuladores potentes do sistema imunitário. Pode ser provocada uma variedade de respostas, benéficas e prejudiciais, por quantidades na ordem dos 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*. Foi 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 imunoestimulatórios destes compostos. De entre estes esforços, foram notáveis os de Edgar Ribí e seus associados, os quais resultaram na produção do 4'-monofosforil lípido A 3-O-desacilado derivado do lípido A (3D-MLA; composições compreendendo 3D-MLA são comercializadas sob a marca registada MPL<sup>®</sup> de Corixa Corporation (Seattle, WA)). O 3D-MLA mostrou ter, essencialmente, as mesmas propriedades imunoestimulatórias que o lípido A, mas menor endotoxicidade (Myers et al., U.S. Pat. Nº 4912094). Myers et al., também referiu 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 glucosamina de extremidade redutora e descarbo-hidratação na posição 6' da glucosamina não redutora do lípido A. Em segundo lugar, o lípido A desfosforilado, descarbo-hidratado (também conhecido como monofosforil lípido A ou MLA) é submetido a hidrólise alcalina 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 de ácido β-hidroximirístico na posição 3 do lípido A, resultando em 4'-monofosforil lípido A 3-O-desacilado (3D-MLA).

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

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

Para outro exemplo, a extracção à escala comercial de LPS a partir de bactéria gram-negativas envolve, tipicamente, o método de Chen (Chen *et al.*, *J. Infect. Dis.* 128:543 (1973)); nomeadamente extracção com CM, o que leva a uma fase de CM rica em LPS e fosfolípido, a partir da qual o LPS pode ser posteriormente purificado. Contudo, a purificação de LPS a partir da fase de CM rica em LPS e fosfolípido necessita, tipicamente, de múltiplos passos de precipitação para obter LPS de suficiente pureza para utilização em aplicações imunoestimulatórias, tal como, por exemplo, utilização como um adjuvante de vacina.

Por esse motivo, seria desejado ter métodos para preparar, de um modo conveniente, composições de LPS altamente puras. Além disso, seria desejado ter métodos para gerar composições de LPS cujas composições tenham 3D-MLA com níveis aumentados de congéneres de hexa-acilo.

Têm sido utilizados técnicas de fermentação conhecidas para preparar culturas de bactérias gram-negativas, compreendendo LPS

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

#### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um método de extracção do lipopolissacárido (LPS) a partir de uma cultura de células da estirpe bacteriana mutante profundamente rugosa, compreendendo:

(a) extrair as células com uma solução consistindo essencialmente de, pelo menos, cerca de 75% em peso de um álcool alifático, possuindo desde 1 a 4 átomos de carbono e a água de equilíbrio, produzindo, desse modo, células com teor reduzido em fosfolípido;

(b) extrair as células com teor reduzido em fosfolípido com uma solução compreendendo clorofórmio e metanol (CM) produzindo, desse modo, uma solução de LPS em CM, em que a extracção com álcool alifático é realizada a uma temperatura entre 35 °C e 65 °C.

Este método proporciona soluções de LPS em CM que possuem teor reduzido em fosfolípido e que são, por esse motivo, adequadas para posterior modificação e purificação para 3D-MLA. O método envolve passos relativamente simples e pouco dispendiosos.

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Os desenhos seguintes formam parte da presente descrição e estão incluídos para demonstrar, adicionalmente, determinados aspectos da presente invenção. A invenção pode ser melhor compreendida por referência a um ou mais destes desenhos, em combinação com a descrição detalhada de formas de realização específicas aqui apresentadas.

A Figura 1 mostra placas de TLC de extractos de etanol e amostras de LPS obtidas com diferentes temperaturas, durante as extracções de etanol. A placa da esquerda mostra, visto da esquerda para a direita, os extractos de 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 da direita mostra o LPS obtido a partir 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 ácido gordo. Os níveis destas impurezas são reduzidos pelo aumento da temperatura das extracções com etanol e são muito reduzidos na amostra que foi pré-extraída a 50 °C.

## DESCRIÇÃO DE FORMAS DE REALIZAÇÃO ILUSTRATIVAS

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

Contudo, o lípido A produzido por bactérias gram-negativas compreende, tipicamente, várias espécies que têm a mesma estrutura geral do lípido A, mas diferem no número de porções de ácido gordo que contêm. Os grupos de espécies de lípido A com o mesmo número de ácidos gordos são referidos aqui como "congêneres". Os congêneres do lípido A que possuem desde 4 a 7 porções de ácido gordo são produzidos por cultura padrão à escala comercial, de bactéria gram-negativas, tal como *S. minnesota* R595. Como resultado, o 3D-MLA produzido de, e. g., lípido A de *S. minnesota* R595 tem uma composição congénere que varia, tipicamente, desde 3 a 6 porções de ácido gordo (uma vez que 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 biossintética na montagem do lípido A e (2) perda de porções de ácido gordo da estrutura principal do lípido A, durante o processamento para 3D-MLA. Apesar de não estar limitado pela teoria, pensa-se que a variabilidade biossintética ocorra devido à especificidade não absoluta do substrato das aciltransferases envolvidas dos passos terminais da biossíntese do lípido A,



entre outras explicações. A perda de porções de ácido gordo da estrutura principal do lípido A também pode ocorrer durante as hidrólises ácida e alcalina utilizadas, tipicamente, na produção de 3D-MLA.

Surpreendentemente, foi verificado que a composição congénere de 3D-MLA pode ser alterada por alteração dos parâmetros de um processo de cultura de uma estirpe bacteriana mutante profundamente rugosa que produz o lípido A. Especificamente, verificou-se que manter a cultura da estirpe bacteriana mutante profundamente rugosa na fase estacionária durante, pelo menos, cerca de 5 h antes da colheita, resulta numa alteração nas proporções de congéneres de lípido A assim produzidos, de tal modo que, tipicamente, pelo menos, cerca de 20% em moles do último 3D-MLA produzido a partir do lípido A contém 6 ácidos gordos. De um modo preferido, pelo menos, cerca 50% em moles do 3D-MLA contém 6 ácidos gordos. Verificou-se que uma manutenção no tempo de fase estacionária de cerca de 5,5 h é particularmente eficaz. Isto é contrário aos processos de cultura típicos conhecidos na técnica, em que a colheita ocorre quase imediatamente após a introdução da cultura na fase estacionária; no processo conhecido, o teor em congénere do LPS é altamente variável e resulta em 3D-MLA com teor variável em congénere hexa-acilo.

Por "estirpe bacteriana mutante rugosa profunda" entende-se uma estirpe de uma bactéria gram-negativa, possuindo 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 for 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 rugosas profundas, tal como estirpes *Proteus mirabilis*, entre outras.

Pode ser utilizada qualquer técnica apropriada para fazer crescer uma estirpe bacteriana mutante rugosa profunda. Tipicamente, isto vai envolver a utilização de, pelo menos, um biorreactor à escala comercial. Numa forma de realização, a técnica envolve inocular um biorreactor relativamente pequeno (e. g., 15 L) com células da estirpe bacteriana mutante rugosa profunda, fazer crescer a 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 realizado em qualquer meio conhecido ou descoberto, para permitir o crescimento da estirpe bacteriana mutante profunda rugosa. Numa forma de realização preferida, o meio é M9, uma mistura de sais inorgânicos suplementada com dextrose e ácidos casamino. A composição de M9 é bem conhecida pelos especialistas na técnica.

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

A colheita pode ser realizada por qualquer técnica conhecida. Numa forma de realização preferida, após a cultura celular ter sido mantida na fase estacionária durante, pelo menos, cerca de 5 h, os teores do biorreactor são bombeados para um aparelho de filtração tangencial para separar o meio gasto das células.

O LPS é depois extraído das células através de qualquer técnica apropriada. As técnicas conhecidas incluem o método de Galanos, o qual 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 do LPS por centrifugação ou filtração (Galanos *et al.*, Eur. J. Biochem. 9:245 (1969)) e o método de Chen, citado acima, o qual envolve a extracção do LPS com uma mistura de clorofórmio e metanol (CM), seguido por uma série de passos de precipitação de metanol.

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

Independentemente da técnica de extracção, o resultado é um LPS seco, substancialmente puro, o qual pode ser ainda processado por hidrólise ácida sequencial e hidrólise alcalina para formar 3D-MLA, como 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 depois 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, ácido toluenossulfónico ou ácido tricloroacético. A reacção pode ser realizada 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 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 moderado 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 realizado em meios aquosos ou orgânicos. Os solventes orgânicos apropriados incluem metanol ou outros álcoois, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), clorofórmio, diclorometano ou as suas misturas, entre outros. Também podem ser empregues combinações de água e solventes orgânico miscíveis em água.

A base alcalina utilizada para realizar 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 dietilamina e trietilamina, entre outras), entre outras.

Em meios aquosos, o pH está, tipicamente, entre cerca 10 e cerca de 14, de um modo preferido, entre cerca de 10 e cerca

de 12. A reacção de hidrólise é, tipicamente, realizada a desde cerca de 20 °C a cerca de 80 °C, de um modo preferido, desde cerca de 50 °C a cerca de 60 °C, durante um período de cerca de 10 min a cerca de 48 h.

Uma técnica preferida para hidrólise alcalina envolve a dissolução de MLA em CM 2:1 (v/v), saturando a solução com um tampão aquoso de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 0,5 M a pH 10,5 e, depois, evaporação flash do solvente a 45-50 °C sob um aspirador a vácuo (aproximadamente 100 mm de Hg).

A presente invenção refere-se a um método de extracção de lipopolissacárido (LPS) a partir de uma cultura de células de estirpe bacteriana mutante profunda rugosa, compreendendo:

(a) extrair as células com uma solução consistindo essencialmente de, pelo menos, cerca de 75% em peso de um álcool alifático, possuindo desde 1 a 4 átomos de carbono e a água de equilíbrio produzindo, desse modo, células com teor reduzido em fosfolípido;

(b) extrair as células com teor reduzido em fosfolípido com uma solução compreendendo clorofórmio e metanol produzindo, desse modo, uma solução de LPS em clorofórmio e metanol, em que a extracção com álcool alifático é realizada a uma temperatura entre 35 °C e 65 °C.

As células da estirpe bacteriana mutante profunda rugosa, a sua cultura e métodos de preparação da cultura, são como descrito acima. De um modo preferido, a estirpe bacteriana mutante profunda rugosa é seleccionada dos géneros *Salmonella* ou *Escherichia*. De um modo mais preferido, se a estirpe bacteriana

mutante profunda rugosa 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 profunda rugosa for do género *Escherichia*, de um modo mais preferido, é da espécie *Escherichia coli* e, de um modo mais preferido, é a estirpe *Escherichia coli* D31m4.

O primeiro passo de extracção pode ser realizado com qualquer álcool alifático de cadeia curta. O álcool alifático pode ser linear, ramificado ou cíclico. De um modo preferido, o álcool alifático tem desde 2 a 4 átomos de carbono e é miscível em 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 compreende entre cerca de 85% em peso e cerca de 95% em peso de álcool alifático. Essencialmente, o equilíbrio da solução é água. Podem estar presentes vestígios de outros compostos como resultado de purificação incompleta ou outra contaminação do álcool alifático e componentes da água da solução.

A temperatura à qual o primeiro passo de extracção é realizado pode ser qualquer temperatura que seja eficaz no fornecimento de extracção suficiente de fosfolípido, a partir de 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 a taxa de adição da solução de álcool alifático, duração do

contacto da solução e das células e agitação ou a sua ausência, 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 fosfolípido e (ii) células com um teor reduzido em fosfolípido. O componente LPS das membranas celulares separa-se, substancialmente, completamente das células com um teor reduzido em fosfolípido.

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

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

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 com CM do método de Chen resulta numa solução de LPS que contém níveis substanciais de fosfolípidos, o segundo passo de extracção da presente invenção, sendo realizado em células com um teor reduzido de 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 desejados, uma vez que não são favoráveis para produção em grande escala, utilizam misturas de solventes que apresentam problemas ao nível da saúde e segurança (e. g., fenol:clorofórmio:éter de petróleo) ou ambos.

Dada a ausência substancial de fosfolípido da solução de LPS, a purificação adicional 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 LPS solução.

Opcionalmente, o LPS pode ser adicionalmente processado, tal como pelos passos de hidrólise ácida e hidrólise alcalina descritos anteriormente, para produzir MLA ou 3D-MLA.

O 3D-MLA produzido pelo seguimento dos métodos descritos anteriormente pode ser utilizado para vários fins. Uma utilização preferida é como um imunostimulante ou adjuvante para composições farmacêuticas, compreendendo um polinucleótido imunogénico, polipéptido, anticorpo, célula T ou célula apresentadora de antigénio (APC). Um imunostimulante ou adjuvante refere-se, essencialmente, a qualquer substância que aumente ou potencie uma resposta imune (mediada por anticorpo e/ou célula) para um antigénio exógeno.

Uma resposta imune que o MLA ou 3D-MLA, produzidos de acordo com a presente invenção, pode estimular é o tipo Th1. Foi observado que uma combinação de monofosforil lípido A (MLA), de um modo preferido, monofosforil lípido A 3-O-desacilado (3D-MLA), em conjunto com um sal de alumínio, é eficaz como um



adjuvante para desencadear uma resposta predominantemente de tipo Th1. Os elevados níveis de citocinas do tipo Th1 (e. g., IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-2 e IL-12) tendem a favorecer a indução de respostas imunes mediadas por células, para um antigénio administrado. Pelo contrário, elevados níveis de citocinas do tipo Th2 (e. g., IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10) tendem a favorecer a indução de respostas imunes humorais. Após a aplicação de uma composição farmacêutica compreendendo MLA ou 3D-MLA, um doente irá suportar uma resposta imune que inclui respostas do tipo Th1 e Th2. Quando a resposta é predominantemente do tipo Th1, o nível de citocinas do tipo Th1 irá aumentar para uma maior extensão do que o nível de citocina do tipo Th2. Os níveis destas citocinas podem ser facilmente avaliados utilizando ensaios padrão. 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 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 os seus derivados, incluindo QS21 e QS7 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA); Escin; Digitonin; ou saponinas de *Gypsophila* ou *Chenopodium quinoa*), tal como a combinação de QS21 e adjuvante 3D-MLA, como descrito no documento WO 94/00153 ou uma composição menos reactogénica, onde o QS21 é mitigado com colesterol, como descrito no documento WO 96/33739. Outras formulações preferidas compreendem uma emulsão óleo em água e tocoferol. Outra formulação adjuvante particularmente preferida empregando QS21, 3D-MLA e tocoferol numa emulsão óleo em água é descrita no documento WO 95/17210.

## **EXEMPLO 1 – Métodos gerais**

### **A. Preparação do meio**

O crescimento celular foi conduzido em meio M9, o qual é preparado pela combinação de soluções estéreis de sais inorgânicos, ácidos casamino e dextrose. A solução salina M9 é, tipicamente, preparada no fermentador e contém os seguintes sais: 2,0 g/L de NaCl, 0,2 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 3,0 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 6,0 g/L de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e 1,0 g/L de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . As soluções estéreis de ácidos casamino a 20% (p/v) (20 mL/L) e dextrose a 50% (p/v) (32 mL/L) são depois adicionadas assepticamente ao fermentador para produzir o meio completo.

### **B. Crescimento de sementes**

Tipicamente, um balão Erlenmeyer estéril de 250 mL foi carregado com 50 mL de meio M9 estéril. Um frasquinho de sementes de *Salmonella minnesota* R595 (ca.  $10^8$  cfu) foi descongelado e adicionado ao balão, o qual foi depois vedado com um tampão de gaze. A cultura foi incubada, a 37 °C, durante 6-8 h, até o crescimento robusto ser evidente.

### **C. Crescimento celular**

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

dextrose foram depois adicionadas assepticamente. O fermentador foi equipado com linhas de alimentação para anti-espuma (SAG-471 a 0,1%, Witco Corp.) e  $\text{NH}_4\text{OH}$  (30%) bem como sondas para pH,  $\text{dO}_2$ , e espuma. O meio foi ajustado para pH 6,9, utilizando a alimentação de  $\text{NH}_4\text{OH}$ . O fermentador foi depois inoculado com toda a cultura de sementes e foi incubado, a 37 °C, com aspersão de ar (tipicamente 2,0 Lpm) e agitação (tipicamente 50 rpm). A fase de crescimento da cultura foi monitorizada por medição da densidade óptica a 590 nm. As células foram recolhidas por centrifugação ou filtração de fluxo tangencial, lavadas com água e liofilizadas.

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

O LPS foi isolado, de acordo com o procedimento de Qureshi *et al.*, (1986) com ligeiras modificações. Numa corrida típica, as células secas foram primeiro agitadas a uma concentração de 20 mg/mL em etanol a 90% (v/v), à temperatura ambiente, durante 1 h, e foram depois recuperadas por filtração de vácuo. As células foram submetidas a uma segunda extracção com etanol, seguido por extracções sequenciais com acetona e dietiléter (15 min cada, ambas a 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 como PCP) foi preparado e deixado a repousar, de um dia para o outro. O pó de éter foi suspenso em PCP, o qual foi eliminado por decantação da água em excesso, a uma concentração de 70 mg/mL. A solução foi agitada durante 30 min e foi depois centrifugada (3000 x g, 15 min, 0-5 °C). A fracção sobrenadante foi decantada para um frasco de fundo redondo e o pélete celular foi extraído uma segunda vez

com PCP. As fracções de sobrenadante foram combinadas e evaporadas por evaporador rotativo, a 40 °C, até todos os solventes voláteis serem largamente removidos. O volume restante foi depois medido. A água foi adicionada, gota a gota, até uma turbidez persistente ser evidente e, depois, foram adicionados 5 volumes de acetona, seguido por 1 volume de dietiléter (ambos arrefecidos num banho de gelo) à solução de fenol, com mistura rápida. A solução foi colocada num banho gelado durante 30 min e, depois, o LPS precipitado foi recuperado por centrifugação (5000 x g, 15 min, 0-5 °C). Foi geralmente necessário filtrar por gravidade o sobrenadante para recuperar qualquer LPS que não permaneceu no pélete. 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 4-5%, com base no peso seco inicial de células.

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

O LPS foi suspenso em água a uma concentração de 10 mg/mL, utilizando sonicação em banho, a 45-55 °C, para auxiliar a dispersão do material sólido. A solução resultante deve ser ligeiramente turbida, sem sólidos visíveis a olho nu. A esta solução foi adicionado 1 volume de HCl 0,2 N e foi depois colocada num banho de água a ferver, durante 15 min. A reacção foi mitigada num banho gelado e foi, depois, extraída com 5 volumes (relativamente à solução de LPS inicial) de clorofórmio:metanol 2:1 (v/v). A solução bifásica foi agitada com vórtex e as fases foram separadas por centrifugação a baixa velocidade (500-1000 x g). A fase inferior foi recuperada e evaporada sob azoto, produzindo MLA em bruto.

#### F. Preparação de 4'-monofosforil lípido A 3-O-desacilado (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 teste de 16 x 100 mm. 0,4 mL de metanol adicionais foram adicionados ao tubo e este foi depois colocado num banho de água, a 50 °C, durante 10 min. A reacção foi iniciada por adição de 40 µL de  $\text{KHCO}_3$  a 0,5 M, pH 10,5 e a solução foi incubada, a 50 °C, durante 20 min. No final deste período de tempo, o tubo foi removido do banho de água e a reacção foi mitigada por adição de 2,0 mL de HCl 0,1 N (arrefecido), seguido por agitação com vórtex. O 3D-MLA foi recuperado por adição de 1,0 mL de metanol, agitação com vórtex, 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 realizadas utilizando placas de 5 x 10 cm revestidas com Sílica Gel 60 (E Merck). As amostras foram geralmente aplicadas às placas de TLC como soluções de 10 mg/mL em clorofórmio:metanol 4:1 (v/v), com 3 µL de solução (30 µg de amostra) aplicados em pequenos pontos a uma linha de 5 mm utilizando uma pipeta capilar. As placas foram desenvolvidas com um sistema de solvente compreendendo clorofórmio/metanol/água/hidróxido de amónio 50:31:6:2 (v/v). As bandas desenvolvidas nas placas foram visualizadas por spray com

uma solução de ácido fosfomolibdico a 10% (p/v) em etanol, seguido por carbonização a 150-160 °C. Em alguns casos, as intensidades relativas dos pontos foram quantificadas por densitometria de varrimento com um Shimadzu CS9000U Dual Wavelength Flying Spot Scanner (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 primeiro convertidas para a forma ácida por lavagem da 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 agitado com vórtex, centrifugado e a fase inferior (orgânica) foi transferida para um tubo de teste e evaporada sob uma corrente de azoto. O resíduo foi depois metilado por tratamento com diazometano. Brevemente, foi preparada uma solução etérea de diazometano por colocação de 60-100 mg de 1-metil-3-nitro-1-nitrosoguanidina (MNNG; Aldrich) num frasquinho de 2 dram, adição de 60 µL de dietiléter por mg de MNNG, depois, adição de 9 µL de NaOH 5 N por mg de MNNG, enquanto se agita a solução a <-10 °C. Após o final da reacção, a fase de éter amarelo-limão foi seca, transferindo-a para um segundo frasquinho que continha diversos péletes de NaOH e submeteu-se a rotação, todos 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 a solução de diazometano foi adicionada, gota a gota, com agitação, até uma cor amarela pálida persistir. O solvente foi depois evaporado à temperatura ambiente sob uma corrente de azoto e foi depois seca sob vácuo durante, pelo menos, 30 min.

As análises cromatográficas foram conduzidas numa coluna C<sub>18</sub> de fase reversa (Nova-Pak, 4 µm de tamanho de partícula, 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 filtradas através de um filtro de seringa de PTFE de 0,45 µm. Um volume de injeção de 20-25 µL foi tipicamente utilizado, seguido de eluição com um gradiente linear de 20 a 80% de isopropanol em acetonitrilo, durante 60 min, a um caudal de 2 mL/min com monitorização a 210 nm.

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

O LPS tende a ser um material altamente heterogéneo, devido à variabilidade 1) no número de resíduos de açúcar nas regiões de antigénio O e nucleares, 2) nas substituições polares na região nuclear e nos fosfatos no lípido A e 3) no número e local de ácidos gordos ligados à estrutura principal do lípido A. É esta última fonte de variabilidade que é de interesse, relativamente ao teor em congénere de 3D-MLA (MPL®). A hidrólise de LPS para MLA e 3D-MLA remove a variabilidade nas regiões de antigénio O e nucleares, contudo, introduz também heterogeneidade adicional devido à perda não controlada de ácidos gordos ligados a O. Isto evita que o padrão de acilação no LPS intacto seja conhecido de modo exacto. Como um modo de contornar isso, foi desenvolvido um método em que os fosfatos e a região nuclear são removidos sob condições moderadas que não resultam na perda de ácidos gordos ligados a O. O lípido A desfosforilado resultante (fosforil lípido A zero ou ZPL) pode ser depois analisado por HPLC, produzindo um reflexo preciso do padrão de acilação no LPS parental.

O método foi tipicamente realizado como se segue. Entre 0,5-5,0 mg de amostra de LPS foram hidrolisados em 200 µL de ácido fluorídrico concentrado durante 3-4 h, a 27 °C. Esta reacção deve ser realizada num tubo de Teflon bem fechado e numa *hotte* bem ventilada. 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 teste de tubo de 16 x 100 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 sonicação em banho, foi adicionado 1,0 mL de NaOAc a 40 mM e o tubo foi suspenso num banho de água a ferver, durante 30-45 min. A reacção foi mitigada por arrefecimento num banho gelado e o ZPL foi recuperado por extracção com 5 mL de clorofórmio:metanol 2:1 (v/v). A fase orgânica foi transferida para um pequeno frasquinho de tampa de rosca e o solvente foi evaporado sob azoto. O ZPL foi derivatizado por adição de 200 µL de 10 mg/mL de HCl O-(3,5-dinitrobenzil)hidroxilamina (Regis Technologies, Inc.) em piridina, fechando bem o frasquinho, depois, incubar, 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 (forma de acetato; Waters) que foi pré-equilibrado no mesmo solvente. A coluna foi enxaguada com um total de 5,0 mL de clorofórmio:metanol 2:1 (v/v) em diversas pequenas porções e o eluato foi recolhido num tubo de teste de 16 x 100 mm. 2,0 mL de HCl 0,1 N foi adicionado ao eluato, o sistema bifásico foi agitado com vórtex, centrifugado brevemente a 500-1000 x g, e a fase inferior (orgânico) foi transferida para um outro tubo de teste e evaporado 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 de 0,45 µm. O filtro foi enxaguado duas vezes com clorofórmio:metanol 4:1 (v/v) e o filtrado foi evaporado sob azoto. O filtrado foi, por fim, recuperado em 50-150 µL de clorofórmio:metanol 4:1 (v/v) e transferido para um frasquinho auto-injector para análise de HPLC. As condições de HPLC foram como se segue: coluna C<sub>18</sub> de fase reversa (e. g., Waters), volume de injeção de 10 µL, gradiente linear de 20 a 80% de isopropanol em acetonitrilo, durante 60 min, a um caudal de 2 mL/min, monitorizado a 254 nm.

**EXEMPLO DE REFERÊNCIA 3 - Comparação da composição congénere de MLA/3D-MLA de culturas colhidas em diferentes momentos**

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

Tabela 1. Composição congénere de MLA e 3D-MLA de células colhidas em diferentes idades.

| Corrida | Descrição                 | Idade da cultura na colheita | Tempo na fase estacionária | MLA                       |             | 3D-MLA                    |
|---------|---------------------------|------------------------------|----------------------------|---------------------------|-------------|---------------------------|
|         |                           |                              |                            | hexa-acilo 3-O-desacilado | hepta-acilo | hexa-acilo 3-O-desacilado |
| A       | Exponencial tardia        | 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 alteram o padrão de acilação dos seus LPS durante a fase estacionária, resultando num aumento no teor global de hexa-acilo 3-O-desacilado mais espécies hepta-acilo em MLA derivadas deste LPS e isto origina, por sua vez, o teor aumentado de espécies hexa-acilo 3-O-desaciladas em 3D-MLA, preparadas a partir deste MLA.

**EXEMPLO DE REFERÊNCIA 4 - Comparação da composição congénere de LPS a partir de culturas colhidas em diferentes momentos**

Uma série de corridas de fermentador foi conduzida com os seguintes parâmetros: 2,0 L de meio M9 (pH inicial de

6,84-6,87), 2 Lpm de fluxo de ar, agitação a 225 rpm, 37 °C, sem controlo de pH. O estágio de crescimento das culturas foi monitorizado através da 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 para 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 na colheita | Tempo na fase estacionária | Teor em congénere   |                           |             |
|---------|---------------------------|------------------------------|----------------------------|---------------------|---------------------------|-------------|
|         |                           |                              |                            | hexa-acilo 3-O-acil | hexa-acilo 3-O-desacilado | hepta-acilo |
| B       | Fase estacionária precoce | 9 h                          | ~0,5 h                     | 76%                 | 0%                        | 24%         |
| C       | 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). Por este motivo, a única fonte de congéneres hexa-acilados em 3D-MLA preparados a partir deste LPS seria o material hepta-acilado (24%). Pelo contrário, o LPS das células colhidas na fase estacionária tardia continha ambas as espécies hepta-acilo e hexa-acilo 3-O-desacilado (19% e 17%, respectivamente). Ambas estas espécies iriam contribuir para o teor de hexa-acilo

em 3D-MLA (MPL<sup>®</sup>) preparado a partir deste LPS. Foi inesperado verificar que as células produzem espécies de hexa-acilo 3-O-desacilado de LPS sob determinadas condições.

**EXEMPLO 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, como 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, nas quais alíquotas de 150 mL da suspensão celular foram, cada, 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 com etanol, sob as mesmas condições, excepto a utilização de etanol a 95%. As células foram recuperadas por filtração por sucção e foram depois 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, produzindo as preparações de LPS. As amostras do primeiro e segundo filtrados da extracção com etanol obtidos em cada temperatura, bem como o LPS obtido a partir das células pré-extraídas, foram analisadas por cromatografia em camada fina, de acordo com o método no Exemplo 2. As imagens das placas de TLC são mostradas na Figura 1.

A Figura 1 mostra as placas de TLC de extractos de etanol e as amostras de LPS obtidas com diferentes temperaturas durante

as extracções com etanol. A placa da esquerda mostra, visto da esquerda para a direita, os extractos de 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 a partir 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 ácido gordo. Os níveis destas impurezas são reduzidos pelo aumento da temperatura das extracções de etanol e são muito reduzidos 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 outro modo, 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 6 - Comparação de LPS obtido com e sem pré-extracção com etanol**

Três lotes de células de *S. minnesota* R595 foram cultivados num fermentador de 750 L (B. Braun), utilizando essencialmente as mesmas condições como descrito no Exemplo 1. As células foram colhidas por filtração de fluxo tangencial e foi obtida uma amostra da suspensão celular 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 celulares 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 examinadas desde cerca de  $R_f = 0,01$  a  $0,90$  e a proporção de intensidade na região de LPS ( $R_f = 0,01$  a  $0,020$ ) para a intensidade total foi calculada para cada amostra. Os resultados são apresentados na Tabela 3.

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

| Corrida | Número de Lote | Percentagem de intensidade total na região de 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:

<sup>1</sup> Percentagem de intensidade total na região de 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 a pré-extracção de células de *S. minnesota* R595 com etanol a 90%, a 50 °C, é substancialmente mais puro do que o material das células sem pré-extracção.

Lisboa, 24 de Outubro de 2014

## REIVINDICAÇÕES

1. Método de extracção de lipopolissacárido (LPS) a partir de uma cultura de células de estirpe bacteriana mutante profunda rugosa, compreendendo:
  - a. Extrair as células com uma solução consistindo essencialmente de, pelo menos, 75% em peso de um álcool alifático, possuindo desde 1 a 4 átomos de carbono e a água de equilíbrio produzindo, desse modo, células com teor reduzido em fosfolípido;
  - b. Extrair as células com teor reduzido em fosfolípido com uma solução compreendendo clorofórmio e metanol produzindo, desse modo, uma solução de LPS em clorofórmio e metanol,em que a extracção com álcool alifático é realizada a uma temperatura entre 35 °C e 65 °C.
2. Método da reivindicação 1, em que a estirpe bacteriana mutante profunda rugosa é dos géneros *Salmonella* ou *Escherichia*.
3. Método da reivindicação 2, em que a estirpe bacteriana mutante profunda rugosa do género *Salmonella* é da espécie *Salmonella minnesota*.
4. Método da reivindicação 3, em que a estirpe bacteriana mutante profunda rugosa da espécie *Salmonella minnesota* é a estirpe *Salmonella minnesota* R595.



5. Método da reivindicação 2, em que a estirpe bacteriana mutante profunda rugosa do género *Escherichia* é da espécie *Escherichia coli*.
6. Método da reivindicação 5, em que a estirpe bacteriana mutante profunda rugosa da espécie *Escherichia coli* é da estirpe *Escherichia coli* D31m4.
7. Método da reivindicação 1, em que o álcool alifático tem desde 2 a 4 átomos de carbono.
8. Método da reivindicação 7, em que o álcool alifático é etanol.
9. Método da reivindicação 1, em que a solução compreendendo álcool alifático compreende entre 85% em peso e 95% em peso do álcool alifático.
10. Método da reivindicação 1, em que a temperatura está entre 45 °C e 55 °C.
11. Método da reivindicação 1, compreendendo ainda evaporar o clorofórmio e metanol da solução de LPS produzindo, desse modo, um resíduo de LPS seco.
12. Método da reivindicação 11, compreendendo ainda submeter o resíduo de LPS seco a hidrólise ácida sequencial e hidrólise básica, para formar 3D-MLA.

Lisboa, 24 de Outubro de 2014

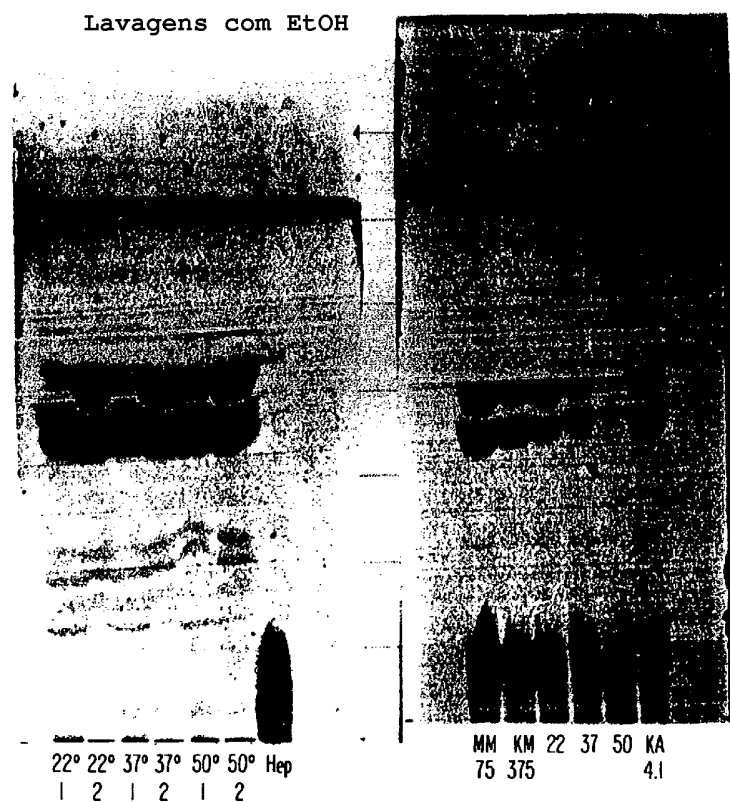


FIG. 1.