



HU000228688B1

(19) **HU****MAGYARORSZÁG**
Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala(11) Lajstromszám: **228 688**(13) **B1**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 03 04091**(22) A bejelentés napja: **2002. 03. 28.**(40) A közzététel napja: **2004. 03. 29.**(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértéskönyvben: **2013. 05. 28.**(51) Int. Cl.: **C12P 19/04** (2006.01)

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:

PCT/US 02/09731

(87) A nemzetközi közzétételi szám:

WO 02078637

(30) Elsőbbségi adatok: 60/280,089 2001. 03. 30. US	(73) Jogosult(ak): Corixa Corp., Seattle, Washington (US)
(72) Feltaláló(k): Myers, Kent R., Hamilton, Montana (US) Snyder, D. Scott, Hamilton, Montana (US)	(74) Képviselő: ifj. Szentpéteri Ádám, S.B.G. & K. Szabadalmi Ügyvivői Iroda, Budapest

(54) **Eljárás 3-O-deaktivált-4'-monofoszforil-lipid (3D-MLA) előállítására**

(57) Kivonat

A találmányban közzétett eljárás lipopoliszacharid összetétel (LPS) előállítására szolgál, mely a következő lépésekből áll:

- (a) a deep rough mutáns bakteriális törzs táptalajban történő növesztése;
- (b) a tenyészet stacioner fázisának fenntartása legalább körülbelül 5 óráig;
- (c) a tenyészetből a sejtek összegyűjtése; és
- (d) a sejtekből az LPS kivonatolása.

Az eljárás lehetővé teszi olyan LPS termelését, ami a 3-O-deacilezett monofoszforil lipid A (3D-MLA) termeléséhez felhasználható, mely legalább körülbelül 20 mol% arányban rokon hexaacil csoportot tartalmaz. A találmány egy másik megvalósítási formájában a lipopoliszacharid (LPS) mutáns (deep rough) bakteriális törzs sejteinek tenyészetéből lipopoliszacharidot (LPS) kivonó eljárást tettek közzé, mely a következő lépésekből áll: (a) a sejtek kivonatolása olyan oldattal, mely lényegében legalább 75 tömeg% alifás, 1-4 szénatomos alkoholt, és megfelelő mennyiségű vizet tartalmaz, ezzel a csökkent foszfolipid tartalmú sejtek kialakítása biztosított; (b) a csökkentett foszfolipid tartalmú sejtek kivonatolása olyan oldattal mely kloroformot és metanolt (CM) tartalmaz. Ez az eljárás a CM elegyében LPS oldatot biztosít redukált foszfolipid tartalommal, és ezt viszonylag egyszerűen és költségkímélően teszi.

77.475/SZE

Eljárás 3-O-deaktivált-4'-monofoszforil-lipid (3D-MLA)

előállítására

A jelen találmány általánosságban a 3-O-deaktivált-4'-monofoszforil-lipid (3D-MLA) bioszintetikus előállításával foglalkozik. Részletesebben, olyan eljárásra vonatkozik, mely a kívánt rokon 3D-MLA-k kitermelését javítja vagy a 3D-MLA lipopoliszacharid (LPS) előanyagok tisztítási költségét minimalizálja.

Régóta felismerték, hogy az enterobakteriális liposzacharidok (LPS) az immunrendszer stimulátorai. Számos válaszban az LPS szubmikrogrammos mennyisége előnyös, vagy hátrányos lehet, míg néhány esetben halált okozhat, ami az LPS klinikai használatát *per se* kizárta. Megfigyelték, hogy az LPS endotoxikus aktivitásáért leginkább a lipid A felelős.

Ennek megfelelően sok erőfeszítést tettek a toxikus LPS vagy a lipid A toxikus hatásainak mérséklésére, immunstimuláló előnyeik meghagyásával. Meg kell említeni Edgar Ribi és munkatársainak erőfeszítéseit, amik a lipid A származékok termelésében a 3-O-deacilezett-4'-monofoszforil lipid A (3D-MLA) előállítására vonatkoznak; a 3D-MLA-t tartalmazó összetételek a kereskedelemben rendelkezésre állnak (márkanéve: MPL®, Corixa Corporation (Seattle, WA)). A 3D-MLA-ról kimutatták, hogy lényegében hasonló immunstimuláló tulajdonságokkal rendelkezik mint a lipid A, de alacsonyabb az endocitotoxikus

aktivitása [Myers és mtsai: 4,912,094 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés]. Myers és munkatársai a 3D-MLA előállítási eljárásáról is beszámoltak, amit a következőkben ismertetünk. Először az LPS-t vagy a lipid A-t gram-negatív baktériumok (például *Salmonella minnesota* R595) mutáns törzséből (deep rough) közepes erősségű ásványi savas oldatokban (például 0,1 N HCl) refluxálták hozzávetőleg 30 percig. Ez a redukáló glükózamin végi első helyzetének defoszforilezéséhez és a lipid A nem redukáló glükózamin 6' helyzetében szénhidrátmentesítéshez vezetett. Másodszor, a defoszforilezett és szénhidrátmentesített lipid A-t (monofoszforil lipid A vagy MLA) lúgos hidrolízisnek vetették alá, például szerves oldószerben, mint például kloroform:metanol (CM) 2:1 térfogatarányú elegyében történő feloldással, az oldatot vizes oldattal (0,5 M Na₂CO₃, pH = 10,5) végzett telítésével, és az oldószer gyors bepárlásával. Ez a lipid A 3. helyzetéről a β -hidroximirisztinsav csoport szelektív eltávolításához vezet, eredményül 3-O-deacilezett-4'-monofoszforil lipid A-t (3D-MLA) nyertek.

A fenti eljárással előállított 3D-MLA minősége a gram-negatív baktériumokból nyert LPS tisztaságától és összetételétől nagymértékben függ. Például az LPS lipid A komponense rokon anyagok keveréke, mely körülbelül 5-7 zsírsavcsoportot tartalmaz. A 3D-MLA kialakulásakor, ahogy az a fenti megvitatásból világosan következik, az egyik zsírsavat eltávolítjuk, mely így olyan 3D-MLA-t eredményez, mely körülbelül 4-6 zsírsavat tartalmaz. Általában úgy tartják, hogy a 3D-MLA legalább 6 zsírsavcsoporttal

előnyös a fokozott immunstimuláló hatások, a csökkent toxicitás és más kívánt tulajdonságok kombinált fenntartása érdekében [Qureshi és Takayama: "The Bacteria," XI, szerkesztők: Iglewski és Clark, Academic Press, 319-338(1990)].

Egy másik példa a gram-negatív baktériumokból származó LPS ipari méretű kivonásához tipikusan a Chen-féle eljárást foglalja magában [Chen és mtsai: Infect. Dis., 128, 543 (1973)]; nevezetesen a CM-mel végzett kivonatolást, mely LPS-ben és foszfolipidben gazdag CM fázishoz vezet, melyből az utóbbi tisztítható. Viszont az LPS tisztítása az LPS- és foszfolipid gazdag CM fázisból tipikusan több kicsapási lépést igényel az immunstimulációs alkalmazásokhoz, mint például vakcina adjuváns, kielégítő minőségű LPS nyeréséhez.

Ezért kívánatos olyan eljárás, mellyel nagytisztaságú LPS összetételeket kényelmesen előállíthatunk. Továbbá kívánatos lehet az az eljárás is, mely olyan LPS összetételeket hoz létre, melyekben a 3D-MLA megnövekedett mennyiségben rokon hexaacil vegyületeket tartalmaz.

A könnyen tisztítható LPS előállításához a gram-negatív baktériumok tenyésztéséhez alkalmazott fermentációs technikákat használtuk. Ezek az ismert technikák tipikusan a bakteriális tenyészetek korai stacioner fázisában történő összegyűjtését foglalják magukban, amelyeket a standard bakteriológiai gyakorlatnak megfelelően végeznek. Bár megfigyeltük, hogy az ismert körülmények között termelt LPS-ek acilezettségi foka változó. Például az *Salmonella minnesota* R595-ből származó lipid A-ban a

heptaacil tartalom 20 és 80 % között változhat, az adott kitermeléstől függően [Rietschel és mtsai: Rev. Infect. Dis., 9, 5527 (1987)]. A különböző időben előállított LPS készítményeknél a rokon heptaacil tartalom variabilitása jelentős eltéréseket eredményezhet a 3D-MLA heptaacil tartalomban.

A jelen találmány egyik megvalósítási formájában lipopoliszacharid (LPS) előállításának eljárásával foglalkozik, mely a következő lépésekből áll:

- (a) a mutáns (deep rough) bakteriális törzs tenyésztése táptalajban;
- (b) a tenyészet stacioner fázisának fenntartása legalább körülbelül 2 óráig;
- (c) a tenyészetekből a sejtek összegyűjtése; és
- (d) a sejtekből az LPS kivonása.

Az eljárás lehetővé teszi, hogy viszonylag nagy arányban (legalább körülbelül 20 mol%) 3D-MLA-t tartalmazó LPS termelését biztosítsuk, melyben hat zsírsavcsoport található.

A jelen találmány egy másik megvalósítási formájában a lipopoliszacharid (LPS) mutáns (deep rough) bakteriális törzs sejteinek tenyészetéből lipopoliszacharidot (LPS) kivonó eljárással foglalkozik, mely a következő lépésekből áll:

- (a) a sejtek kivonatolása olyan oldattal, mely lényegében legalább 75 tömeg% alifás, 1-4 szénatomos alkoholt, és megfelelő mennyiségű vizet tartalmaz, ezzel csökkent foszfolipid tartalmú sejtek kialakítását érjük el;

(b) a csökkentett foszfolipid tartalmú sejtek kivonatolása olyan oldattal mely kloroformot és metanolt (CM) tartalmaz, így az LPS-t CM oldatban kapjuk meg.

Ez az eljárás a CM-ben olyan LPS oldatot biztosít, melynek foszfolipid tartalma csökkentett, és ez ezért a 3D-MLA további módosításához és tisztításához igen jól megfelel. Az eljárás viszonylag egyszerű és költségkímélő lépéseket tartalmaz.

A csatolt ábra a jelen találmány részét képezi, és a jelen találmány bizonyos további jellemzőit mutatja be. A jelen találmány részletesebben megérthető egy vagy több vonatkozó ábrára való hivatkozással, melyek a jelen találmány specifikus megvalósítási formáit részletezik.

Az 1. ábra a különböző hőmérsékleteken végzett etanolos kivonatolásokkal nyert etanolos kivonatok és LPS minták VRK lemezeit mutatja be. A bal oldali lemez balról jobbra a következőket mutatja: 22, 37 és 50 °C-on kapott etanolos kivonatok. Ennek jobb oldalán a legszélső lemez az eredeti LPS minta. A jobb oldali lemez az egyes LPS készítményeket mutatja be. A 3., 4. és 5. oszlop megfelel a 22, 37, illetőleg 50 °C-on elő-kivonatolt sejtekből nyert LPS-eknek. A vastag csíkok, $R_t \sim 0,6$ értéknél, megfelelnek a foszfolipidnek és a zsírsav szennyezéseknek. Az ilyen szennyezési szintek az etanolos kivonatolás magasabb hőmérsékleten történő végzésével csökkenthetők, és igen alacsony szintet érhet el abban a mintában, melyet 50 °C-on elő-kivonatoltak.

A jelen találmány egyik megvalósítási formája a lipopoliszacharid (LPS) termelés eljárására vonatkozik, mely a következő lépésekből áll:

- (a) a mutáns (deep rough) bakteriális törzs tenyésztése táptalajban;
- (b) a tenyészet stacioner fázisának fenntartása legalább körülbelül 2 óráig;
- (c) a tenyészetekből a sejtek összegyűjtése; és
- (d) a sejtekből az LPS kivonása.

A lipopoliszacharidok a fő lipid-alkotók a gram-negatív baktériumok külső membránjának külső rétegében. A gram-negatív baktériumok lipopoliszacharid frakciója többek között lipid A-t tartalmaz. Ahogy azt itt leírtuk a lipid A szénhidrátmentesíthető és részlegesen defoszforilezhető, aminek eredményeként monofoszforilezett lipid A (MLA) keletkezik, és az MLA a 3. helyzetében szelektíven deacilezhető, melynek eredményeként 3-O-deacilezett-4'-monofoszforil lipid A (3D-MLA) jön létre.

Bár a gram-negatív baktériumok által termelt lipid A tipikusan olyan formákat tartalmaz, melyek azonos általános lipid A struktúrával rendelkeznek, de ezek eltérnek egymástól a felépítő zsírsavcsoportok számában. A lipid A csoportok tagjait azonos zsírsavcsoport számmal ebben a szabadalmi bejelentésben "rokonoknak" nevezzük. A rokon lipid A-kat, melyek 4-7 zsírsavcsoportot tartalmaznak, a gram-negatív baktériumok standard ipari méretű tenyésztésével állítják elő, például *Salmonella minnesota* R595-tel. Eredményként a termelt 3D-

MLA, például az *Salmonella minnesota* R595-ből olyan rokon lipid összetételt tartalmaz, mely tipikusan 3-6 zsírsavcsoporttal rendelkezik (mivel a 3D-MLA egy zsírsavcsoportot elvesztett).

A 3D-MLA-ben megmutatkozó heterogenitás (a lipid A-n és az MLA-n keresztül) a rokon összetételben két forrásból származhat: (1) a bioszintézis variabilitása a lipid A kialakulásában, és (2) a lipid A vázából a zsírsavcsoportok vesztese a 3D-MLA kialakulása során. Bár egyetlen elmélethez sem ragaszkodunk, mégis úgy gondoljuk, hogy a bioszintézisben megmutatkozó variabilitás fő oka az aciltranszferázok nem abszolút szubsztrát-specifitása a lipid A bioszintézis végső lépésében, hogy csak egyfajta lehetőséget említsünk. A lipid A vázból a zsírsavcsoportok vesztese savas és lúgos hidrolízis során is bekövetkezhet, amit tipikusan a 3D-MLA termelése során felhasználunk.

Meglepetésünkre, azt találtuk, hogy a rokon 3D-MLA összetétel a mutáns (deep rough) bakteriális törzs, mely a lipid A-t termeli, tenyésztési körülményeinek változtatásával befolyásolható. Részletesebben azt találtuk, hogy a mutáns (deep rough) bakteriális törzs tenyészetének fenntartása stacioner fázisban, legalább 5 óráig a begyűjtés előtt, a rokon lipid A-k arányának változását eredményezik, tipikusan például a 3D-MLA legalább körülbelül 20 mol%-a a lipid A-ból, mely 6 zsírsavat tartalmaz, később keletkezik. Előnyösen a 3D-MLA legalább körülbelül 50 mol%-a 6 zsírsavat tartalmaz. A stacioner fázis körülbelül 5,5 órás fenntartásakor azt találtuk, hogy ez különösen hatásos. A fentiek a szakirodalomban leírt tipikus eljárástól lényeges elté-

rést jelentenek, amelyben a sejtek összegyűjtése közvetlenül a stacioner fázisba lépéskor történik; az ismert eljárásokban a rokon LPS tartalom igen változó és ezért a 3D-MLA-ban változó mennyiségű rokon hexaacil található.

A "mutáns (deep rough) bakteriális törzs" alatt itt egy olyan gram-negatív baktériumot értünk, melynek fenotípusa mély durva. A "deep rough" fenotípus azt jelenti, hogy a lipid A-hoz kapcsolódó poliszacharid körülbelül 2-3 2-keto-3-dezoxi-D-mannooktulonsavat (KDO) tartalmaz. Előnyösen a deep rough mutáns bakteriális törzset a *Salmonella* nemzetségből választjuk ki. Előnyösebben a deep rough mutáns bakteriális törzs a *Salmonella* nemzetség *Salmonella minnesota* faja, és még előnyösebben a *Salmonella minnesota* R595 törzs. A további deep rough mutáns bakteriális törzsek, anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat, a következők lehetnek: *Proteus mirabilis* törzsek.

Bármely megfelelő technika alkalmazható a deep rough mutáns bakteriális törzs tenyésztéséhez. Tipikusan ez legalább egy kereskedelmi méretű bioreaktor használatát foglalja magában. Az egyik megvalósítási formában a technika egy viszonylag kis (például 15 liter) bioreaktorba a deep rough mutáns bakteriális törzs sejtjeinek beoltását öleli fel, valamint a deep rough mutáns bakteriális törzs tenyésztését stacioner fázisig, majd ezek után a 15 literes bioreaktor táplevesét nagyobb (például 750 literes) bioreaktorba juttatjuk.

A növesztés bármely ismert vagy felfedezett táptalajban végrehajtható, mely biztosítja a deep rough mutáns bakteriális

törzs elszaporítását. Az egyik előnyben részesített megvalósítási formában a táptalaj M9, mely szervesetlen sók keveréke, melyet dextrózzal és kazaminosavakkal egészítünk ki. Az M9 táptalaj összetétele a szakirodalomban jártas szakemberek számára jól ismert.

Ezek után a deep rough mutáns bakteriális törzset legalább 5 óráig stacioner fázisban tartjuk, majd a sejteket a tenyészetből összegyűjtjük, és az LPS-t a sejtekből kinyerjük. A sejtek tenyészetből történő összegyűjtésére, és az LPS sejtekből való kinyerésére ismert technikák alkalmazhatók, bár az előnyben részesített technikát a LPS kinyerésére az alábbiakban leírjuk.

A begyűjtés bármely ismert technikával végrehajtható. Az egyik előnyben részesített megvalósítási formában miután a sejteket legalább 5 óráig stacioner fázisban tartottuk, a bioreaktor tartalmát tangenciális szűrő készülékbe pumpáljuk, a sejtek és a táptalaj elkülönítésére.

Az LPS-t ezek után a sejtekből bármely megfelelő technikával kivonatoljuk. Az ismert technikák közé tartozik a Galanos-féle eljárás, melynél az LPS kivonása fenol, kloroform és petroléter (PCP) keverékkel történik, majd a kloroformot és a petrolétert elpárologtatják, aceton és víz hozzáadásával az LPS-t kicsapják, és az LPS-t centrifugálással vagy szűréssel kinyerik [Galanos és mtsai: Eur. J. Biochem, 9, 245 (1969)], és megemlíthetjük a Chen-módszert [Chen és mtsai: Infect. Dis., 128, 543 (1973)] mely a kloroform és metanol eleggyel végzi az LPS kivonását, majd több lépésben metanolos kicsapást alkalmaz.

A javított Chen-féle eljárást az alábbiakban ismertetjük, és ezt előnyben részesítjük az LPS és ipari alkalmazású származékainak gyártásában.

A kivonatolási technikától függetlenül eredményként alapjában tiszta szárított LPS-t nyerünk, mely egymást követő savas és lúgos hidroliziseknek vethető alá, a 3D-MLA kialakítása érdekében, ahogy azt a szakirodalomban leírták [Ribi: 4,436,727 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés; és Myers és mtsai: 4,912,094 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés, amelyeket itt teljes egészében hivatkozásként építettünk be]. A 3D-MLA képzés előnyben részesített megvalósítási formájával kapcsolatban a fenti hivatkozásokat összegezve elmondható, hogy az LPS-t szerves vagy szervetlen savval reagáltatják, majd az MLA termeléshez liofilizik. A szervetlen savak előnyösen a következők: sósav, kénsav vagy foszforsav. A szerves sav előnyösen toluol-szulfonsav vagy triklórecetsav. A reakció körülbelül 90-130 °C-on végezhető a teljes hidrolízis eléréséig, ehhez általában körülbelül 15-60 percre van szükség. Az MLA oldószerrel kezelhető, mely előnyösen aceton, ezzel a zsírsavakat és más szennyezőket feloldjuk, és a szennyező zsírsavakban gazdag oldószert eltávolítjuk.

Ezek után az MLA 3. helyzetéről a β -hidroximirisztinsav eltávolítására az MLA-t enyhe lúgos kezelésnek vetjük alá (gyenge lúgos körülmények között csak a 3. helyzetű β -hidroximirisztinsav labilis). A gyenge lúgos kezelést vizes vagy szerves közegben végezzük. A megfelelő oldószerek közé többek között a

következők tartoznak: metanol vagy más alkoholok, dimetilszulfoxid (DMSO), dimetilformamid (DMF), kloroform, diklórmétán, vagy ezek keverékei. A víz és a vízzel elegyedő oldószerek kombinációi szintén alkalmazhatók.

A hidrolízis végrehajtásához használt lúgokat a következők közül választjuk ki: hidroxidok, karbonátok, foszfátok vagy aminok. Példaként többek között a következő lúgokat említjük: nátrium-hidroxid, kálium-hidroxid, nátrium-karbonát, káliumbikarbonát, nátrium-bikarbonát, és kálium bikarbonát. A bemutató jellegű szerves bázisok közé többek között a következők tartoznak: alkilaminok (mint például többek között dietilamin és trietilamin).

A vizes közegben a pH tipikusan körülbelül 10-14 között található, előnyösen körülbelül 10 és körülbelül 12 között. A hidrolízist tipikusan körülbelül 20 és körülbelül 80 °C között végezzük, előnyösen körülbelül 50 és körülbelül 60 °C között, körülbelül 10 perctől körülbelül 48 óráig terjedő időtartamig.

Az alkalikus hidrolízis egyik előnyben részesített technikája az MLA 2:1 térfogatarányú CM-ben történő kezelése, az oldat telítése vizes 0,5 M Na_2CO_3 pufferrel pH = 10,5 értéken, ezek után az oldószer elpárologtatása vákuumban 45-50 °C-on (hozzávetőleg 100 Hgmm).

A jelen találmány egyik megvalósítási formájában a deep rough mutáns bakteriális törzs sejtjeiből a lipopoliszacharid (LPS) kivonatolásával foglalkozik, mely a következő lépésekből áll:

- (a) a sejtek kivonatolása olyan oldószerrel, mely legalább körülbelül 75 % 1-4 szénatomos alifás alkoholt és kiegészítésként vizet tartalmaz, így olyan sejtek nyerése, melyben a foszfolipid tartalom csökkentett;
- (b) a redukált foszfolipid tartalmú sejtek kivonatolása kloroformot és metanolt magában foglaló oldószerrel, ezzel az LPS biztosítása a kloroform metanol oldatban.

A deep rough mutáns bakteriális törzs sejtjeit, azok tenyésztéseit és tenyésztési módszerüket a fentiekben leírtuk. Előnyösen, a deep rough mutáns bakteriális törzset a *Salmonella* vagy az *Escherichia* nemzetségből választjuk ki. Legelőnyösebb, ha a deep rough mutáns bakteriális törzs a *Salmonella* nemzetségbe tartozik, ilyen például a *Salmonella minnesota*, még előnyösebben a *Samonella minnesota* R595 jelű törzse. Ha a deep rough mutáns bakteriális törzs az *Escherichia* nemzetség tagja, akkor legelőnyösebb az *Escherichia coli*, és legelőnyösebb az *Escherichia coli* D31m4 törzs.

Az első kivonatolási lépés bármely rövidláncú alifás alkohollal elvégezhető. Az alifás alkoholok lineárisak, elágazóak vagy ciklikusak lehetnek. Előnyösen az alifás alkohol 2-4 szénatomos és vízzel elegyíthető. Előnyösebben az alifás alkohol etanol.

Az alifás alkohol oldata bármely százalékban, így 75 %-ban vagy nagyobb mértékben alifás alkoholt tartalmazhat. Előnyösen az oldat körülbelül 85-95 tömeg%-ban alifás alkoholt tartalmaz. Az oldat többi része víz. Más vegyületek nyomokban fordulhatnak

elő, az alifás alkoholok tökéletlen tisztítása vagy más szennyezője és az oldat víz komponensének szennyezői miatt.

Az első kivonatolási lépés bármely hőmérsékleten végrehajtható, mely a tenyésztett sejtekből a foszfolipid hatékony kivonását biztosítja. Előnyösen a hőmérséklet körülbelül 35-65 °C. Előnyösebben a hőmérséklet 45-55 °C.

Az első kivonatolási lépés további paraméterei, mint például az alifás alkoholok adagolási sebessége, az oldat és a sejtek inkubálásának ideje, és a keverés vagy annak hiánya, többek között a szakirodalomban jártas szakemberek számára meghatározható.

Az első kivonatolási lépés eredménye: (i) foszfolipidben gazdag alifás alkoholos oldat, és (ii) olyan sejtek, melyekben a foszfolipid tartalom csökkentett. A sejtmembránok LPS komponensei a sejtek csökkentett foszfolipid tartalmától lényegében teljesen elválnak.

A második kivonatolási lépés a sejtek kloroform-metanol oldattal (CM) történő kivonatolását tartalmazza.

A második kivonatolási lépésben a sejtmembránokból az LPS kivonásához (mint például a Chen-féle eljárásban) a kloroform és a metanol bármilyen aránya alkalmazható. Tipikusan, a kloroform/metanol arány körülbelül 2:1-9:1 tartományban változhat. A csökkentett foszfolipid tartalmú sejtekből az LPS kinyerésére a CM-mel egyenértékű oldószer keverékek szintén felhasználhatók.

A jelen találmány szerinti eljárás előnye a Chen-féle módszerrel szemben az, hogy a foszfolipidet az első kivonatolási

lépésben távolítjuk el. Míg a Chen-féle eljárásban a CM abba az LPS oldatba kerül, mely alapvető mennyiségű foszfolipidet tartalmaz, a jelen találmány második kivonatolási lépését pedig olyan sejteken hajtjuk végre, melyek foszfolipid tartalma csökkentett, az eredményül kapott LPS gazdag oldat lényegében foszfolidtól mentes. Az LPS készítmények alternatív eljárásai, melyek viszonylag foszfolipid mentesek, mint például a Galanos-féle eljárás (lásd fent), kevésbé felelnek meg, mivel nagy térfogatoknál nem alkalmazhatók, mivel ezek olyan oldószer elegyeket alkalmaznak, melyek egészségi és biztonsági kérdéseket vetnek fel (például fenol:kloroform:petroléter), vagy mindkettőt.

Az LPS oldatban így lényegében a foszfolipidek hiányoznak, ezért a további tisztítás a jelen találmány módszere alapján általában egyszerűbb és kevésbé költséges, mint a Chen-féle eljárás. Azt találtuk, hogy a száraz LPS kielégítő tisztasággal a kloroformos és a metanolos LPS oldatból a kloroform és a metanol elpárologtatásával kialakítható.

Szabadon megválaszthatóan az LPS-t további feldolgozásnak vethetjük alá, mint például savas hidrolízisnek és lúgos hidrolízisnek, ahogy azt a fentiekben leírtuk, ezzel így MLA-t vagy 3D-MLA-t termelhetünk.

A fentiek alapján a következő 3D-MLA-t előállító eljárás számos célra felhasználható. Az egyik előnyben részesített felhasználás immunstimuláns vagy adjuváns anyag gyógyszerészeti összetételekben való kialakítását célozza meg, melyek immu-

nogén polinukleotidot, polipeptidet, ellenanyagot, T-sejtet vagy antigén bemutató sejtet (APC) tartalmaznak. Ahogy azt itt használjuk, az immunstimuláns vagy adjuváns szakkifejezés bármely olyan anyagot jelent, mely az exogén antigénnel szemben az immunválaszt fokozza vagy potenciálja (ellenanyag és/vagy sejtközvetített).

Az egyik immunválasz, melyben a jelen találmány szerint előállított MLA-t vagy 3D-MLA-t alkalmazzuk a Th1 típusú immunválaszt stimulálhatja. A monofoszforil lipid A (MLA), előnyösen 3-de-O-acilezett-monofoszforil lipid A (3D-MLA), alumínium-sóval alkotott kombinációjáról megfigyelték, hogy adjuvánsként hatásos elsősorban a Th1 típusú immunválaszban.

A Th1 típusú citokinek (például IFN- γ , TNF α , IL-2 és IL-12) magas szintjei a sejtközvetített immunválaszok indukciójában a beadott antigénre nézve előnyösnek látszanak. Ezzel szemben a Th2 típusú citokinek (például IL-4, IL-5, IL-6 és IL-10) magas szintjei a humorális immunválaszban vesznek részt. Az MLA-t vagy a 3D-MLA-t tartalmazó gyógyszerészeti összetételek alkalmazását követően a betegekben olyan immunválasz alakul ki, mely mind a Th1, mind a Th2 immunválaszokat felöleli. Ha a válasz elsősorban Th1 típusú, akkor a Th1 típusú citokinek szintje nagyobb mértékben nő, mint a Th2 citokinek szintje. A citokin szintek könnyen meghatározhatók standard eljárásokkal. A szakirodalomban a citokincsaládokat összefoglalták [Mosmann és Coffin: *Ann. Rev. Immunol.*, 7, 145-173(1989)].

Egy előnyben részesített megvalósítási formában az adjuváns rendszer a monofoszforil lipid A (MpA), előnyösen 3D-MLA a következőkkel kombinációkban fordulhat elő: szaponin származékkal (mint például Quil A vagy ennek származékai, beleértve a QS21-et és a QS7-et (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA); Escin; Digitonin; vagy *Gypsophila* vagy *Chenopodium quinoa* szaponinokkal), QS21 és 3D-MLA adjuváns kombinációkkal [WO 94/00153 számú szabadalmi bejelentés], vagy kevésbé reakcióképes összetétellé, ahol a QS21 hatását koleszterinnel fékezik [WO 96/33739 számú szabadalmi bejelentés]. A további előnyben részesített készítmények olaj-a-vízben emulziót és tokoferolt tartalmaznak. Egy másik különösen előnyben részesített adjuváns készítmény QS21-et, 3D-MLA-t és tokoferolt alkalmaz olaj-a-vízben emulzióként [WO 95/17210 számú szabadalmi bejelentés].

A következő példák a jelen találmány előnyben részesített megvalósítási formáit mutatják be. A szakirodalomban jártas szakembereknek el kell fogadniuk, hogy a közzétett példák a szabadalom benyújtóinak felfedezései, amit a jelen találmány kivitelezéséhez alakítottak ki, és így a gyakorlat számára az előnyben részesített módoknak tekinthetők. Viszont a szakirodalomban jártas szakemberek számára a jelen találmány közzététele alapján elfogadható, hogy a specifikus megvalósítási formákban számos változtatás tehető, melyek hasonló vagy megegyező eredményre vezetnek, anélkül, hogy a jelen találmány szellemétől és oltalmi körétől eltérnének.

1. Példa

Általános módszerek:

A. A táptalajok elkészítése:

A sejtek tenyésztése M9 táptalajban történt, melyet steril szervesetlen savak, kazaminosavak és dextróz oldatok kombinálásával állítottunk elő. Az M9 sóoldatot tipikusan fermentorban készítettük el, melynek összetétele a következő: 2,0 g/l NaCl, 0,2 g/l, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 3,0 g/l KH_2PO_4 , 6,0 g/l Na_2HPO_4 , és 1,0 g/l NH_4Cl . Ezek után a steril 20 % (vegyes) kazaminosavak (20 ml/l) és 50 % (vegyes) dextróz (32 ml/l) oldatokat steril körülmények között a fermentorba beadtuk, így komplett táptalajt alakítottunk ki.

B. Az inokulum kialakítása:

Tipikusan, a steril 250 ml-es Erlenmeyer lombikokat 50 ml steril M9 táptalajjal töltöttük. A *Salmonella minnesota* R595 (körülbelül 108 cfu) törzs inokulációs fioláját felengedtük és a lombikba beleöntöttük, amelyet ezek után géz-dugóval zártunk le. A tenyészetet 37 °C-on 6-8 óráig inkubáltuk, míg az erőteljes növekedés nyilvánvalóvá vált.

C. A sejtek tenyésztése:

A *Salmonella minnesota* R595 tenyészeteket BioFlo III fermentorban (New Brunswick Scientific, Inc.) növesztettük, amelyet 2,5 literes üvegedénnyel szereltünk fel. Tipikus

tenyésztéskor az edényt 2,0 liter M9 sóoldattal töltöttük fel és autoklávoztuk, majd a kazaminosavak és a dextróz steril oldatát steril körülmények között hozzáadtuk. A fermentort habzástgátló betáplálási feltétellel láttuk el (0,1 % SAG-471, Witco Corp.), valamint NH_4OH -et (30 %) adagoló fejjel, ahol a pH-t, a dO_2 -t és a habzást szabályoztuk. A közeget NH_4OH betáplálással $\text{pH} = 6,9$ -re állítottuk. A fermentort a inokulum teljes mennyiségével oltottuk, és 37°C -on levegő bevitellel (tipikusan 2,0 liter/perc) keverés mellett (tipikusan 50 rpm) inkubáltuk. A tenyészet növekedési fázisát optikai denzitás méréssel (590 nm) nyomon követtük. A sejteket vagy centrifugálással vagy tangenciális áramlású szűréssel összegyűjtöttük, vízzel mostuk és liofileztük.

D. A lipopoliszacharidok (LPS) izolálása:

Az LPS-t a szakirodalomban leírt eljárással különítettük el [Qureshi és mtsai: (1986)] kis módosításokat eszközölve. A tipikus tenyésztéskor a száraz sejteket 20 mg/ml 90 %-os etanollal (térfogat%) szobahőmérsékleten egy órán át először kevertük, majd vákuumszűréssel kinyertük. A sejteket második etanolos kivonatolásnak vetettük alá, melyet acetonnal és dietilérrrel végeztünk (mindegyiket 15 percig, 40 mg/ml kiindulási tömegnél), az eredményül kapott port levegőn egy éjszakán át szárítottuk. Időközben a fenol (89 %):kloroform:petróleuméter 19:45:72 (térfogatra; amit PCP-vel rövidítettünk) oldatot egy éjszakán át állni hagytuk. Az éteres port PCP-be szuszpendáltuk, melynek víz feleslegét dekantáltuk, 70 mg/ml koncentrációjúra.

Az oldatot 30 percig kevertettük és ezek után centrifugáltuk (3000 x g, 15 perc, 0-55 °C-on). A felülúszót dekantáltuk egy kerek aljú edénybe és a sejtek üledékét másodszor ismét PCP-vel kivonatoltuk. A felülúszókat egyesítettük és forgós bepárlóval 40 °C-on az illékony oldószerek majdnem teljes mennyiségének eltávolításáig párologtattuk. A megmaradó térfogatot ezek után megmértük. Cseppenként vizet adtunk hozzá, míg a zavarosság nyilvánvalóvá vált, és ezek után ötszörös térfogat acetont, majd a fenolos oldathoz gyors keverés közben egyszeres térfogat dietil-étert (mindkettőt jégfürdőn lehűtöttük) adtunk. Az oldatot jégfürdőre helyeztük 30 percre és ezek után a kicsapódott LPS-t centrifugálással (5000 x g, 15 perc, 0-5 °C-on) kinyertük. Általában az LPS kinyeréséhez a felülúszó gravitációs szűrésére volt szükség, így az üledékből eltávolítottuk. Az LPS-t egyszer minimális mennyiségű hideg acetonnal mostuk, centrifugálással/szűréssel kinyertük, és ezek után vákuumban szárítottuk. A tipikus kitermelés a kiindulási sejtek száraz tömegének 4-5 %.

E. A 4'-monofoszfolipid A elkészítése (MLA):

Az LPS-t vízbe szuszpendáltuk 10 mg/ml koncentrációban, ultrahangos kádat használva 45-55 °C-on a szilárd anyag diszpergálódásának elősegítésére. Az eredményül kapott oldat gyengén zavaros, gyakorlatlan szem számára szilárd részecskéket nem tartalmaz. Ehhez az oldathoz egyszeres térfogatnyi 0,2 N HCl-t adagoltunk, és ezek után forró vízfürdőbe helyeztük 15 percre. A reakciót jégfürdőn állítottuk meg, és ezek után ötszörös

térfogat kloroform:metanol 2:1 (térfogat) oldattal (a kiindulási LPS oldatra viszonyítva) kivonatoltuk. A két fázist eredményező oldatot vortexeztük, és a fázisokat alacsony fordulatszámú centrifugálással elkülönítettük (500-1000 x g). Az alsó fázist kinyertük és nitrogén alatt bepároltuk, így nyers MLA-t nyertünk.

F. A 3-O-deacilezett-4'-monofoszforil lipid A előállítása (3D-MLA)

A nyers MLA-t kloroform:metanol 2:1 térfogatarányú elegyében feloldottuk körülbelül 1-5 mg/ml koncentráció-tartományban, és ebből az oldatból 3,0 ml-t 16 x 100 mm-es vizsgálati csövekbe juttattunk. A csőhöz további 0,4 ml metanolt adtunk és ezek után vízfürdőbe helyeztük 50 °C-ra 10 percig. A reakciót 40 µl 0,5 M KHCO_3 -mal, pH = 10,5, indítottuk meg, és a oldatot 20 percig 50 °C-on inkubáltuk. Ennek végén a csöveket a vízfürdéből kivettük és a reakciót 2,0 ml 0,1 N HCl (lehűtött) hozzáadásával leállítottuk, majd vortexeztük. A 3D-MLA-t 1,0 ml metanol adásával, vortexezéssel, centrifugálással (500-1000 x g), és az alsó (szerves) fázis nitrogén atmoszférában végzett szárításával kinyertük.

2. Példa

Analitikai módszerek

A. Az MLA és a rokon minták vékonyréteg kromatográfiáját (TLC) 5 x 10 cm lemezen hajtottuk végre, melyeket Silica Gel 60-nal (E Merck) rétegeztünk. A TLC-re általában 10 mg/ml oldatban

vittük fel a mintákat, kloroform:metanol 4:1 térfogatarányú oldatában, 3 µl mennyiségben (30 µg minta) ahol kapilláris pipettával kis cseppként vittük fel. A lemezeket a következő összetételű oldószer-rendszerben hívtuk elő: kloroform/metanol/víz/ammónium-hidroxid 50:31:6:2 (térfogat). Az előhívott lemezek csíkjaikat etanolos 10 % (vegyes%) foszformolibdénsav oldat szórásával tettük láthatóvá, majd 150-160 °C-on inkubáltuk. Néhány esetben a pontok viszonyított intenzitását denzitometriával mennyiségileg meghatároztuk (Shimadzu C59000U Dual Wavelength Flying Spot Scanner (Shimadzu Corp.), ahol a vizsgálati hullámhossz 520 nm.

B: Az MLA/3D-MLA analízise HPLC-vel

A mintákat először szabad sav formájúvá alakítottuk 5 ml 2:1 térfogatarányú kloroform:metanol oldatban 3-5 mg mintát felvéve, melyet 2 ml 0,1 N HCl oldattal mostunk. A kétfázisú rendszert vortexeltük, centrifugáltuk és az alsó (szerves) fázist vizsgálati csőbe átraktuk és nitrogénáramban elpárologtattuk. A maradékot ezek után diazometán kezeléssel metileztük. Röviden, az éteres diazometán oldatot úgy készítettük el, hogy 60-100 mg 1-metil-3-nitro-1-nitrozoguanidint (MNNG; Aldrich) egy 2 dram edénybe helyeztünk, kiegészítve 60 µl dietil-éterrel 1 mg MNNG-re nézve; ezután 1 mg MNNG-re viszonyítva 9 µl 5 N NaOH-t adtunk, miközben az oldatot <-10 °C-on kevertettük. A reakció befejeztét követően a citromsárga éteres fázist egy másik edénybe áthelyezve szárítottuk, melyben több szemcsés NaOH-t

helyeztünk el, és kevertettük, az összes folyamat $<-10^{\circ}\text{C}$ -on történt. A savval mosott mintákat 1 ml 4:1 térfogatarányú kloroform:metanolban oldottuk, és $<-10^{\circ}\text{C}$ -os fürdőbe helyeztük, és a diazometán oldatot cseppenként keverés közben adagoltuk, amíg a halvány sárga árnyalat látható volt. Az oldatot ezek után környezeti hőmérsékleten nitrogén áramban elpárologtattuk, és vákuumban legalább 30 percig tovább szárítottuk.

A kromatográfiás analíziseket C18 fordított fázisú oszlopon hajtottuk végre (Nova-Pak, 4 μm részecske méret, 8 mm x 10 cm [Waters]). A metilezett mintákat 4:1 térfogatarányú kloroform:metanolban feloldottuk 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ koncentrációban és 0,45 μm -es PTFE fecskendőszűrőn átengedtük. Tipikusan 20-25 μl injektálási térfogatot használtunk, majd az elúciót lineáris 20-80% izopropanol gradienssel végeztük, amit acetonitrilben oldottunk, 60 perc után az áramlási sebesség 2 ml/perc, a nyommonkövetés 210 nm-en történt.

C. A rokon LPS tartalom analízise HPLC-vel

Az LPS igen heterogén anyag, mivel a következő tényezőkben variabilitás figyelhető meg: 1) a cukormaradékok száma az O-atomon és a magrégióban, 2) a magrégióban és a lipid A foszfátjain a poláris szubsztitúciókban, és 3) a lipid A vázhoz kötött zsírsavak elhelyezkedésében. A variabilitás utóbbi forrása különösen a rokon 3D-MLA tartalomban fontos (MPL®). Az LPS hidrolízise MLA-vá és 3D-MLA-vá az O-antigén és a magrégiók variabilitását megszünteti, viszont további heterogenitáshoz

vezet, mivel az O-kötött zsírsavak szabálytalanul vesznek el. Ez az intakt LPS-ben megakadályozza az acilezési mintázat pontosan ismert elrendeződését. Ennek következtében egy olyan módszert fejlesztettünk ki, melyben a foszfátokat és a magrégiót gyenge körülmények között eltávolítjuk, mely az O-hoz kötött zsírsavak veszteséhez nem vezet. Az eredményül kapott defoszforilezett lipid A (zero foszforil lipid A, vagy ZPL) ezek után HPLC-vel analizálható, mely a kiindulási LPS acilezési mintázatának pontos megfelelőjét adja.

Az eljárást tipikusan a következőképpen hajtottuk végre. A 0,5-5,0 mg LPS mintákat 200 µl koncentrált hidrofluoridban 3-4 óráig 27 °C-on hidrolizáltuk. Ezt a reakciót szorosan zárt teflon csövekben és jól szellőző elszívófülkében kell elvégezni. A HF-et nitrogénáramban környezeti hőmérsékleten elpárologtattuk, és a hidrolizátumot ezek után 4:1 térfogatarányú kloroform:metanolban feloldottuk és 16x100 mm-es üveg kémcsőbe átraktuk, és az oldószert nitrogénáramban elpárologtattuk. A maradékot 1,0 ml 0,1 % trietilaminban felvettük, ultrahang-kádat használva, 1,0 ml 40 mM NaOAc-t adtunk hozzá, és 30-45 percre a csövet forró vízfürdőbe bemártottuk. A reakciót jégfürdőben állítottuk meg és a ZPL-t 5 ml 2:1 térfogatarányú kloroform:metanol kivonatolással kinyertük. A szerves fázist kis csavaros tetejű edénybe helyeztük és az oldószert nitrogén atmoszférában elpárologtattuk. A ZPL-ből származékot képeztünk 200 µl piridines 10 mg/mk O-(3,5-dinitrobenzil)hidroxilamin HCl adásával (Regis Technologies, Inc.) az edényt szorosan lezártuk, majd 60 °C-on 3 óráig inkubáltuk. A

piridint nitrogénnel elpárologtattuk, és a maradékot vákuumban több mint 30 percig tovább szárítottuk. A maradékot ezek után 500 µl 2:1 térfogatarányú kloroform:metanolban felvettük és 0,5-1,0 ml-t Accell-QMA (acetate form; Waters) ágyra vittünk fel, melyet előzőleg azonos oldószerrel egyensúlyba hoztunk. Az oszlopot összesen 2:1 térfogatarányú 5 ml kloroform:metanol elegyével kis részletekben öblítettük, és az eluátumot 16 x 100 mm-es kémcsőben gyűjtöttük. Az eluátumhoz 2,0 ml 0,1 N HCl-t adtunk, a kétfázisú rendszert vortexeltük, rövid ideig 500-1000 g-vel centrifugáltuk, és az alsó (szerves) fázist másik vizsgálati csőbe áthelyeztük és nitrogén alatt elpárologtattuk. A maradékot 100-300 µl kloroform:metanol 4:1 térfogatarányú elegyében feloldottuk és 0,45 µm PTFE fecskendőszűrőn átengedtük. A szűrőt kétszer kloroform:metanol 4:1 térfogatarányú elegyével mostuk és a szűrletet nitrogén alatt elpárologtattuk. A szűrletet végül 50-150 µl kloroform:metanol 4:1 térfogatarányú elegyében felvettük és HPLC analízishez automatikus injektorba töltöttük. A HPLC körülmények a következők: C18 fordított fázisú oszlop (például Waters), 10 µl injektálási térfogat, 20-80 % lineáris izopropanol gradiens, melyet acetonitrilben készítettünk el, 60 percig, áramlási sebesség 2 ml/perc, a nyommonkövetés 254 nm-en.

3. Példa

A különböző ideig tenyésztett tenyészetek rokon MLA-3D-MLA összetételeinek összehasonlítása

A következő paraméterekkel sorozat fermentálásokat végeztünk: 2,0 liter M9 táptalaj (kiindulás pH = 6,84-6,87), 2 liter/perc levegő áramlás, keverés 50 rpm-mel, tenyésztési hőmérséklet 37 °C-on, a pH-t nem szabályoztuk. A tenyészeteket az 590 nm-en optikai denzitás mérésével követtük nyomon, és akkor állítottuk meg, amikor a kívánt növekedési állapotot elértük. A sejteket a fentiekben leírtaknak megfelelően előkészítettük és kivonatoltuk, így LPS mintákat nyertünk, melyeket ezek után MLA-ra és 3D-MLA-ra hidrolizáltunk, majd HPLC-vel analizáltuk (lásd az 1. és a 2. példát). Az eredményeket az 1. táblázatban adtuk meg.

1. Táblázat

A tenyészetekből különböző időben gyűjtött sejtekből nyert rokon
MLA és 3D-MLA összetételek adatai

Te-	Leírás	Tenyé-	Idő	MLA		3D-
				a 3-O-	hepta-	MLA
nyész-		szet	stac.	deaci-	acil	3-O-
tés		kora	fá-	lezett		deaci-
		begyűj-	zisban	hexaacil		hexa-
		téskor				acil
A	Késői ex-	6,75 óra	N/A	12,4 %	12,2 %	9,9 %
	ponenci-					
	ális					

B	Korai stationer fázis	9,5 óra	~0,5 óra	9,2 %	6,8 %	9,2 %
C	Késői stationer fázis	15 óra	~6 óra	19,5 %	13,2 %	21,5 %

Az adatok azt mutatják, hogy *S. minnesota* R595 tenyészetei a stationer fázis alatt LPS acilezési mintázatukat megváltoztatják, melynek eredményeként a 3-O-deacilezett hexaacil plusz heptaacil típusok az ebből az LPS-ből származó MLA-ban megnőnek, ennek következtében a 3-O-deacilezett hexaacil típusok mennyisége az ebből a MLA-ból izolált 3D-MLA-ban megnő.

4. Példa

A különböző idejű tenyészetekből nyert rokon LPS összetételek összehasonlítása:

A következő paraméterekkel sorozat fermentálásokat végeztünk: 2,0 liter M9 táptalaj (kiindulás pH = 6,84-6,87), 2 liter/perc levegő áramlás, keverés 50 rpm-mel, tenyésztési hőmérséklet 37 °C-on, a pH-t nem szabályoztuk. A tenyészeteket az optikai denzitás 590 nm-en végzett mérésével követtük nyomon. A sejteket az 1. példában leírtaknak megfelelően előkészítettük és kivonatoltuk. Az LPS mintákat MLA-ra és 3D-MLA-ra hidrolizáltuk, és HPLC-vel analizáltuk (lásd az 1. és a 2. példákat). Az eredményeket a 2. táblázatban összegeztük.

2. Táblázat

A különböző ideig tenyésztett sejtekből nyert rokon LPS
összetételek adatai

Fermen- táció	Leírás	Tenyé- szet	Idő	Rokon tartalom		
				a 3-O-acil hexaacil	3-O- deaci- lezett hexaacil	hepta- acil
		kora	fázis- ban			
		begyűj- téskor				
A	Korai	9 óra	~0,5 óra	76 %	0 %	24 %
	stacioner					
	fázis					
B	Késői	15 óra	~6 óra	48 %	17 %	19 %
	stacioner					
	fázis					

A korai stacioner fázisú sejtekből (A fermentáció) nyert LPS-ben 3-O-deacilezett hexaacil komponenst nem tudtunk kimutatni. Így az ebből az LPS-ből nyert 3D-MLA-ban az egyedüli rokon hexaacil forrás a heptaacilezett anyag lehet (24 %). Ezzel szemben a késői stacioner fázisból gyűjtött sejtekből az LPS mind heptaacilokat, mind 3-O-deacilezett hexaacilokat tartalmazott (19 %, illetőleg 17 %). Mindkét fajta a 3D-MLA-ban, melyet az LPS-ből állítottunk elő, hozzájárult a hexaacil (MPLC) tartalomhoz. Nem

vártuk, hogy a sejtek 3-O-deacilezett hexaacil LPS fajtaikat termelnek bizonyos körülmények között.

5. Példa

Az elő-kivonatolási hőmérséklet hatása a *Salmonella minnesota* R595 LPS tisztaságára:

A *Salmonella minnesota* sejteket 80 literes fermentorban növesztettük (New Brunswick Scientific), az 1. példában leírtaknak megfelelő körülmények között. A sejteket tangenciális áramlási szűrőssel koncentráltuk, de nem centrifugáltuk, és az üledék milliliterenként 51,5 mg száraz sejttömeget tartalmazott. Három oldatot készítettünk, melyekben 150 ml-150 ml sejt-szuszpenziót 600 ml etanollal kombináltunk. Az etanolos oldatokat 1 óráig 22 °C-on, 37 °C-on, és 50 °C-on kevertettük és szűrtük. A sejteket másodszor is etanolos kivonatolásnak vetettük alá, azonos körülmények közt mint az elsőben, azzal az eltéréssel, hogy 95 %-os etanolt használtunk. A sejtek vákuum-szűrőssel nyertük ki és ezek után egy éjszakán át kloroform:metanol 4:1 térfogatarányú elegyével 50 °C-on kivonatoltuk. Az oldatokat szűrtük, és a szűrleteket forgós bepárlóval szárazra bepároltuk, így LPS készítményeket kaptunk. Az első és a második etanolos kivonatolás szűrleteinek mintáit mindegyik hőmérsékleten kinyertük, valamint a 2. példában leírtak alapján az elő-kivonatolt sejtekből nyert LPS-t vékonyréteg kromatográfiával analizáltuk. A TLC lemezek képeit az 1. ábrán mutattuk be.

Az 1. ábra az etanolos kivonatok TLC lemezeit, és a különböző hőmérsékleten végzett etanolos kivonatolásokkal kapott LPS mintákat mutatja be. A bal oldalon lévő lemez balról jobbra a következőket mutatja be: az etanolos kivonatolás 22 °C-on, 37 °C-on és 50 °C-on. A távolabbi jobb oldali minta az eredeti LPS minta. A jobb oldalon lévő lemez az egyes előállításokkor kapott LPS-eket mutatja be. A 3., 4., és 5. vonal a 22 °C-on, 37 °C-on, illetőleg 50 °C-on elő-kivonatolt sejtekből nyert LPS-t mutatja be. Az erős csíkok $R_f=0,6$ értéknél a foszfolipid és zsírsav szennyeződések mutatják. Ezen szennyezések mértéke az etanolos kivonatolás hőmérsékletének növelésével csökken, és igen alacsony az 50 °C-on végzett előkezelés után.

Az 1. ábrán bemutatott TLC lemezek alapján látható, hogy az etanolos elő-kivonatolás magas hőmérsékleten azon szennyezések eltávolításában hatásos, melyek egyébként a kloroform:metanol 4:1 térfogatarányú elegyével együtt extrahálódnak. Az elő-kivonatolás 50 °C-on ezen szennyezésektől nagymértékben mentes.

6. Példa

Az etanolos elő-kivonatolással, vagy az etanolos elő-kivonatolás nélkül nyert LPS-ek összehasonlítása

A *Salmonella minnesota* R595 sejtjeinek három adagját 750 ml-es fermentorban növesztettük (B. Braun), lényegében az 1. példában körvonalazottak alapján. A sejteket tangenciális áramlási szűréssel összegyűjtöttük, és a sejtszuszpenziók mintáit

liofileztük. A sejtek nagy részét 1 óráig két etanolos elő-kivonatolásnak vetettük alá 50 °C-on. A kivonatolások között a sejteket tangenciális áramlási szűréssel összegyűjtöttük. A sejteket ezek után egy éjszakán át kloroform:metanol 4:1 térfogatarányú elegyével kivonatoltuk refluxálással. A kivonatot tangenciális áramlási szűréssel kinyertük és szárazra bepároltuk. A liofilezett sejt mintákat egy éjszakán át kloroform:metanol 4:1 térfogatarányú elegyével kivonatoltuk refluxálással, és az oldatokat szűrtük, majd a szűrleteket szárazra pároltuk. A kapott LPS mintákat etanolos kivonatolással, vagy anélkül, TLC-vel analizáltuk, lényegében a 2. példában leírtaknak megfelelően. A TLC lemezeket körülbelül $R_f = 0,01 - 0,90$ értékek között vizsgáltuk, és az LPS régióban ($R_f = 0,01-0,20$) az intenzitások arányát kiszámoltuk minden mintára. Az eredményeket a 3. táblázatban mutatjuk be.

3. Táblázat

Az LPS tisztasága etanolosan elő-kivonatolt vagy azzal nem kivonatolt sejteknél

		Az LPS régióban a teljes intenzitás százaléka		
Fermentáció	Az adag száma	etanolos	elő-etanolos	elő-kivonatolással kivonatolás nélkül
	száma			
A	48020-B2698C	7		86

B	48020-C0598A	11	83
C	48020-C0598B	14	88

Megjegyzés:

Az LPS régióban a teljes intenzitás = [(intenzitás a $R_f = 0,01-0,20$ régióban)/(intenzitás az $R_f = 0,01-0,90$ régióban)] x 100.

A 3. táblázatban feltüntetett eredmények azt mutatják, hogy a *Salmonella minnesota* R595 sejtekből elő-kivonatolással nyert LPS (90 % etanol 50 °C-on) alapvetően tisztább, mint az elő-kivonatolás nélkül a sejtekből nyert anyag.

Az itt közzétett és igényelt összes eljárás a jelen találmány fényében felesleges kísérletezés nélkül megvalósítható. Miközben a jelen találmány összetételeit és eljárásait az itt leírt, előnyben részesített megvalósítási formákon keresztül írtuk le, a szakirodalomban jártas szakemberek számára nyilvánvaló, hogy az egyes lépésekben vagy azok sorrendjében változtatások tehetők, anélkül, hogy ezzel a jelen találmány koncepciójától, szellemétől és oltalmi körétől eltérnénk. Részletesebben, a szakirodalomban jártas szakemberek számára nyilvánvaló, hogy bizonyos szerek, melyek mind kémiai, mind fiziológiásan rokonok, az itt leírt szerekkel kicserélhetők, miközben azonos vagy hasonló eredményeket érhetünk el. Az összes ilyen helyettesítő anyag vagy módosítás a szakirodalomban jártas szakemberek számára nyilvánvaló, ezért ezek a jelen találmány szellemének, oltalmi körének és koncepciójának megfelelnek, ahogy azt a csatolt igénypontokban meghatároztuk.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás lipopoliszacharid összetétel (LPS) előállítására, azzal jellemezve, hogy a következő lépéseket alkalmazzuk:

- (a) a deep rough mutáns bakteriális törzs táptalajban történő növesztése;
- (b) a tenyészet stacioner fázisának fenntartása legalább körülbelül 5 óráig;
- (c) a tenyészetből a sejtek összegyűjtése; és
- (d) a sejtekből az LPS kivonatolása.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a deep rough mutáns bakteriális törzs a *Salmonella* nemzetségbe tartozik.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a deep rough mutáns bakteriális törzs a *Salmonella* nemzetség *Salmonella minnesota* faja.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a *Salmonella minnesota* deep rough mutáns bakteriális törzse a *Salmonella minnesota* R595.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a táptalaj M9.

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a fenntartást körülbelül 5-6 óráig végezzük.

7. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az LPS-t olyan 3D-MLA előállításához használhatjuk, mely legalább körülbelül 20 mol% rokon hexaacilcsoportot tartalmaz.

8. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a 3D-MLA kialakítása érdekében a fentiekén kívül az LPS-t sorrendben savas és lúgos hidrolízisnek vetjük alá.

9. Az 1. igénypont szerinti eljárással készített LPS.

10. A 8. igénypont szerinti eljárással előállított 3D-MLA.

11. Eljárás lipopoliszacharid (LPS) kivonatolására a deep rough mutáns bakteriális törzs sejtjeinek tenyészetéből, azzal jellemezve, hogy a következő lépéseket alkalmazzuk:

- (a) a sejtek kivonatolása olyan oldattal, mely lényegében legalább körülbelül 75 tömeg% alifás alkoholból áll, mely legalább 1-4 szénatomos, valamint kiegészítésként vízből, ezzel a csökkentett foszfolipid tartalmú sejteket állíthatunk elő, ahol a kivonatolást körülbelül 45-55 °C-on végezzük;
- (b) a csökkentett foszfolipid tartalmú sejtek kivonatolása kloroformot és metanolt tartalmazó oldattal, így az LPS-t a kloroform metanol oldatban biztosítjuk.

12. A 11. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a deep rough mutáns bakteriális törzs a *Salmonella* vagy az *Escherichia* nemzetségbe tartozik.

13. A 12. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a deep rough mutáns bakteriális törzs a *Salmonella* nemzetség *Salmonella minnesota* faja.

14. A 13. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a *Salmonella minnesota* deep rough mutáns bakteriális törzse a *Salmonella minnesota* R595.

15. A 12. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a *Escherichia* nemzetség deep rough mutáns bakteriális törzse az *Escherichia coli*.

16. A 15. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a *Escherichia* nemzetség deep rough mutáns bakteriális törzse az *Escherichia coli* D31m4.

17. A 11. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az alifás alkohol 2-4 szénatomos.

18. A 17. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az alifás alkohol etanol.

19. A 11. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az oldat körülbelül 85-95 tömeg% alifás alkoholt tartalmaz.

20. A 11. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a fentieken kívül az eljárás az LPS oldatból a kloroform és a metanol elpárologtatását is magában foglalja, így száraz LPS-t nyerhetünk.

21. A 220 igénypont szerinti eljárást, azzal jellemezve, hogy a fentieken kívül az LPS-t egymás után savas és lúgos hidrolízisnek vetjük alá, mellyel 3D-MLA-t állítunk elő.

22. A 20. igénypont szerinti eljárással készített LPS.

23. A 21. igénypont szerinti eljárással előállított 3D-MLA.

A meghatalmazott

Dr. Szentpéteri Ádám
szabadsági ügyvéd
SBGK Szabadsági Ügyvédi Iroda
H-1052 Budapest, Városház tér 113.
Telefon: 461-1000 Fax: 461-1009
Email: szentpeteri@sbgk.hu

1. ÁBRA

