



Assinado
Digitalmente

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 0303416-0

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 0303416-0

(22) Data do Depósito: 21/08/2003

(43) Data da Publicação do Pedido: 10/05/2005

(51) Classificação Internacional: A61K 39/10; A61P 31/04; C08B 37/00.

(54) Título: PROCESSOS DE OBTENÇÃO DO LIPOPOLISSACARÍDEO DE BORDETELLA PERTUSSIS E DE OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DO LIPÍDEO-A MONOFOSFORILADO DE BORDETELLA PERTUSSIS, USO DO LIPÍDEO-A MONOFOSFORILADO DE BORDETELLA PERTUSSIS E VACINAS

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO - UNIFESP. CGC/CPF: 60453032000174. Endereço: RUA BOTUCATU, 740 VILA CLEMENTINO, SP, BRASIL(BR), 04023-090; UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP. CGC/CPF: 63025530000104. Endereço: Rua da Reitoria, 109 - Cidade Universitária "Dr. Armando de Salles de Oliveira", Butantan, SP, BRASIL(BR), 04023-900; FUNDAÇÃO BUTANTAN. CGC/CPF: 61189445000156. Endereço: Avenida Vital Brasil, 1500, SP, BRASIL(BR), 05503-900

(72) Inventor: IGOR CORREIA DE ALMEIDA; LUIZ RODOLPHO RAJA GABAGLIA TRAVASSOS; ISAIAS RAW.

Prazo de Validade: 10 (dez) anos contados a partir de 17/09/2019, observadas as condições legais

Expedida em: 17/09/2019

Assinado digitalmente por:

Liane Elizabeth Caldeira Lage

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

“PROCESSOS DE OBTENÇÃO DO LIPOPOLISSACÁRÍDEO DE
BORDETELLA PERTUSSIS E DE OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DO
LIPÍDEO-A MONOFOSFORILADO DE *BORDETELLA PERTUSSIS*, USO
DO LIPÍDEO-A MONOFOSFORILADO DE *BORDETELLA PERTUSSIS* E
5 VACINAS”.

Este invento relaciona-se a área de adjuvantes purificados de
bactérias Gram-negativas e utilizados em imunizações e vacinações
experimentais, veterinárias e humanas.

ESTADO DA TÉCNICA

10 *O que são adjuvantes e como funcionam*

O adjuvante tem a função principal de estimular a resposta
imune contra determinado antígeno, durante a imunização experimental ou
clínica (humana e veterinária). De fato, qualquer molécula ou composto que
seja capaz de favorecer ou amplificar uma série de eventos imunológicos que
15 leve a uma resposta imunológica favorável, pode ser considerado um
adjuvante (Schijns, 2000).

Os materiais ou compostos utilizados como adjuvantes têm
origens diversas, tais como mineral, lipídica ou proteica. Durante os últimos
70 anos, muitos adjuvantes têm sido desenvolvidos, porém poucos deles têm
20 sido avaliados em ensaios de imunização ou vacinação clínica. Com exceção
do hidróxido de alumínio, que é o único usado em vacinas em humanos desde
1940, nenhum outro adjuvante tem sido usado rotineiramente em vacinação
humana. A não-utilização de novos adjuvantes é devida a alguns fatores,
dentre eles a toxicidade e efeitos colaterais de certos adjuvantes em testes
25 clínicos, e o seu alto custo (Gupta e Siber, 1995).

A potencialização da resposta imune experimental *in vivo* é
tipicamente realizada com a administração do antígeno na presença de um
adjuvante, tal como adjuvante de Freund (Freund e McDermott, 1942). Os
adjuvantes agem sobre o sistema imune de diferentes maneiras. Alguns

adjuvantes, por exemplo, ajudam a formar e manter depósitos do antígeno em tecidos periféricos do animal, tais como tecido subcutâneo. Com isto o antígeno é liberado ou apresentado lentamente às células apresentadoras de antígeno (*antigen presenting cells*, APCs), principalmente macrófagos e células dendríticas (DCs), que possuem receptores específicos envolvidos na resposta imune inata contra diferentes antígenos e patógenos. A estimulação de macrófagos e DCs induz, conseqüentemente, a retenção e ativação de linfócitos (T e B) e linfonodos, componentes essenciais na resposta imune efetiva contra um determinado antígeno (Schijns, 2000; Hunter, 2002). Outros adjuvantes agem estimulando diretamente o sistema imune inato.

Uma resposta imune eficiente ou produtiva é definida pela geração de linfócitos T e B antígeno-específicos. Isto requer, inicialmente, a apresentação dos antígenos a receptores específicos de células T (TCRs), presentes em linfócitos T imaturos (*naive*), ou a imunoglobulinas expostas na superfície de linfócitos B. Além disso, citocinas produzidas pelas APCs desempenham um papel fundamental na estimulação de células T *helper*. Estas células vão, subseqüentemente, auxiliar linfócitos B e linfócitos T citotóxicos (CTLs), gerando uma resposta imune específica contra determinado antígeno. Pouco é conhecido a respeito dos mecanismos exatos pelos quais os adjuvantes modulam essa resposta adaptativa ou secundária complexa. No entanto, sabe-se que os adjuvantes estão envolvidos primordialmente na resposta imune primária ou inata, que vai direcionar a resposta imune adaptativa, dada por linfócitos T e B (Schijns, 2000; Bendelac e Medzhitov, 2002).

A administração de um antígeno isolado, em uma única dose, sem a presença de um adjuvante, em geral induz pouca ou nenhuma resposta imune específica, avaliada pelos níveis de anticorpos produzidos. Em geral, são necessárias injeções adicionais do antígeno para que seja observada uma resposta imune significativa. Isto ocorre pelo fato de que antígenos

comumente só são encontrados em linfonodos após a formação de anticorpos e, conseqüentemente, após o aprisionamento de complexos imunes formados (Hunter *et al.*, 1998; Hunter, 2002). Vários adjuvantes têm sido usados em animais experimentais, e os resultados têm demonstrado que eles possuem grande influência qualitativa e quantitativa na resposta imune contra determinado antígeno ou imunógeno. O nível de anticorpos e a duração da resposta imune aumentam consideravelmente na presença de um adjuvante. Porém, alguns bons adjuvantes (*e.g.* lipopolissacarídeo bacteriano, ou LPS) apresentam efeitos tóxicos (pirogenicidade e reação de Schwartzman) e, portanto, não são aceitos para uso em humanos na vacinação rotineira. No caso do LPS, a sua toxicidade pode ser atenuada pelo uso do lipídeo A monofosforilado (MPL ou MPLA), a porção do LPS que fica inserida na membrana lipídica mais externa da parede da bactéria Gram-negativa. O MPLA é capaz de manter a atividade imunoestimuladora sem possuir a toxicidade do LPS, estimulando tanto a resposta imune humoral como a celular. Em camundongos, o MPLA é um potente adjuvante para antígenos proteicos, favorecendo o desenvolvimento das células *T-helper* (Th) do tipo 1, como a produção de citocinas próinflamatórias IL-2 e IFN- γ , e anticorpos IgG isotipo 2a (Ulrich e Myers, 1995; De Becker, 2000).

O mecanismo fundamental de ação do adjuvante é a estimulação de células do sistema imune que secretam citocinas moduladoras da resposta imune inata (*e.g.* IL-12, TNF- α , IL-2, IFN- γ). Porém, estas citocinas podem induzir efeitos colaterais ou deletérios, dependendo do tipo e quantidade de citocinas liberadas. Usualmente, a relação entre toxicidade e adjuvanticidade é aceita pela análise do custo-benefício. Por exemplo, para a rotina de vacinas infantis há uma grande preocupação quanto à sua segurança, pois elas são aplicadas geralmente em crianças saudáveis. Para se introduzir um adjuvante na imunização de crianças e adultos saudáveis, a taxa de efeitos colaterais desfavoráveis tem que ser, obrigatoriamente, muito baixa. Por outro

lado, em grupos de alto risco, como pacientes com câncer ou aids, as vacinas terapêuticas podem ter certo nível de toxicidade aceitável em vista de seus potenciais benefícios (Gupta e Siber, 1995; Schijns, 2000).

A imunidade inata é a primeira linha de defesa contra o crescimento e disseminação de um microorganismo (bactéria, fungo ou vírus) na fase aguda de uma infecção. A principal função da imunidade inata é a resposta de células fagocitárias, tais como macrófagos, neutrófilos e DCs. Considerando-se que o papel primário destas células era o de fagocitar patógenos de maneira não-específica e, após digestão destes, apresentação de seus antígenos para as células T. Esta resposta foi chamada de resposta imunológica não-específica.

Recentemente, a identificação dos receptores do tipo Toll (*Toll-like receptors*, TLRs) mudou esta noção. Sabe-se hoje que o sistema imune inato pode reconhecer 'padrões moleculares associados aos patógenos' (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs), através dos TLRs presentes na superfície das células imunes, principalmente macrófagos e DCs. O reconhecimento de patógenos invasores ativa a produção de citocinas pró-inflamatórias e aumenta a regulação de moléculas co-estimuladoras em fagócitos, ativando assim as células T (Takeda *et al.*, 2003). Em humanos, os TLRs constituem uma família de 10 membros (TLR1-TLR10). O primeiro TLR de mamíferos a ser identificado foi o TLR4, que mostrou estar envolvido no reconhecimento de LPS bacteriano, levando à produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e moléculas co-estimulatórias (Medzhitov *et al.*, 1997; Poltorak *et al.*, 1998; Qureshi *et al.*, 1999; Hoshino *et al.*, 1999). Os demais TLRs estão envolvidos com o reconhecimento de outras classes de moléculas microbianas, por exemplo, lipoproteínas, lipopeptídeos, ácido lipoteicoico e peptidoglicanos de bactérias Gram-positivas; lipoarabinomananas de micobactérias; e glicosilfosfatidilinositóis (GPIs) de *Trypanosoma cruzi* reconhecem o TLR2. Por outro lado, RNA viral de dupla-

fitas, e flagelina bacteriana e CpG DNA bacterianos reconhecem TLR3, TLR5 e TLR9, respectivamente (Takeda *et al.*, 2003).

O primeiro passo para interação *in vivo* entre LPS e TLR4, ocorre quando o LPS liga-se à proteína ligante de LPS (*LPS-binding protein*, LBP), presente no plasma. O complexo LPS-LBP subsequentemente interage com o CD14, preferencialmente expressa na superfície em macrófagos e neutrófilos. O complexo LPS-LPB-CD14 formado interage, assim, com o TLR4, através de um mecanismo ainda pouco esclarecido. A ativação de TLR4 em macrófagos desencadeia uma cascata de eventos intracelulares, que envolve inúmeras proteína-quinases e proteínas adaptoras e acessórias. O passo final do processo é a translocação do fator nuclear NF- κ B para dentro do núcleo, onde ele então ativa a transcrição de vários genes envolvidos com resposta imune, particularmente genes de citocinas (*e.g.* IL-2, IL-12, TNF- α , IFN- γ). A maioria dos LPSs bacterianos é capaz de ativar exclusivamente TLR4, no entanto, LPSs de *Leptospira interrogans* e *Porphiromonas gingivalis* ativam outro tipo de TLR, o TLR2. Estes LPSs possuem uma estrutura diferente dos LPSs que ativam TLR4, particularmente na porção do lipídeo A (Akira e Hemmi, 2003).

Propriedades de um adjuvante ideal e dificuldades no seu desenvolvimento

Desde a descoberta da ação dos adjuvantes, é de grande interesse o seu uso, em particular, na vacinação de crianças. Edelman (1992) listou alguns critérios para avaliação de um adjuvante para sua utilização em vacinas humanas. Segundo este autor deve-se avaliar, principalmente: i) a reatividade local; ii) a reatividade sistêmica (toxicidade e pirogenicidade); iii) a capacidade de induzir doenças ou síndromes autoimunes; iv) as reações de hipersensibilidade; v) a carcinogenicidade; e vi) a teratogenicidade do adjuvante. Uma vez que estes parâmetros mostrem-se aceitáveis, e é definida a estrutura química do adjuvante, sua produção passa a ser possível de forma consistente.

Na presença de adjuvante, mesmo antígenos de baixa imunogenicidade, tais como conjugados de polissacarídeo e proteína, em baixas doses e com poucas injeções, podem induzir uma resposta imune adequada. O adjuvante tem que ser eficiente em crianças, principalmente em recém-nascidos, para produzir uma resposta mais persistente de alta qualidade (anticorpos de alta afinidade e do isotipo IgG). Ainda, o adjuvante tem que ser estável, considerando a sua adjuvantividade e toxicidade, e não apresentar interação com o antígeno, e ser biodegradável e não-imunogênico (Gupta e Siber, 1995).

As dificuldades encontradas no desenvolvimento de adjuvantes para uso humano têm sido, em parte, resolvidas nos últimos anos, particularmente devido à compreensão das bases moleculares e da ação dos adjuvantes, da função das citocinas e dos diferentes tipos de células envolvidas na resposta imune. O conhecimento da ação adjuvante é muito importante, principalmente devido à nova geração de vacinas formadas por subunidades, moléculas purificadas e vacinas sintéticas, necessitando, portanto de adjuvantes muito potentes (Gupta e Siber, 1995; Schijns, 2000).

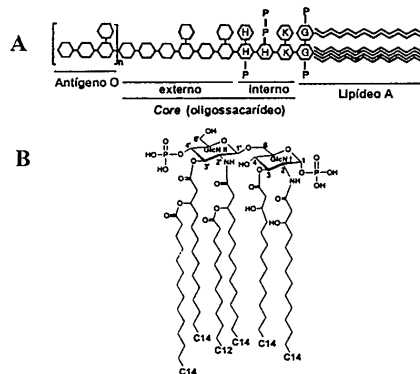
Apesar do desenvolvimento de muitos adjuvantes potentes, formulados nos últimos 70 anos, o hidróxido de alumínio ainda é o único adjuvante usado na rotina de vacinação de humanos. Uma das maiores dificuldades encontradas no desenvolvimento de outros adjuvantes para a uso em humanos consiste nas reações desfavoráveis (pirogenicidade, choque, etc.). Por exemplo, o LPS bacteriano é, em geral, um excelente adjuvante experimental, porém os seus efeitos tóxicos têm sido um impedimento para o seu uso clínico. A eficiência do LPS como adjuvante foi descrito pela primeira vez em 1956 (Johnson *et al.*, 1956), quando foi demonstrado que uma bactéria Gram-negativa (*S. typhosa*), ou antígenos proteicos deste organismo tinham um efeito adjuvante bastante eficaz. Muitas das atividades biológicas do LPS, incluindo adjuvantividade e toxicidade, são localizadas na região da molécula conhecida como lipídeo A. No entanto, o lipídeo A possui

a vantagem de apresentar nenhum ou pouco efeito colateral quando comparado ao LPS intacto. Ainda, o lipídeo A apresenta uma potente adjuvanticidade com conjugados polissacarídeo-proteína, para ambas as respostas imunes, primária e secundária, induzindo também o aumento da resposta do tipo Th1 em camundongos.

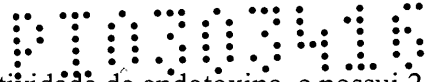
O LPS de bactérias Gram-negativas

O LPS ou endotoxina é o componente encontrado em maior quantidade na membrana mais externa da parede celular de bactérias Gram-negativas. O LPS é um potente ativador de células imunes envolvidas com a inflamação, como por exemplo, macrófagos. No início do século passado, foi demonstrado que a endotoxina consiste de lipídeos e carboidratos, originando, então o nome de lipopolissacarídeo. A primeira tentativa de se demonstrar a estrutura da molécula foi realizada em 1950, por Luderitz e Westphal, que trataram o LPS com ácido, o que ocasionou a liberação de carboidrato e da parte terminal lipídica da molécula (Luderitz *et al.*, 1982).

O LPS é composto basicamente por três regiões: uma externa, mais exposta ao meio extracelular, conhecida como antígeno ou polissacarídeo O; uma intermediária, conhecida como oligossacarídeo ou *core*; e uma que fica inserida à membrana plasmática externa da bactéria, conhecida como lipídeo A (**Estrutura 1A**).



Estrutura 1: Estrutura do LPS de *E. coli*. (A) O LPS pode ser dividido em 3 domínios ou regiões: antígeno O, *core* (externo e interno) e



lipídeo A. A região do lipídeo A contém a atividade de endotoxina, e possui 2
resíduos de GlcN-fosfato(P) (G-P), as quais estão ligadas, diretamente ou
indiretamente, cadeias ácidos graxos (C14:0 e C12:0). A região do *core*
interno consiste de ácido 3-deoxi-D-mano-octulosônico (KDO, K) e L-
5 glicero-D-mano-heptose (H). Hexágonos representam hexoses. (B) Estrutura
do lipídeo A de *E. coli*. Figura (A) modificada de Esko (1999), previamente
adaptada de Holst *et al.* (1996).

A alta variabilidade observada na região do antígeno-O é
responsável pela especificidade sorológica dos diferentes tipos de LPS. O
10 antígeno-O é também reconhecido pela sua atividade sobre o sistema imune
inato do sistema imunológico, desempenhando ambas as funções de ativar e
inibir o sistema complemento. A região *core*, ao contrário da antígeno-O, é
altamente conservada entre diferentes espécies de bactérias (Wilkinson,
1996). A parte mais interna do *core* (*inner core*) está mais próxima do lipídeo
15 A e contém uma alta proporção de açúcares não-convencionais, como o ácido
3-deoxi-D-mano-octulosônico (KDO) e L-glicero-D-mano-heptose (Hep ou
H). A região *core* mais externa (*outer core*) é mais longa e consiste de
açúcares mais comuns, como hexoses (*e.g.* glucose, galactose, manose) e
hexosaminas (*e.g.* *N*-acetil-glucosamina, *N*-acetil-galactosamina). Estes
20 açúcares estão ligados a repetições de subunidades sacarídicas, que
constituem o polissacarídeo O, cadeia O ou antígeno O, que é composto
tipicamente por hexoses. Quando o antígeno O é formado por
oligossacarídeos, ele recebe o nome de lipo-oligossacarídeo (LOS)
(Wilkinson, 1996).

25 O lipídeo A é uma região altamente hidrofóbica, ligada
covalentemente à região *core* da molécula de LPS (**Estrutura 1A**). A
estrutura do lipídeo A é tipicamente composta pelo dissacarídeo β -D-GlcN-(1-
6)- α -D-GlcN, que pode ter um grupo ou dois grupos fosfato, nas posições 1 e
ou 4' (**Estrutura 1B**). Ambos grupos fosfatos podem ser substituídos por

grupos como etanolamina-fosfato (EtNP), etanolamina-difosfato (EtNDP), GlcN, 4-amino-4-deoxi-L-arabinopiranosose e D-arabinofuranose. Em algumas bactérias (e.g. de *Brucella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Legionella* spp.), um ou os dois resíduos de GlcN do lipídeo A podem ser substituídos por 2,3-diamino-2,3-dideoxi-D-glucose (GlcN3N). Ao dissacarídeo de GlcN (ou de GlcN3N ou GlcN-GlcN3N) estão diretamente ligadas até quatro cadeias de ácidos graxos, nos carbonos 2, 3, 2' e 3' (**Estrutura 1B**). A ordem, o número, o tamanho e a quantidade de insaturações destas cadeias lipídicas muda conforme a espécie e cepa de bactéria, porém essa região do LPS é considerada ainda a mais conservada da molécula (Wilkinson, 1996).

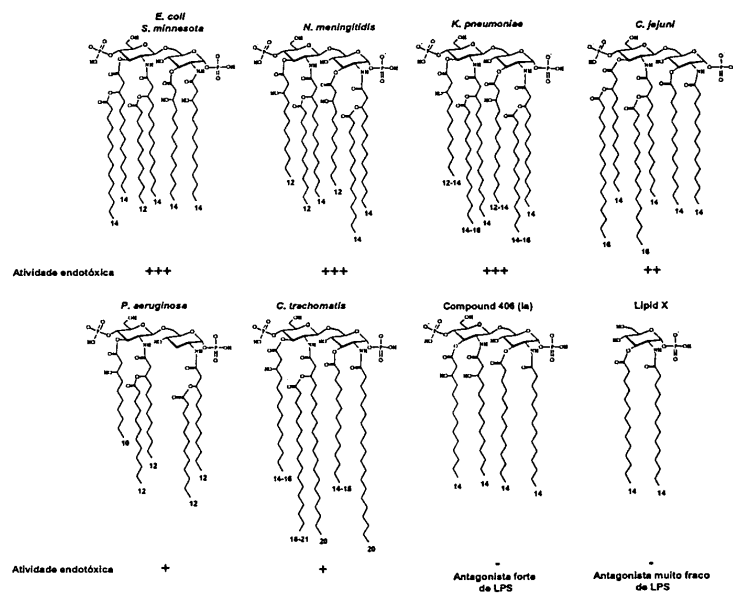
Lipídeo A: estrutura e atividade endotóxica

Em 1954, foi demonstrado que a parte lipídica do LPS, mais conhecida como lipídeo A, era responsável pela atividade endotóxica da molécula (Westphal e Luderitz, 1954). Somente em 1980, quando finalmente foi sintetizado, comprovou-se que o lipídeo A era o centro da endotoxicidade do LPS (Westphal *et al.*, 1981; Luderitz *et al.*, 1982). Pelo fato de o lipídeo A ser a estrutura responsável pela atividade endotóxica do LPS, inúmeros esforços têm sido empreendidos objetivando a sua síntese química, com o propósito de se entender como modificações da sua estrutura química podem afetar a sua atividade. Como discutido anteriormente, a estrutura do lipídeo A é caracterizada por porção conservada constituída de um dissacarídeo de D-GlcN unido por um ligação $\beta(1-6)$. A esta unidade estão ligados diferentes cadeias aciladas, grupos fosfatos e outros grupos substituintes menos frequentes estão ligados. Lipídeos A e seus fragmentos, com diferentes graus de acilação e fosforilação, têm sido sintetizados e testados biologicamente, contribuindo para o entendimento da relação estrutura e função imunológica (Erridge *et al.*, 2002). Foi observado que a quantidade de cadeias acila e grupos fosfato ligados ao dissacarídeo de D-GlcN é, principalmente, fator principal responsável pela endotoxidade. Por exemplo, lipídeos A contendo

um grupo fosfato tanto na posição 1 ou 4', são em torno de 1000 vezes menos potentes do que o lipídeo A de *E. coli*, contendo 2 grupos fosfatos (Rietschel *et al.*, 1987).

34

Preparações do monossacarídeo D-GlcN fosforilado e acilado em várias posições não possuem atividade, o que sugere que a unidade dissacarídica é essencial para o reconhecimento por receptores celular e humoral. Por outro lado, lipídeo A contendo na unidade dissacarídica um resíduo D-GlcN3N no lugar de D-GlcN, como é o caso de *Campylobacter jejuni*, tem atividade endotóxica similar a lipídeos A contendo dissacarídeo formado exclusivamente de D-GlcN (Aschauer *et al.*, 1990) (Esquema 1).



Esquema 1: Estrutura do lipídeo A de distintas bactérias Gram-negativas e sua atividade endotóxica. Adaptada de Erridge *et al.* (2002).

Ainda, vários estudos têm sido direcionados ao entendimento de como a natureza, número e o tamanho das cadeias acilas podem influenciar na atividade endotóxica do lipídeo A. Por exemplo, lipídeos A de *E. coli* contendo 5 ou 7 cadeias de ácidos graxos ao invés de 6, como é mais freqüentemente encontrado, apresentam uma atividade aproximadamente 100

vezes menor (Rietschel *et al.*, 1993). A partir de vários estudos, chegou-se ao consenso que o lipídeo A hexa-acilado difosforilado de *E. coli*, contendo 2 resíduos de D-glucosamina (GlcN ou GlcN3N) $\beta(1-6)$ ligadas, parece ser a estrutura melhor reconhecida por receptores de mamíferos, e que por conseguinte, a que possui a melhor atividade endotóxica. Quase todas as estruturas derivadas desta molécula apresentam a atividade endotóxica reduzida (Erridge *et al.*, 2002). As estruturas de lipídeo A ideais para ativação celular ótima não são as mesmas estruturas ideais para a ligação celular. Experimentos têm revelado que a estrutura de lipídeo ideal para ligação às células é constituída meramente por um dissacarídeo difosforilado contendo no mínimo 2 ácidos graxos. Lipídeos A que se ligam bem às células não necessariamente induzem fortemente a produção de citocinas, sugerindo assim que a natureza, o número e a distribuição dos ácidos graxos, é que determina a atividade endotóxica dessas moléculas (Erridge *et al.*, 2002).

15 *Atividades biológicas do LPS e lipídeo A de Bordetella pertussis*

A endotoxina ou LPS de *B. pertussis* é capaz de induzir, em macrófagos peritonal de rato, atividade citostática contra células tumorais (Lasfargues *et al.*, 1986). A indução desta atividade foi mapeada à região do lipídeo A do LPS. Esta atividade do LPS foi significativamente inibida (66%) quando o fragmento de lipídeo A monofosforilado foi utilizado. Em condições similares, a atividade persistiu depois do tratamento do lipídeo A com hidroxilamina, deste modo indicando que os ácidos graxos éster-ligados não estavam envolvidos na atividade citostática.

25 Gery e Waksman (1972) mostraram que LPSs estimulam células mononucleares a secretar interleucina-1 (IL-1). Entretanto, o LPS não-fracionado de *B. pertussis* tem uma baixa capacidade para induzir síntese de IL-1 por macrófagos peritoniais de rato, quando comparado a LPSs de outras bactérias. Observações similares foram feitas em monócitos humanos.

Quando LPS de *B. pertussis* foi fracionado nos constituintes LPS-I e LPS-II, a indução da atividade de IL-1 do LPS-II, que contém mais fosfato e menos KDO do que o LPS-I, foi muito maior do que aquela do LPS-I (Cavaillon e Haeffner-Cavaillon, 1986).

5 Tanto a região do polissacarídeo (antígeno O e *core* oligossacarídico) bem como fragmentos de lipídeo A, isolados depois da hidrólise com ácido da LPS de *B. pertussis*, foram capazes de induzir IL-1 intracelular, produzidos em macrófagos peritoniais de camundongo (Lasfargues *et al.*, 1987). Atividades similares, obtidas com o fragmento
10 Heptose-KDO de um LPS rugoso de *Salmonella*, sugere que a região KDO tem um papel similar à região do polissacarídeo de *B. pertussis*. Em outro experimento, o fragmento de lipídeo A isento do polissacarídeo, foi incapaz de induzir uma secreção de IL-1 (Caroff *et al.*, 1986).

Endotoxinas são potentes mitógenos e ativadores policlonais
15 de linfócitos B murino (Gery *et al.*, 1970, 1972). Camundongos da linhagem C3H/HeJ não respondem especificamente a mitógenos e ao lipídeo A monofosforilado. Tem sido determinado, contudo, que semelhante a poucos outros LPSs, o LPS de *B. pertussis*, definitivamente induz uma resposta mitogênica em linfócitos B da linhagem C3H/HeJ de camundongos (Girard *et*
20 *al.*, 1981; Chaby *et al.*, 1988). Esta atividade foi desencadeada por fragmentos polissacarídicos (PS-1 e PS-2) do LPS de *B. pertussis*, enquanto que o lipídeo A monofosforilado foi completamente inativa.

A indução de linfócitos B policlonal ativados por endotoxinas de *B. pertussis* tem sido estudada com esplenócito de coelho (Haeffner-Cavaillon *et al.*, 1982, 1982a), por mensuração do número de
25 imunoglobulinas secretadas por célula. Ambos lipídeo A monofosforilado e o fragmento polissacarídico PS-1 foram capazes de induzir a ativação policlonal, mas o fragmento polissacarídico PS-2 foi inativo. Este trabalho mostrou que o número de Ig-secretado por células B, e induzido também por

lipídeo A monofosforilado ou por PS-1, foi menor do que aquele induzido pela mistura destes componentes, ou pelo LPS intacto, deste modo sugerindo que a atividade disparada por estas duas regiões do LPS procede por diferentes mecanismos.

57

5 Numerosas atividades imunomodulatórias observadas depois da administração da vacina de *B. pertussis* tem sido atribuídos por componentes bacterianos específicos. Em vários estudos de imunização e vacinação, o lipídeo A monofosforilado de *B. pertussis* mostrou ser o fragmento de LPS com atividade adjuvante mais eficiente e sem toxicidade
 10 (Munoz e Bergman, 1979; Ayme *et al.*, 1980; Chaby e Caroff, 1988).

Métodos de obtenção de LPS e lipídeo A

Os métodos mais utilizados na obtenção do LPS de bactérias Gram-negativas são:

15 (1) 45% de fenol aquoso, 65-68°C, 15 min (Westphal e Jann, 1965).

(2) 89% de fenol aquoso-clorofórmio-éter de petróleo (PCP) (2:5:8, v/v/v), 5-20°C, alguns minutos (Galanos *et al.*, 1969).

(3) 0,15 M de NaCl:dielil-éter (1:2, v/v), 6-12°C, 1 dia (Ribi *et al.*, 1961).

20 (4) 0,25 M de ácido tricloroacético (TCA), 4°C, 3h (Staub, 1965).

(5) Dimetil-sulfóxido, 60°C, 4 h (Adams, 1967).

(6) Dietileno-glicol, 20°C, 3-4 dias (Morgan, 1965).

(7) EDTA aquoso, pH 8-8,5, 37°C, 15 min (Leive and
 25 Morrison, 1972).

(8) 1 M de NaCl - 0,1 M citrato de sódio, pH 7, 0-4°C, 5 dias (Raynaud *et al.*, 1973).

Estes métodos apresentam rendimento e eficiência bem variáveis na extração do LPS de distintas bactérias Gram-negativas.

Entretanto, o método do fenol aquoso quente (Westphal *et al.*, 1952; Westphal e Jann, 1965) (método 1), ainda é o procedimento mais aceito e utilizado, uma vez que reduz a contaminação do LPS por outros componentes lipídicos ou proteicos (Wilkinson, 1996). A grande desvantagem neste procedimento é a utilização de uma grande quantidade de fenol, um reagente extremamente tóxico e cancerígeno, não-reciclável, e de difícil manipulação e de descarte em escala industrial, sendo um poluente altamente prejudicial ao meio-ambiente. Os demais procedimentos de extração de LPS também apresentam desvantagens em termos de rendimento e/ou de manipulação em larga escala. Por exemplo, o método 2 (Galanos *et al.*, 1969) tem a desvantagem de, além de utilizar fenol em maior quantidade (89%) do que o método de Westphal e Jann (método 1), também utiliza clorofórmio e éter de petróleo, que são reagentes altamente inflamáveis e tóxicos, de difícil manipulação e descarte, logo danosos ao meio-ambiente. O método 3 (Ribi *et al.*, 1961) tem a desvantagem de utilizar dietil-éter, um reagente altamente inflamável, tóxico e de difícil descarte industrial. O método 4 (Staub, 1965) utiliza TCA, um ácido forte e altamente corrosivo, impróprio para uso em escala preparativa, pois gera um rejeito químico de difícil descarte. O método 5 (Adams, 1967) utiliza DMSO, um reagente também tóxico, de manipulação industrial complicada, não-reciclável e de difícil descarte, e prejudicial ao meio ambiente. Os métodos 6, 7 e 8 (Morgan, 1965; Leive and Morrison, 1972; Raynaud *et al.*, 1973), apesar de não utilizarem reagentes tóxicos, têm como desvantagens o fato de utilizarem reagentes não-recicláveis (EDTA, etileno-glicol, NaCl, citrato de sódio), e apresentarem um rendimento muito baixo na obtenção do LPS (Wilkinson, 1996).

O lipídeo A é obtido pela hidrólise do LPS com tratamento ácido, que quebra a ligação glicosídica do resíduo de KDO do *core* ao resíduo de GlcN II do lipídeo A (**Estrutura 1B**). A influência da condição hidrolítica na atividade endotóxica do fragmento do lipídeo A resultante tem sido

investigada (Ayme *et al.*, 1980; Caroff *et al.*, 1986). O fragmento de lipídeo A, obtido por hidrólise com acetato de sódio (pH 4,5), na presença de 1% SDS (1h, 100°C), resultou ser tão pirogênico como o LPS não-fragmentado, porém mais tóxico do que este. Ambas atividades indesejáveis decresciam quando o fragmento do lipídeo A era isolado, depois do tratamento com ácido mais forte (TFA pH 3, 150 h, 50°C), durante o qual o grupo fosfato é clivado no C-1. A remoção completa do grupo fosfato no C-1 através do uso de ácido clorídrico (0,25 N HCl, 30 min, 100°C), permitiu o isolamento de um fragmento não-tóxico e não-pirogênico, o lipídeo A monofosforilado (MPL ou MPLA), que é assim ideal como adjuvante. A perda de um ânion de fosfato, induzindo a transformação conformacional da molécula, é responsável pela modificação da atividade biológica. A correlação observada entre a clivagem do grupo fosfato no C-1 da unidade de glucosamina reduzida, e a perda concomitante da pirogenicidade e toxicidade é consistente com observações em endotoxinas de outras bactérias (Qureshi *et al.*, 1982).

Goodman e Sultzer (1977) observaram que a hidrólise alcalina branda do lipídeo A resultava em diminuição de sua atividade endotóxica, porém aumento de sua atividade mitogênica. Em seguida, foi observado que o tratamento do lipídeo A com álcali moderado (0,25 N de NaOH, 56°C), resultava na liberação específica e única do ácido graxo β -hidroximirístico (β -OH-C14:0) ligado ao carbono 3 da GlcN I (C-3/GlcN I)(vide Estrutura 1B) (Riestchel *et al.*, 1987, 1993). Na patente americana No. 4,912,094, Myers *et al.* demonstraram que a redução da atividade endotóxica do lipídeo A estava associada à remoção do resíduo de β -OH-C14:0 do C-3/GlcN I, após tratamento com 0,5 M de carbonato de sódio, pH 10,5, 45°C.

Bordetella pertussis e vacinação contra a coqueluche

O gênero *Bordetella* é constituído de cocobacilos Gram-negativos delicados, englobados em três espécies: *pertussis*, *parapertussis* e *bronchiseptica*. A *Bordetella pertussis* é o agente da coqueluche, uma

infecção aguda do aparelho respiratório, que acomete, principalmente, crianças até 10 anos de idade. A *B. parapertussis* causa infecção respiratória semelhante à coqueluche; entretanto, o paciente não apresenta o quadro de tosse paroxística. A *B. bronchiseptica* é uma bactéria primariamente patogênica para animais (coelho, cobaia, rato, porco, cachorro e outros), sendo suas infecções freqüentemente epidêmicas. Raramente causa infecção no homem (Cherry, 1996; Wirsing von König *et al.*, 2002).

A *B. pertussis* sofre mutações de vários tipos, quando submetida a culturas sucessivas no laboratório. Estas mutações são freqüentes, determinando alterações profundas na estrutura, metabolismo e virulência da bactéria. Dependendo da existência e do grau destas alterações a *B. pertussis* pode se apresentar em quatro fases. Na fase 1, característica da bactéria recém-isolada, a *B. pertussis* é portadora de todas as suas estruturas, produz seus fatores de virulência e é bastante exigente com relação aos seus requerimentos nutritivos. Na fase 2, ocorre o oposto, a *B. pertussis* deixa de apresentar muitas de suas estruturas, é praticamente avirulenta e não apresenta exigências nutritivas. As fases 3 e 4 são intermediárias com relação a essas características. Apenas as culturas de *Bordetella pertussis*, em fase 1, devem ser utilizadas no preparo de vacinas (Cherry, 1996; Rothstein *et al.*, 1999).

Somente nos últimos anos, vários estudos têm sido realizados com o objetivo de se entender os mecanismos de virulência da *Bordetella pertussis*. Foi demonstrado, por exemplo, que a bactéria coloniza as células ciliadas do trato respiratório, produzindo, durante o crescimento, uma série de substâncias tóxicas, que seriam responsáveis pelas manifestações patológicas e clínicas da infecção. A colonização da mucosa inicia-se com a fixação, ou aderência, da bactéria aos cílios das células, sendo a fixação mediada por duas proteínas: a hemaglutinina filamentosa e a própria toxina pertússica (Cherry, 1996).

As vacinas contra *B. pertussis* podem ser de dois tipos: celular

e acelular. A vacina celular é composta de uma suspensão de células da bactéria inativadas por formaldeído (0,2%). Esta vacina foi desenvolvida nos anos 30. Baseando-se em ensaios clínicos de eficácia desde os anos 40, foi demonstrado que a vacina apresenta 70-90% de eficácia na prevenção da coqueluche. As reações adversas à vacina celular são raramente observadas, mas ainda existem preocupações quanto à sua segurança na imunização de humanos, principalmente no que se refere à possibilidade da vacina causar dano cerebral. Neste sentido, existe um total desacordo entre os especialistas. No entanto, a maioria deles concorda que se esse tipo de dano ocorrer, ele é raro. Assim, a vacina ainda é utilizada até hoje na maioria dos países, apesar de que há uma preocupação para o desenvolvimento de vacinas mais purificadas, que o caso da vacinas acelulares (Cherry, 1996; CDC, 1997).

As vacinas acelulares contêm componentes purificados ou inativos de *B. pertussis*. Várias vacinas acelulares têm sido desenvolvidas nos últimos anos, e as primeiras vacinas foram licenciadas para uso humano em 1991. Quatro vacinas acelulares estão atualmente licenciadas para uso humano nos Estados Unidos, e em todas elas estão combinadas toxóides diftérico e tetânico, em uma formulação conhecida como DtaP. A eficácia destas vacinas varia de 71 a 84%. Mais recentemente, vem sido discutida a possibilidade de utilização de adjuvantes para melhoria da eficácia das vacinas acelulares (CDC, 1997; Wirsing von König *et al.*, 2002).

Um dos problemas para se produzir uma vacina acelular, que confira uma proteção total contra a *B. pertussis*, é a baixa imunogenicidade observada para esse tipo de vacina. Isto poderia ser resolvido com a administração da vacina na presença de um adjuvante (Rothstein *et al.*, 1999). Porém, um dos maiores empecilhos para que isto ocorra é o alto custo dos adjuvantes comerciais (*e.g.* MPL ou MPLA da RIBI ImmunoChem Research Inc., E.U.A.), de uso aprovado para humanos, e em fase de testes clínicos com várias vacinas (Baldrige e Crane, 1999).

OBJETIVO DA INVENÇÃO

Assim, esta invenção tem como racional a utilização da própria *B. pertussis* para obtenção de um adjuvante comprovadamente eficaz experimentalmente, o lipídeo A monofosforilado ou MPLA. Isto resulta na produção de um adjuvante de baixo custo, e que poderá ser adicionado à vacina acelular contra a *Bordetella pertussis*.

22

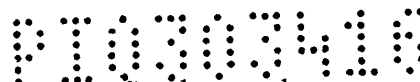
BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO E DAS FIGURAS

A Figura 1 apresenta protocolos de obtenção de LPS de *Bordetella pertussis*.

10 A Figura 2 apresenta o protocolo de obtenção e preparação de lipídeo A de *Bordetella pertussis*.

A Figura 3A apresenta o perfil em ESI-MS (modo negativo) do lipídeo A de *Bordetella pertussis* obtido a partir dos três distintos processos preparativos (P0, P1 e P2). As mesmas espécies iônicas são observadas nas 3 preparações, sendo o íon m/z 1478 ($[M-H]^-$) a espécie majoritária. É importante notar, abaixo de 1000 m/z , a completa ausência de contaminantes, tais como ácidos graxos livres e fosfolipídeos, ou de fragmentos originados da degradação do lipídeo A. Os espectros foram normalizados quanto à abundância relativa de íons. m/z , razão massa/carga.

20 A Figura 3B apresenta a atribuição (*assignment*) por ESI-MS (modo negativo) da estrutura dos principais íons de lipídeo A de *Bordetella pertussis*. As demais espécies iônicas observadas em m/z 1252, 1268, 1290, 1450 e 1534, representam variações no tamanho das cadeias lipídicas, ou adutos de Na^+ . O íon majoritário de m/z 1478 representa uma espécie contendo 5 ácidos graxos (4 OH-C14:0, e 1 OH-C10:0) e 1 grupo fosfato. O íon de m/z 1506 representa uma espécie contendo 4 ácidos graxos (2 OH-C14:0, 1 OH-C16:0 e 1 OH-C10:0; ou 3 OH-C14:0 e 1 OH-C12:0) O íon de m/z 1308 representa uma espécie contendo 4 ácidos graxos (4 OH-C14:0). As massas moleculares monoisotópicas teóricas calculadas para estes 3 íons



(1479,02, 1507,05 e 1308,89, respectivamente) estão de acordo com as massas moleculares monoisotópicas experimentais observadas em diferentes experimentos (1479,0, 1507,1 e 1309,0).

23

A Figura 4 apresenta as fragmentações sucessivas (ESI-MS/MSⁿ) do íon majoritário (m/z 1478) do lipídeo A de *B. pertussis* para confirmação de sua estrutura. A fragmentação do íon m/z 1478 deu origem a um pico majoritário de m/z 1290, o que pode ser atribuído à perda de um resíduo completo de ácido graxo OH-C10:0 ($\text{CH}_3\text{-}[\text{CH}_2]_6\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-COOH}$), éster ligado ao C-3 da GlcN I. O íon m/z 1290 quando fragmentado dá origem ao íon m/z 1046, que pode ser atribuído à perda de um resíduo completo de ácido graxo OH-C14:0 ($\text{CH}_3\text{-}[\text{CH}_2]_{10}\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-COOH}$), éster ligado ao C-3' da GlcN II. Estas atribuições estão baseadas em dados prévios da literatura (Chan e Reinhold, 1994). Segundo estes autores, os ácidos graxos éster-ligados ($\text{R}_1\text{-COO-R}_2$) diretamente aos resíduos de GlcN ou às cadeias de ácidos graxos, são mais susceptíveis à fragmentação por ESI-MS do que os ácidos graxos amido-ligados ($\text{R}_1\text{-CON-R}_2$) diretamente ao resíduo de GlcN. De fato, em ESI-MS/MS é muito difícil quebrar uma ligação éster, uma vez que a energia de colisão é em geral baixa. Os demais fragmentos formados pela colisão sucessiva dos íons precursores de m/z 1046, 718 e 490, foram interpretados e são apresentados na figura. As atribuições para estes íon estão também de acordo com os dados da literatura (Chan e Reinhold, 1994). O íon final obtido (m/z 222) pode ser atribuído possivelmente a uma glucosamina-fosfato com dupla insaturação, resultante da perda de 2 grupos OH.

A Figura 5 apresenta a atribuição estrutural da espécie majoritária do lipídeo A de *Bordetella pertussis* (cepa 18323). A massa molecular monoisotópica (M) determinada para esta molécula está de acordo com o dados de espectrometria de massa, onde foi observada uma espécie monocarregada $[\text{M-H}]^-$ de m/z 1478. A ausência de um grupo fosfato na

posição C1 deve-se ao tratamento brando do LPS com ácido. Assim, possivelmente, o lipídeo A original deve conter o fosfato na posição C1.

24

A Figura 6 apresenta a análise por ESI-MS (modo negativo) dos lipídeos A preparados de LPS *Bordetella pertussis* e de outras bactérias pelo processo P0 (Figura 1). Os lipídeos A de *Bordetella pertussis*, *Salmonella minnesota*, *Serratia marcescens* e *Escherichia coli* foram obtidos após hidrólise ácida, seguido por partição em clorofórmio:metanol:água (1:1:1, v/v/v). As atribuições de estrutura para as espécies majoritárias de lipídeo A de cada bactéria estão representadas nos espectros.

A Figura 7 apresenta o resultado da imunização com o antígeno anatoxina de *Corinebacterium diphtheriae*, na presença e ausência de lipídeo A de *B. pertussis*. Os soros dos animais imunizados foram testados por CL-ELISA a partir da diluição de 1:1000. RLU, unidades relativas de luminescência.

A Figura 8 apresenta o resultado da imunização com o antígeno recombinante TSSA-II de *Trypanosoma cruzi*, na presença ou não de adjuvante (MPLA de *B. pertussis* ou adjuvante de Freund). Os soros dos animais imunizados foram testados por CL-ELISA a partir da diluição de 1:100.

A Figura 9 apresenta o resultado da imunização com o antígeno OMV de *Neisseria meningitidis*, na presença ou ausência de adjuvante (MPLA de *B. pertussis* ou adjuvante de Freund). Os soros dos animais imunizados foram testados em CL-ELISA na diluição de 1:1.000.

A Figura 10 apresenta o resultado da imunização com a vacina acelular contra a *Bordetella pertussis*, na presença e ausência de adjuvante (MPLA de *B. pertussis* ou hidróxido de alumínio, Al). (A) Títulos de anticorpos; (B) Sobrevivência de animais vacinados. A vacina acelular (AVac) foi produzida pelo Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan de São Paulo. O teste de sobrevivência foi realizado em camundongos BALB/c,

através do desafio cerebral com a *B. pertussis*, de acordo com os procedimentos-padrões para testes pré-clínicos de vacina pertússica.

Preparação de lipopolissacarídeo (LPS) de Bordetella pertussis e de outras bactérias gram-negativas

5 O LPS de *Bordetella pertussis* foi obtido utilizando-se um protocolo diferente daqueles mais comumente citados na literatura (vide revisão de Wilkinson, 1996, e referências nela incluídas). O protocolo aqui empregado baseia-se nas propriedades anfífilas de glicolipoproteínas, lipoproteínas, glicolípídeos e lipopolissacarídeos de bactérias e parasitas. Ou
10 seja, estas moléculas, por possuírem uma região altamente hidrofílica (oligossacarídeo, polissacarídeo ou polipeptídeo) e uma região hidrofóbica (cauda lipídica), possuem a capacidade de se dissolverem ou se particionarem tanto em água como em solventes orgânicos polares (*i.e.* butanol, propanol), em baixas concentrações. Basicamente, a presente invenção pode empregar,
15 ou não, uma seqüência de extrações com solventes orgânicos (clorofórmio e metanol), em diferentes proporções, para delipidação das células, seguida de extrações com 5-9% de 1-butanol.

A *Bordetella pertussis* (cepa 18323) utilizada no desenvolvimento deste invento estudo é cultivada pelo Centro de
20 Biotecnologia do Instituto Butantan, São Paulo, SP. A bactéria é rotineiramente cultivada, em escala industrial, para a produção de vacina contra coqueluche (Dias *et al.*, 1994). As bactérias foram inativadas pela adição de formaldeído (0,02% final), ou de acetona (10% final). O precipitado (pellet) de bactérias inativadas foi centrifugado a 2.000-
25 10.000 g, por 15-30 min, a 4-10°C, e o sobrenadante descartado. O pellet foi liofilizado e pesado. O LPS foi obtido a partir dos 3 protocolos abaixo descritos.

No protocolo P0, cada 1 grama do pellet liofilizado de bactérias foi seqüencialmente extraído 3 vezes (por 5-30 min, a 4-30°C, cada

25

extração) com 10 ml de cada um dos seguintes solventes: (a) clorofórmio:metanol (C:M), 2:1 (v/v); (b) C:M, 1:1 (v/v); (c) C:M, 1:2 (v/v); e (d) clorofórmio:metanol:água (C:M:A), 1:2:0,8 (v/v/v). As fases orgânicas de cada extração foram separadas do precipitado (pellet) por centrifugação (1.000-10.000 g, 15-60 min, 4-10°C; ou 1.000-3.000 g, 15-30 min, 15-30°C). Os extratos orgânicos, contendo lipídeos neutros e fosfolipídeos, foram removidos e descartados. O pellet final deslipidado foi seco sob N₂ e extraído (3 vezes) com 10 ml de 1-butanol 5-9%, 1-18 h (cada extração), 4-30°C, sob agitação. Os 3 extratos butanólicos foram reunidos e secos em rotaevaporador a vácuo, a 20-70°C. A fração de 1-butanol 5-9% é enriquecida de LPS, devido às suas características anfífilas. Este protocolo inicial, denominado P0, foi modificado 2 vezes, com intuito de simplificá-lo, dando origem aos protocolos P1 e P2, que serão descritos a seguir.

No protocolo P1, o pellet liofilizado de bactérias (1 g) foi sequencialmente extraído (3x cada) com 10 ml de C:M, 2:1 (v/v) e C:M, 1:2 (v/v). As fases orgânicas de cada extração foram separadas do precipitado (pellet) por centrifugação (1.000-10.000 g, 15-60 min, 4-10°C; ou 1.000-3.000 g, 15-30 min, 15-30°C). Os extratos orgânicos, contendo lipídeos neutros e fosfolipídeos, foram removidos e descartados. O pellet final deslipidado foi seco sob N₂ e extraído (3 vezes) com 10 ml de 1-butanol 5-9%, 1-18 h (cada extração), 4-30°C, sob agitação. Os 3 extratos butanólicos, contendo o LPS, foram reunidos e secos em rotaevaporador a vácuo, a 20-70°C.

No protocolo P2, cada um grama do pellet liofilizado de bactérias foi diretamente extraído (3 vezes) com 10 ml de 1-butanol 5-9%, 1-18 h (cada extração), 4-30°C, sob agitação. Os 3 extratos, contendo o LPS, foram reunidos e secos em rotaevaporador a vácuo, a 20-70°C. A **Figura 1** mostra esquematicamente os três procedimentos de obtenção do LPS de *B. pertussis*.

Preparação do lipídeo-A monofosforilado (MPLA)

O tratamento do LPS com ácido brando resulta na quebra da ligação glicosídica entre o KDO, presente no oligossacarídeo do *core* interno, e a GlcN II do lipídeo A (Osborn, 1963; Chaby e Caroff, 1988). O LPS (10-100 mg), diluído em água deionizada, é transferido para um tubo de vidro rosqueado (10-20 ml), com tampa contendo septo interno de politrifluoroetileno (PTFE). Em seguida, são adicionados ácido clorídrico (HCl) à solução de LPS, para uma concentração final de 0,1-0,3 N. A mistura é, então, homogeneizada por 1-3 min, e incubada por 0,5-2 h, a 90-100°C, em bloco de aquecimento ou estufa. Em seguida, é adicionada uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) em quantidade suficiente para neutralizar o HCl (por exemplo, para 1 ml do hidrolisado de LPS contendo 0,3N de HCl, acrescenta-se 0,1 ml de NaOH 3 M). Alternativamente, procedemos a hidrólise com ácido acético (HAc) 1,0-3,0 N (6-18%), 90-100°C, 1-2 h; seguida de neutralização com hidróxido de sódio (NaOH), em quantidade suficiente para neutralizar o HAc (por exemplo, para 1 ml do hidrolisado de LPS contendo 1 N de HAc, acrescenta-se 1 ml de NaOH 1 M).

A mistura é, então, submetida à partição com solvente orgânicos, após adição de 2 volumes de uma mistura de C:M (1:1, v/v), para cada volume do hidrolisado. A mistura é agitada por 1-3 min, e centrifugada por 15-30 min, a 1.000-3.000 g, a 4-30°C. Após a centrifugação são observadas duas fases: uma fase superior e uma fase inferior. A fase inferior, contendo o lipídeo A monofosforilado, é transferida para outro tubo de vidro, no qual são adicionados 1 volume da fase superior da mistura de solvente clorofórmio:metanol:água (C:M:A) (1:1:0,9, v/v/v). A mistura é agitada por 1-3 min e submetida à centrifugação por 15-30 min, a 1.000-3.000 g, a 4-30°C. A fase superior é descartada, e a fase inferior resultante é novamente submetida a duas novas partições com a fase superior do solvente C:M:A (1:1:0,9, v/v/v), para remoção de sais e contaminantes hidrofílicos (e.g.

27

antígeno-O e *core* oligossacarídico do LPS). Após o término desse processo, a fase inferior resultante é seca sob N₂ a 30-45°C. O lipídeo A foi ressuspensão em C:M (1:1), e armazenado entre -20 e -70°C até o uso. Alternativamente, em escala analítica, semi-preparativa ou industrial, o lipídeo A pode ser purificado dos demais componentes do LPS, através de passagem ou adsorção em uma resina de troca-iônica contendo o grupo químico dietilenoaminoetil (DEAE), ligado a um suporte ou matriz de celulose ou equivalente. O lipídeo A, devido à sua carga negativa, interage com essa resina carregada positivamente, e pode ser eluída com um solvente orgânico, tal como tricloroetileno, metanol, etanol, propanol, 1-butanol, ou clorofórmio:metanol (1:1, v/v). O extrato orgânico resultante é então seco em rotavaporador (20-70°C) ou sob fluxo de N₂ (20-45°C).

A **Figura 2** mostra esquematicamente o protocolo de preparação do lipídeo A de *B. pertussis*.

A composição e a pureza do lipídeo A de *B. pertussis* bem como dos demais lipídeos A extraídos utilizando o mesmos protocolos, são avaliadas por espectrometria de massas de ionização por eletroborrificação (*electrospray ionization mass spectrometry*, ESI-MS). As amostras (1-10 pmol/μl) em solvente clorofórmio:metanol (1:1, v/v), contendo 10 mM de acetato de amônio (CM/AA), foram introduzidas no aparelho por infusão direta, utilizando uma microbomba de infusão, em um fluxo de 5-10 μl/min. Alternativamente, as amostras são introduzidas na fonte de ionização através do injetor (*loop injector*) do espectrômetro, com o auxílio de um fluxo do solvente CM/AA gerado por um sistema de entrega de solvente (*solvent delivery system*), operando em pressão positiva de nitrogênio de 9-10 psi. As voltagens da fonte de ionização e do capilar aquecido são mantidas a 4,0-4,5 kV e 35-45 V, respectivamente. A temperatura do capilar é mantida a 180-200°C. Os espectros em modo negativo de ionização (MS⁻) são coletados a 3 segundos/varredura, em uma faixa de razão carga/massa (*m/z*) entre 200 e

2. Hidróxido de alumínio (AlOH ou Al)

3. Lipídeo A monofosforilado de *B. pertussis*

30

Animais:

5 Camundongos BALB/c, em grupos de 5 animais, imunizados da seguinte forma:

Quando utilizado o TSSA-II de *Trypanosoma cruzi* como antígeno, foram realizadas quatro imunizações por grupo de animais (5 cada), com intervalos de uma semana entre elas (dias 1, 7, 15 e 22). Em cada imunização, os animais foram injetados intra-peritonealmente (i.p.) com 200
10 µl da preparação, na presença ou não de lipídeo A monofosforilado de *B. pertussis*, ou de adjuvante de Freund. Neste último grupo de animais, a 1ª imunização foi realizada com adjuvante de Freund completo, enquanto que as 2ª e 3ª imunizações foram realizadas na presença de adjuvante de Freund incompleto.

15 Quando utilizada o OMV de *Neisseria meningitidis* como antígeno, foram realizadas três imunizações por grupo de animais (5 cada), com intervalos de 3 semanas entre elas (dias 1, 21 e 42). Em cada imunização, os animais foram injetados i.p. com 200 µl da preparação, na presença ou não de lipídeo A monofosforilado de *B. pertussis*, ou de adjuvante de Freund.
20 Neste último grupo de animais, a 1ª imunização foi realizada com adjuvante de Freund completo, enquanto que as 2ª e 3ª imunizações foram realizadas na presença de adjuvante de Freund incompleto.

Quando utilizada a anatoxina de *Cornebacterium diptheriae* como antígeno, foram realizadas 2 imunizações por grupo de animais (5
25 cada), com intervalo de 15 dias entre elas (dias 1 e 15). Em cada imunização, os animais foram injetados i.p. com 200 µl da preparação, na presença ou não de lipídeo A monofosforilado de *B. pertussis*.

Quando utilizada a vacina acelular contra a *Bordetella pertussis*, foram realizadas 2 imunizações por grupo de animais (5 cada), com

intervalo de 15 dias entre elas (dias 1 e 15). Em cada imunização, os animais foram injetados com a vacina acelular (AVac), na presença ou não de hidróxido de alumínio (Al) ou lipídeo A monofosforilado de *B. pertussis*. 35

Em todos os grupos, após o término da imunização, os animais foram sangrados e o sangue coletado individualmente. Os soros foram obtidos após incubação do sangue em banho-maria a 37°C, por 1 h, e a 4°C, por 1h. Um volume de glicerol (50% final) foi adicionado para cada amostra de soro, para conservação do mesmo. Os soros glicerinados (diluição 1:2) foram armazenados a -20°C ou -70°C.

Os títulos sorológicos de anticorpos, antes e após as imunizações, foram avaliados por ELISA quimioluminescente (CL-ELISA), realizado de acordo com o protocolo descrito por Almeida *et al.* (1997). Os antígenos (TSSA-II, OMV, anatoxina ou AVac), em distintas concentrações, foram adicionadas aos poços de placa de poliestireno para CL-ELISA (Nunc, Dinamarca), em 50 µl do tampão carbonato-bicarbonato 50 mM, pH 9,6 (CBB) ou em tampão fosfato-salina (PBS) pH 7,2-7,4. Os antígenos foram fixados por 16-18 h, a 4°C, e em seguida a placa foi bloqueada com 0,1% de albumina sérica bovina (BSA) em CBB (1 h a 37°C), e lavada (3x) com 300 µl PBS-Tween 20 0,05% (PBS-T). Em seguida, os soros dos camundongos imunizados, diluídos 1:1.000 em PBS-T ou em diluição seriada 1:2 a partir de soros 1:100, foram adicionados (50 µl/poço), e a placa incubada durante 0,5-1,0 h a 37°C. A placa foi lavada (3x) com 300 µl PBS-T e incubada com anticorpos anti-IgG de camundongo (Amersham-Pharmacia Biotech) (na diluição 1:2.000 em PBS-T; 50 µl/poço), por 0,5-1,0 h a 37°C. Após a lavagem (3x) com PBS-T, a placa foi incubada com estreptavidina-peroxidase (Amersham-Pharmacia Biotech) (diluição 1:1000 em PBS-T; 50 µl/poço). A placa foi lavada, e a reação revelada pela adição do reagente quimioluminescente ECL (Amersham-Pharmacia Biotech) diluído 1:20 em CBB. As leituras foram efetuadas em luminômetro de microplaca (Fluoroskan

Ascent FL, Labsystems) e expressas em unidades relativas de luminescência (RLU).

32

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

As bactérias são inativadas pela adição de formaldeído (0,02% final), ou de acetona (10% final). O pellet de bactérias inativadas é centrifugado a 1.000-10.000 g, por 15-30 min, a 4-10°C, e o sobrenadante descartado. O pellet é liofilizado e pesado. O LPS é obtido a partir dos 3 protocolos abaixo descritos.

No protocolo P0, o pellet liofilizado de bactérias (1 g) é sequencialmente extraído 3 vezes com 10 ml de cada um dos seguintes solventes: (a) clorofórmio:metanol (C:M), 2:1 (v/v); (b) C:M, 1:1 (v/v); (c) C:M, 1:2 (v/v); e (d) clorofórmio:metanol:água (C:M:A), 1:2:0,8 (v/v/v). As fases orgânicas de cada extração são separadas do pellet por centrifugação (1.000-10.000 g, 15-60 min, 4-10°C; ou 1.000-3.000 g, 15-30 min, 15-30°C). Os extratos orgânicos, contendo lipídeos neutros e fosfolipídeos, são removidos e descartados. O pellet final deslipidado é seco sob N₂ e extraído (3x) com 10 ml de 1-butanol 5-9%, 1-18 h (cada extração), 4-30°C, sob agitação. Os 3 extratos butanólicos são reunidos e secos em rotaevaporador, a 20-70°C. A fração de 1-butanol 5-9% é enriquecida de LPS, devido às suas características anfífilas. Este protocolo inicial, denominado P0, pode ser modificado 2 vezes, com intuito de simplificá-lo, dando origem aos protocolos P1 e P2, que serão descritos a seguir.

No protocolo P1, o pellet liofilizado de bactérias (1 g) é sequencialmente extraído (3x cada) com 10 ml de C:M, 2:1 (v/v) e C:M, 1:2 (v/v). As fases orgânicas de cada extração são separadas do pellet por centrifugação (1.000-10.000 g, 15-60 min, 4-10°C; ou 1.000-3.000 g, 15-30 min, 15-30°C). Os extratos orgânicos, contendo lipídeos neutros e fosfolipídeos, são descartados. O pellet final deslipidado é seco sob N₂ e extraído (3x) com 10 ml de 1-butanol 5-9%, 1-18 h (cada extração), 4-30°C,

sob agitação. Os 3 extratos butanólicos, contendo o LPS, são reunidos e secos em rotaevaporador, a 20-70°C.

33

No protocolo P2, o pellet liofilizado de bactérias (1 g) é diretamente extraído (3x) com 10 ml de 1-butanol 5-9%, 1-18 h (cada 5 extração), 4-30°C, sob agitação. Os 3 extratos, contendo o LPS, foram reunidos e secos em rotaevaporador, a 20-70°C. A Figura 3 mostra esquematicamente os três procedimentos de obtenção do LPS de *B. pertussis*.

O LPS (10-100 mg), em 1 ml de água deionizada, é transferido para um tubo de vidro com septo de Teflon. Um mililitro de ácido clorídrico (HCl) 0,2-0,6 N é adicionado à solução de LPS, para uma concentração final 10 de HCl de 0,1-0,3 N. A mistura é então homogeneizada, e incubada por 1-2 h, a 90-100°C, em bloco de aquecimento. Em seguida, são adicionados 200 µl de hidróxido de sódio (NaOH) 1,0-3,0 M para neutralizar o HCl. Alternativamente, em escala analítica, semi-preparativa ou preparativa, 15 hidrólise pode ser realizada com 1 ml de ácido acético 2,0-6,0 N (6-18%), para uma concentração final de HCl de 0,1-0,3 N. 90-100°C. A mistura é então homogeneizada, e incubada por 1-2h; seguida de neutralização do ácido com 200 µl de NaOH 1,0-3,0 M. A mistura é, então, submetida à partição com solvente orgânico, após adição de 2,2 ml de clorofórmio e 2,2 ml de 20 metanol. A mistura é agitada por 1-3 min e centrifugada por 5-30 min, a 1.000-3000 g, a 4-30°C. Após a centrifugação são observadas duas fases: uma fase superior e uma fase inferior. A fase inferior, contendo o lipídeo A, é transferida para outro tubo de vidro, no qual são adicionados 2,2 ml da fase superior teórica do solvente C:M:A (1:1:0,9, v/v/v). A mistura é agitada e submetida à centrifugação por 5-30 min, a 1.000-3.000 g, a 4-30°C. A fase 25 superior é descartada, e a fase inferior resultante é novamente submetida a duas novas partições com a fase superior teórica, para remoção de sais e contaminantes hidrofílicos (e.g. antígeno-O e *core* oligossacarídico do LPS). Após o término desse processo, a fase inferior resultante é seca sob N₂ a 20-

45°C. O lipídeo A é ressuspenso em C:M (1:1) armazenado entre -20 e -70°C até o uso. Alternativamente, em escala analítica, semi-preparativa ou industrial, o lipídeo A pode ser purificado dos demais componentes do LPS, através de passagem ou adsorção em uma resina de troca-iônica contendo o grupo químico dietilenoaminoetil (DEAE), ligado a um suporte ou matriz de celulose ou equivalente. O lipídeo A, devido à sua carga negativa, interage com essa resina carregada positivamente, e pode ser eluída com um solvente orgânico, tal como tricloroetileno, metanol, etanol, propanol, 1-butanol, ou clorofórmio:metanol (1:1, v/v). O extrato orgânico resultante é então seco em rotavaporador (20-70°C) ou sob fluxo de N₂ (20-45°C).

Os exemplos aqui apresentados são meramente ilustrativos da presente invenção, não devendo restringir o escopo da mesma.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, W.T. (1965) Extraction of lipopolysaccharides from Gram-negative bacteria with dimethyl sulfoxide. *Can. J. Biochem.* 45: 422-426.
- 5 AKIRA, S., HEMMI, H. (2003) Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol. Lett.* 85: 85-95.
- ALMEIDA, I.C., COVAS, D.T., SOUSSUMI, L.M., TRAVASSOS, L.R. (1997) A highly sensitive and specific chemiluminescent enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of active *Trypanosoma*
- 10 *cruzi* infection. *Transfusion* 37: 850-857.
- ASCHAUER, I., GROB, A., HILDEBRANDT, J., SCHUTZE, E., STUTZ, P. (1990) Highly purified lipid X is devoid of immunostimulatory activity. Isolation and characterisation of immunostimulating contaminants in a batch of synthetic lipid X. *J. Biol. Chem.* 265: 9159-9164.
- 15 AYME, G., CAROFF, M., CHABY, R., HAEFFNER-CAVAILLON, N., LE DU, A., MOREAU M., MUSET M., MYNARD M.C., ROUMIANTZEFF M., SCHULZ D., SZABÓ, L. (1980) Biological activities of fragments derived from *Bordetella pertussis* endotoxin: isolation of a nontoxic, Shwartzman-negative lipid A possessing high adjuvant properties.
- 20 *Infect. Immun.* 3: 739-745.
- BALDRIDGE, J.R., CRANE, R.T. (1999) Monophosphoryl lipid A (MPL) formulations for the next generation of vaccines. *Methods* 19: 103-107.
- BENDELAC, A., MEDZHITOV, R. (2002) Adjuvants of
- 25 immunity: harnessing innate immunity to promote adaptative immunity. *J. Exp. Med.* 195: F19-F23.
- CAROFF, M., CAVAILLON, J.M., FITTING, C., HAEFFNER-CAVAILLON, N. (1986) Inability of pyrogenic, purified *Bordetella pertussis* lipid A to induce interleukin-1 release by human
-

monocytes. *Infect. Immun.* 54: 465-471.

CAVAILLON, J.M., HAEFFNER-CAVAILLON (1986) Polymixin-B inhibition of LPS-induced interleukin-1 secretion by human monocytes is dependent upon the LPS origin. *Molec. Immunol.* 23: 965-69.

5 CDC-CENTERS FOR DISEASE CONTROL (1997) Pertussis vaccination: use of acellular pertussis vaccines among infants and young children. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR* 46: 1-25.

10 CHABY, R., CAROFF, M. (1988) Lipopolysaccharides of *Bordetella pertussis* endotoxin. In: Pathogenesis and immunity in pertussis. A.C. Wardlaw e R. Parton (eds.), John Wiley & Sons Ltd., p.247-271.

CHAN, S., REINHOLD, V. (1994) Detailed structural characterization of lipid A: electrospray ionization coupled with tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 218: 63-73.

15 CHERRY, J.D. (1996) Historical review of pertussis and the classical vaccine. *J. Infect. Dis.* 174: S259-263.

20 DE BECKER, G., MOULIN, V., PAJAK, B., BRUCK, C., FRANCOTTE, M., THIRIART, C., URBAIN, J., MOSER, M. (2000) The adjuvant monophosphoryl lipid A increases the function of antigen-presenting cells. *Internatl. Immunol.* 12: 807-815.

DIAS, W.O., HORTON, D.S., TAKAHASHI, C.M., RAW, I. (1994) A *Bordetella pertussis* acellular vaccine candidate: antigenic characterization and antibody induction. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27: 2607-2611.

25 DI NOIA, J.M., BUSCAGLIA, C.A., DE MARCHI, C.R., ALMEIDA, I.C., FRASCH, A.C. (2002) A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. *J. Exp. Med.* 195: 401-413.

EDELMAN, R. (1992) An update on vaccine adjuvants in

clinical trial. *AIDS Res. Human Retroviruses* 8: 1409-1411.

ERRIDGE, C., BENNETT-GUERRERO, E., POXTON, I.R. (2002) Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes Infect.* 4: 837-851.

5 ESKO, J.D. (1999) Bacterial polysaccharides. *In: Essential glycobiology.* A. Varki, R. Cummings, J. Esko, H. Freeze, G. Hart e J. Marth (eds.), Cold Spring Harbor, p.321-331.

FREUND, J., MCDERMOTT, K. (1942) Sensitization to horse serum by means of adjuvants. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 49: 548-553.

10 GALANOS, C., LUDERITZ, O., WESTPHAL, O. (1969) A new method for the extraction of R lipopolysaccharide . *Eur. J. Biochem.* 9: 245-249.

 GERY, I., EYAL, O., BENEZRA, D. (1970) The relationship between lymphocyte transformation and immune response. 3. Kinetics of production of antibody forming cells and transforming cells. *Immunology* 19: 97-104.

 GERY, I., GERSHON, R.K., WAKSMAN, B.H. (1972) Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. I. The responding cell. *J. Exp. Med.* 1: 128-142.

20 GIRARD, R. CHABY, R., BORDERNAVE, G. (1981) Mitogenic response of C3H/HeJ mouse lymphocytes to polyanionic polysaccharides obtained from *Bordetella pertussis* endotoxin and from other bacterial species. *Infect. Immun.* 31: 122-128.

 GOODMAN *et al.* (1977) Mild alkaline hydrolysis of lipopolysaccharide endotoxin enhances its mitogenicity for murine B cells. *Infect. Immun.* 17: 205-214.

 GUPTA, R.K., SIBER, G.R. (1995) Adjuvants for human vaccines - current status, problems and future prospects. *Vaccine* 13: 1263-1276.

HAEFFNER-CAVAILLON, N., CAVAILLON, J.M.,

SZABO, L. (1982) Macrophage-dependent polyclonal activation of splenocytes by *Bordetella pertussis* endotoxin and its isolated polysaccharide and lipid A regions. *Cell. Immunol.* 1: 1-13.

5 HAEFFNER-CAVAILLON, N., CHABY, R., CAVAILLON, J.M., SZABÓ, L. (1982a) Lipopolysaccharide receptor on rabbit peritoneal macrophages. I. Binding characteristics. *J. Immunol.* 5: 1950-1954.

HOLST, O., ULMER, A.J., BRADE, H., FLAD, H.D., RIETSCHHEL, E.T. (1996) Biochemistry and cell biology of bacterial endotoxins. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 16: 83-104.

10 HOSHINO, K., TAKEUCHI, O., KAWAI, T., SANJO, H., OGAWA, T., TAKEDA, Y., TAKEDA, K., AKIRA, S. (1999) Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J. Immunol.* 15 162: 3749-3752.

HUNTER, R.L. (2002) Overview of vaccine adjuvants: present and future. *Vaccine* 20: S7-S12.

JOHNSON, A.G., GAINES, S., LANDY, M. (1956) Studies on the O antigen of *Salmonella typhosa* V. Enhancement of antibody response to protein antigens by the purified lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 103: 225-246.

LASFARGUES, A., CAROFF, M., CHABY, R. (1993) Structural features involved in the mitogenic activity of *Bordetella pertussis* lipopolysaccharides for spleen cells of C3H/HeJ mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2: 119-129.

LEIVE, L., MORRISON, D.C. (1972) Isolation of lipopolysaccharides from bacteria. *Methods Enzymol.* 28b: 254-262.

LUDERITZ, O., GALANOS, C., RIETSCHHEL, E.T. (1982) Endotoxins of Gram-negative bacteria. *Pharm. Ther.* 15: 383-402.

- MEDZHITOV, R., PRESTON²HURLBURT, P., JANEWAY, C.A., JR. (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388: 394-397.
- MORGAN, W.T.J. *Methods Carbohydr. Chem.* 5, 80-83, 5 1965.
- MUNOZ, J.J., BERGMAN, R.K. (1979) Biological activities of *Bordetella pertussis*. In: International Symposium on *Pertussis*. C.R. Manclark, J.C. Hill (eds.), pp.143-150, US DHEW Publ. No. (NIH) 79-1830, Washington DC.
- 10 OSBORN, M.J. (1963) Studies on the Gram-negative cell wall. I. Evidence for the role of 2-keto-3-deoxyoctonate in the lipopolysaccharide of *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 50: 499-506.
- 15 POLTORAK, A., HE, X., SMIRNOVA, I., LIU, M.Y., VAN HUFFEL, C., DU, X., BIRDWELL, D., ALEJOS, E., SILVA, M., GALANOS, C., FREUDENBERG, M., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P., LAYTON, B., BEUTLER, B. (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282: 2085-2088.
- 20 QURESHI, S.T., LARIVIERE, L., LEVEQUE, G., CLERMONT, S., MOORE, K.J., GROS, P., MALO, D. (1999) Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J. Exp. Med.* 189: 615-625.
- 25 QURESHI, N., TAKAYAMA, K, RIBI, E. (1982) Purification and structural determination of non-toxic lipid A obtained from the lipopolysaccharide of *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 257: 11808-11815.
- RAYNAUD, M., KOUZNETZOVA, B., NAVARRO, M.J., CHERMANN, J.C., DIGEON, M., PETITPREZ, A. (1973) A common antigenic constituent in various purified *Salmonella* endotoxins. *J. Infect. Dis.*
-

128: S35-42.

RIBI, E., HASKINS, W.T., LANDY, M., MILNER, K.C. (1961) Preparation and host-properties of endotoxin with low content of nitrogen and lipid. *J. Exp. Med.* 114: 647-663.

5 RIETSCHEL, E.T., BRADE, H., BRADE, L.,
BRANDENBURG, K., SCHADE, F.U., SEYDEL, U., ZHRINGER, U.,
● GALANOS, C., LUDERITZ, O., WESTPHAL, O., LABISCHINSKI, H.,
KUSUMOTO, S., SHIBA, T. (1987) Lipid A, the endotoxic centre of
bacterial lipopolysaccharides: relation of chemical structure to biological
10 activity, *Prog. Clin. Biol. Res.* 231: 25-34.

RIETSCHEL, E.T., KIRIKAE, T., SCHADE, F.U., ULMER,
A.J., HOLST, O., BRADE, H., SCHMIDT, G., MAMAT, U., GRIMMECKE,
H.D., KUSUMOTO, S., ZHRINGER, U. (1993) The chemical structure of
bacterial endotoxin in relation to bioactivity. *Immunobiology* 187: 169-190.

15 ROTHSTEIN, E.P., ANDERSON, E., DECKER, M.D. (1999)
An acellular pertussis vaccine in healthy adults: safety and immunogenicity.
● *Vaccine* 17: 2996-3006.

SCHIJNS, V.E.J.C. (2000) Immunological concepts of vaccine
adjuvant activity. *Curr. Op. Immunol.* 12: 456-463.

20 STAUB, A.M. (1965) *Methods Carbohydr. Chem.* 5: 92-93.

TAKEDA, K., KAISHO, T., AKIRA, S. (2003) Toll-like
receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21: 335-376.

ULRICH, J.T., MYERS, K.R. (1995) Monophosphoryl lipid A
as an adjuvant. *In: Vaccine design: the subunit and adjuvant approach.* M.F.
25 Powell e M.J. Newman (eds.), Plenum Press, p.495.

WESTPHAL, O., LUDERITZ O. (1954) Chemische
Erforschung von Lipopolysacchariden Gram-negativer Bakterien. *Angew.
Chemie.* 66: 407-417.

WESTPHAL, O., LUDERITZ O., BISTER, F. (1952) Über die

extraction von bakterien mit phenol-wasser. Z. Naturforsch. 7b: 148-155.

WESTPHAL O., LUDERITZ O., RIETSCHEL E.T., GALANOS C. (1981) Bacterial lipopolysaccharide and its lipid A component: some historical and some current aspects. Biochem. Soc. Trans. 9: 191-195.

WESTPHAL, O., JANN, K. (1965) Methods Carbohydr. Chem. 5: 83-91.

WILKINSON, S.G. (1996) Bacterial lipopolysaccharides – themes and variations. Prog. Lipid Res. 35: 283-343.

10 WIRSING VON KÖNIG, C.H., HALPERIN, S., RIFFELMANN, M., GUIISO, N. (2002) Pertussis of adults and infants. Lancet Infect. Dis. 2: 744-750.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de obtenção do lipolissacarídeo (LPS) de *Bordetella pertussis* **caracterizado pelo fato** de compreender as etapas de:

i) Extrair, sequencialmente, por 3 vezes o pellet liofilizado das bactérias com 10 volumes de cada um dos seguintes solventes: (a) clorofórmio:metanol (C:M), 2:1 (v/v); (b) C:M, 1:1 (v/v); (c) C:M, 1:2 (v/v); e (d) clorofórmio:metanol:água (C:M:A), 1 :2:0,8 (v/v/v);

ii) Separar, por centrifugação, o pellet (1.000-10.000 g, 15-60 min, 4-10°C; ou 1.000-3.000 g, 15-30 min, 4-30°C) das fases orgânicas de cada extração;

iii) Descartar os extratos orgânicos contendo lipídeos neutros e fosfolipídeos;

iv) Extrair o pellet liofilizado das mesmas com 1-butanol 5-9%, 1-18 h (cada extração), 4-30°C, sob agitação; e

v) Reunir e secar os extratos butanólicos em rotaevaporador, a 20-70°C.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo fato** de, alternativamente, a etapa "i" ser simplificada e compreender extrair, sequencialmente, por 3 vezes o pellet liofilizado das bactérias com 10 volumes dos seguintes solventes:

(a) clorofórmio:metanol (C:M), 2: 1 (v/v) e (b) C:M, 1 :2 (v/v).

3. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de o processo ser alternativamente simplificado, em que as etapas "i", "ii" e "iii" são

descartadas, e o pellet liofilizado é diretamente extraído das bactérias com 1-butanol 5-9%, 1-18 h (cada extração), 4-30°C, sob agitação (etapa "iv"), em que posteriormente os extratos butanólicos são reunidos e secos em rotaevaporador, a 20-70°C (etapa "v").

4. Processo de obtenção e preparação do lipídeo-A monofosforilado (MPLA) de *Bordetella pertussis* **caracterizado pelo** fato de compreender as etapas de:

i) Acidificar uma solução do LPS em água deionizada com solução de 0,1-0,3 N de ácido clorídrico ou ácido acético 1,0-3,0 N, em que a dita solução de LPS é obtida conforme processo definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3;

ii) Homogeneizar a mistura e incubar a mesma 1-2 h, a 90-100°C.

iii) Neutralizar a mistura resultante com solução de base NaOH 1,0-3,0 M;

iv) Particionar a mistura com os solventes orgânicos clorofórmio e metanol, com agitação por 1-3 min e centrifugação por 5-30 min, a 1.000-3.000 g, a 4-30°C;

v) Transferir a fase inferior, contendo o lipídeo A, e particionar a mesma novamente com a fase superior teórica do solvente C:M:A (1:1:0,9, v/v/v), promovendo agitação e centrifugação por 5-30 min, a 1.000-3.000g, a 4-30°C;

vi) Repetir a etapa de particionamento da fase inferior contendo o lipídeo A por mais duas vezes;

vii) Secar a fase inferior resultante sob N₂ a 20-45°C;

viii) Ressuspender o lipídeo A em C:M (1:1, v/v); e

ix) Armazenar o mesmo entre -20 e -70 °C.

5. Processo, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado pelo** fato de que, alternativamente:

- o lipídeo A monofosforilado, obtido após etapas "i"- "iii", é purificado através de passagem ou adsorção em uma resina de troca-iônica contendo o grupo químico dietilenoaminoetil (DEAE); em que posteriormente o lipídeo A monofosforilado é eluído da resina de DEAE com um solvente orgânico, tal como tricloroetileno, metanol, etanol, propanol, 1- butanol, ou clorofórmio:metanol (1: 1, v/v), em que o eluato contendo o lipídeo A monofosforilado resultante é seco em rotaveporador (20-70°C) ou sob fluxo de N₂ (20-45°C).

6. Vacina **caracterizada pelo** fato de compreender, como adjuvante, o MPLA obtido conforme processo definido pela reivindicação 4 ou 5, associado a um antígeno selecionado do grupo que consiste em antígeno de tripomastigota (*TSSA-II*, *trypomastigote small surface antigen II*), OMV N44/89 de *Neisseria meningitides*, ou outros, como anatoxina de *Corinebacterium diphteriae*, ou vacina acelular (AVac) de *Bordetella pertussis*.

7. Uso do lipídeo-A monofosforilado de *Bordetella pertussis* **caracterizado pelo** fato de ser na preparação de vacinas experimentais e humanas e de uso veterinário.

8. Vacina acelular contra coqueluche **caracterizada pelo** fato de compreender, como adjuvante, o MPLA obtido conforme processo definido pela reivindicação 4 ou 5, associado a antígenos vacinais purificados ou inativos de *Bordetella pertussis*.

9. Uso do lipídeo-A monofosforilado de *Bordetella pertussis* **caracterizado pelo** fato de ser como adjuvante na preparação de uma vacina acelular contra a coqueluche.

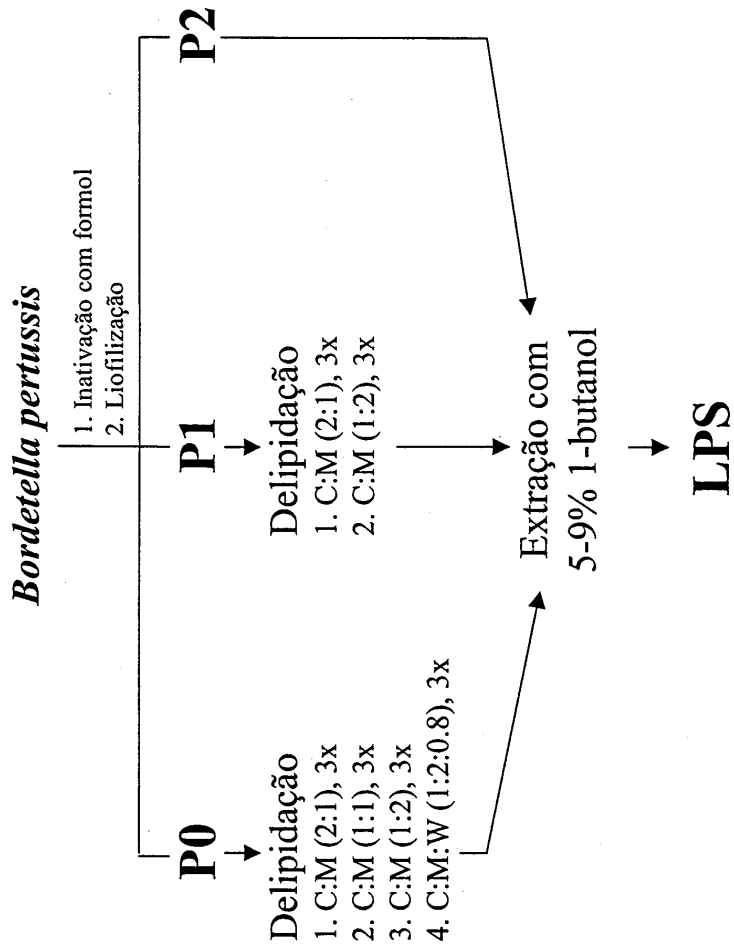


FIGURA 1

LPS



Hidrólise com:

Ácido acético 1-10%, 90-100°C, 1-2h

ou

HCl 0,1-0,25 N, 90-100°C, 1-2 h



Partição com clorofórmio:metanol (1:1)

ou

Cromatografia de troca iônica



Lipídeo A

FIGURA 2

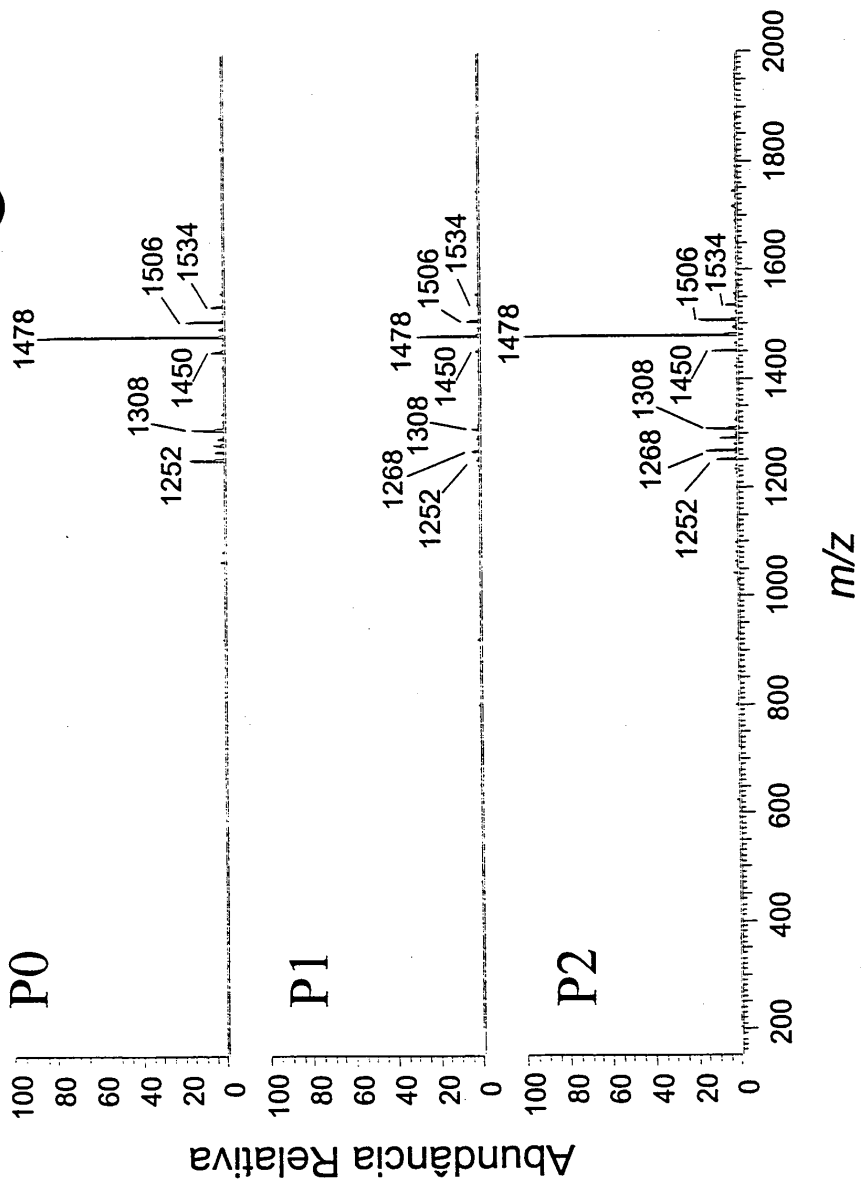


FIGURA 3

48

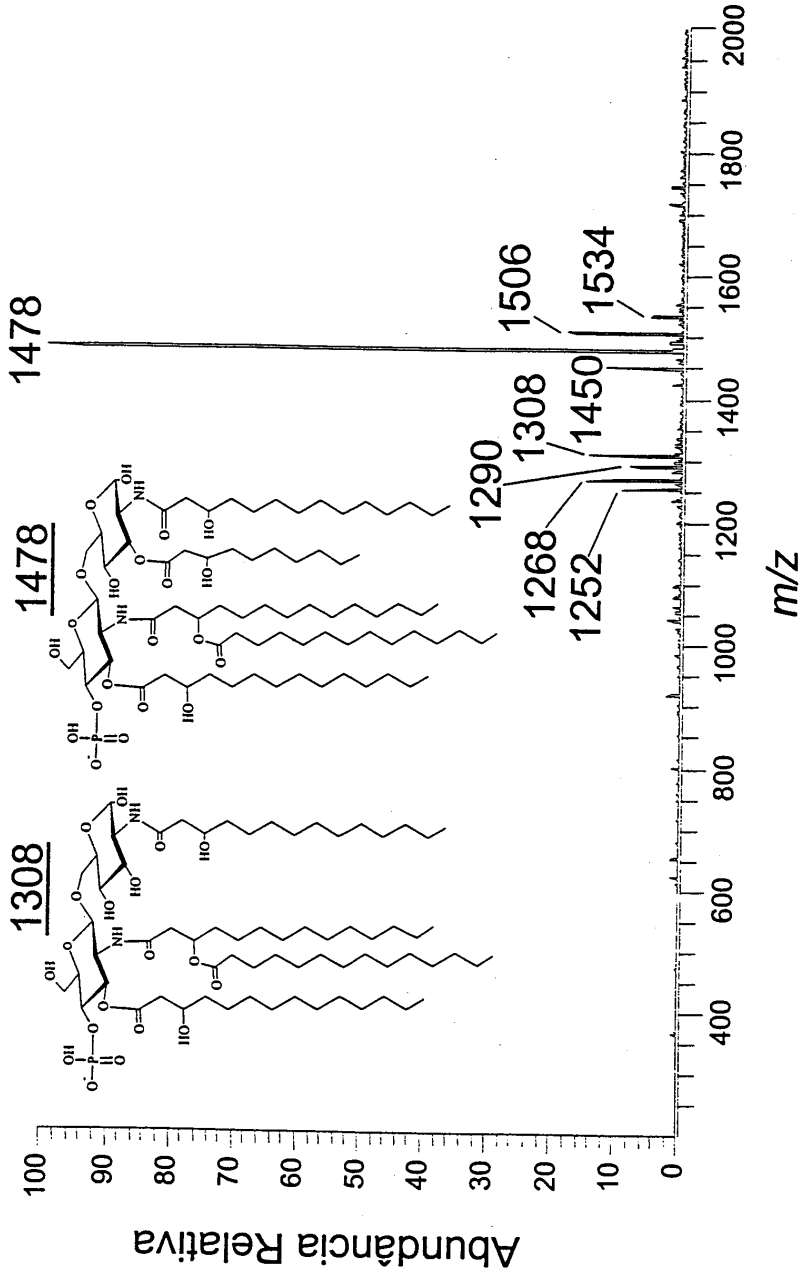


FIGURA 3A

M = 1479.0234

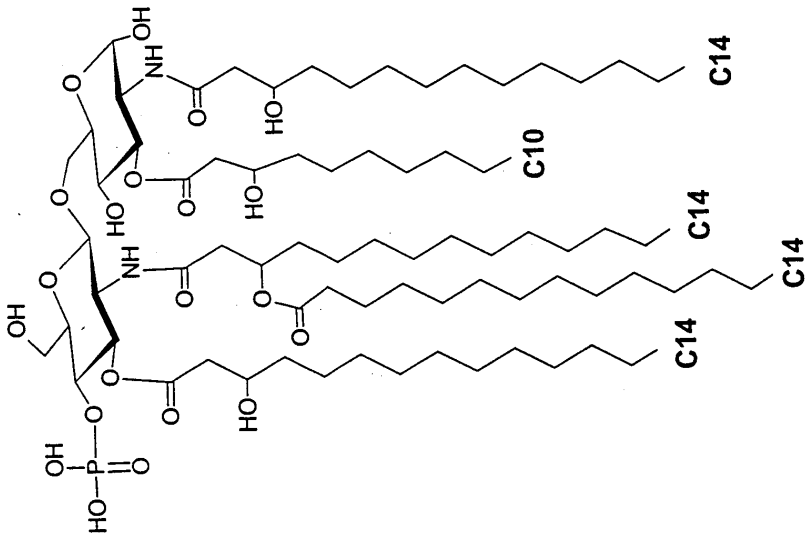


FIGURA 4

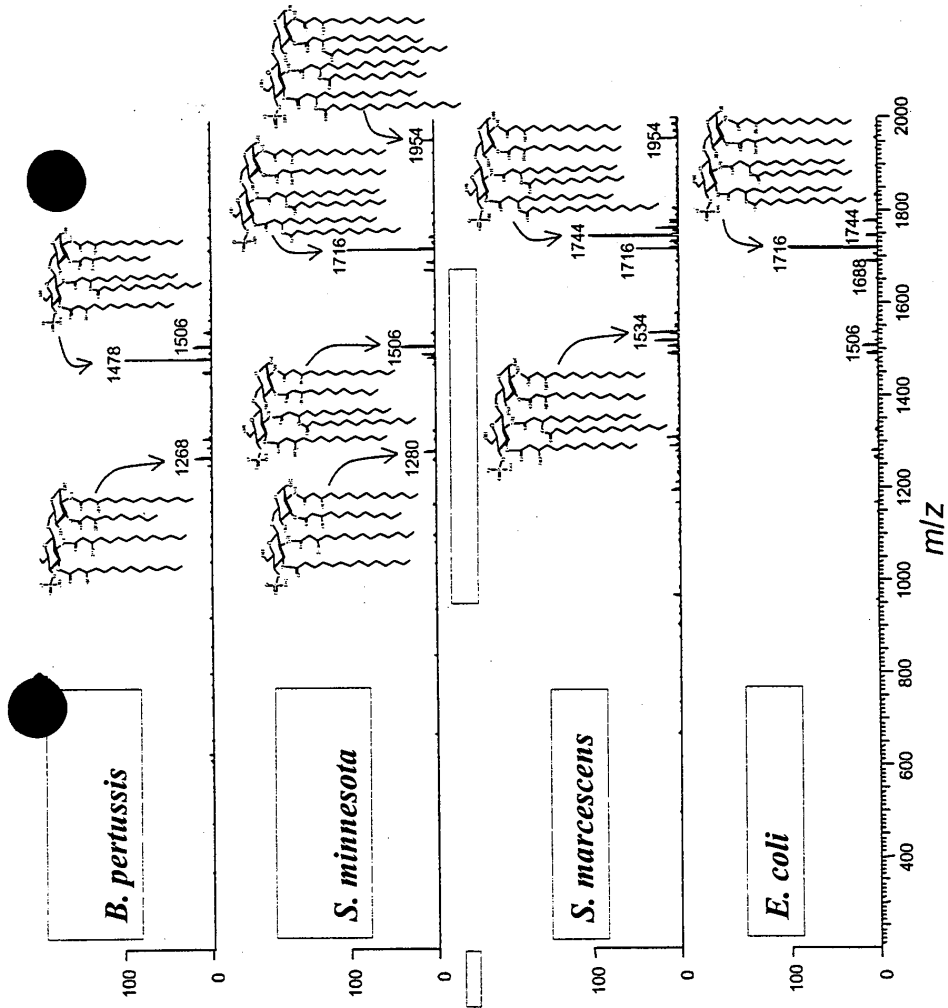


FIGURA 5

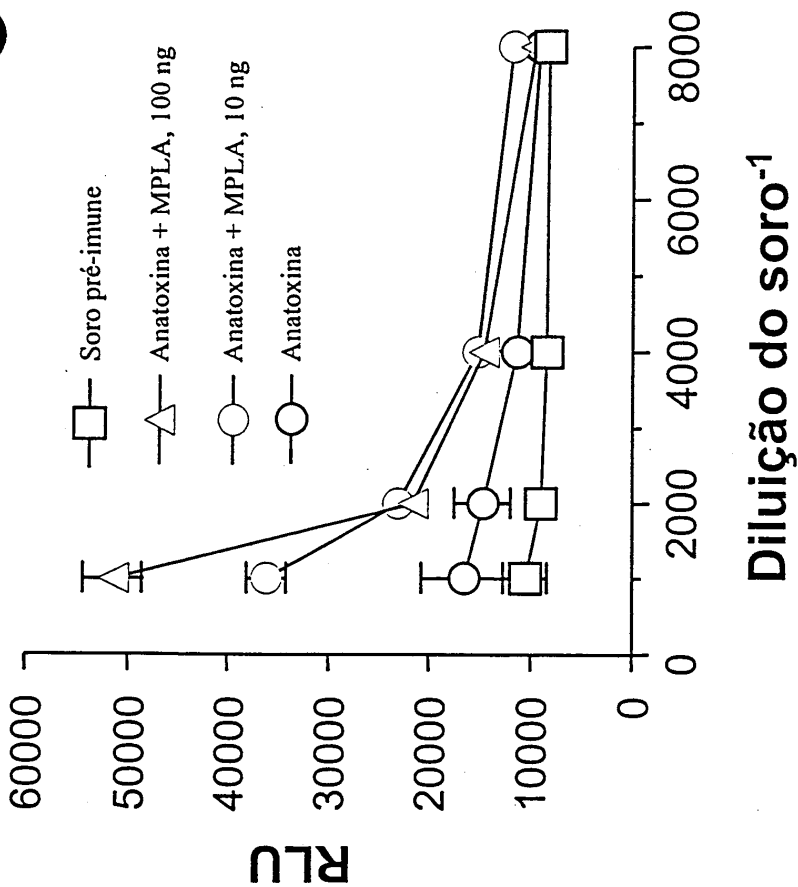


FIGURA 6

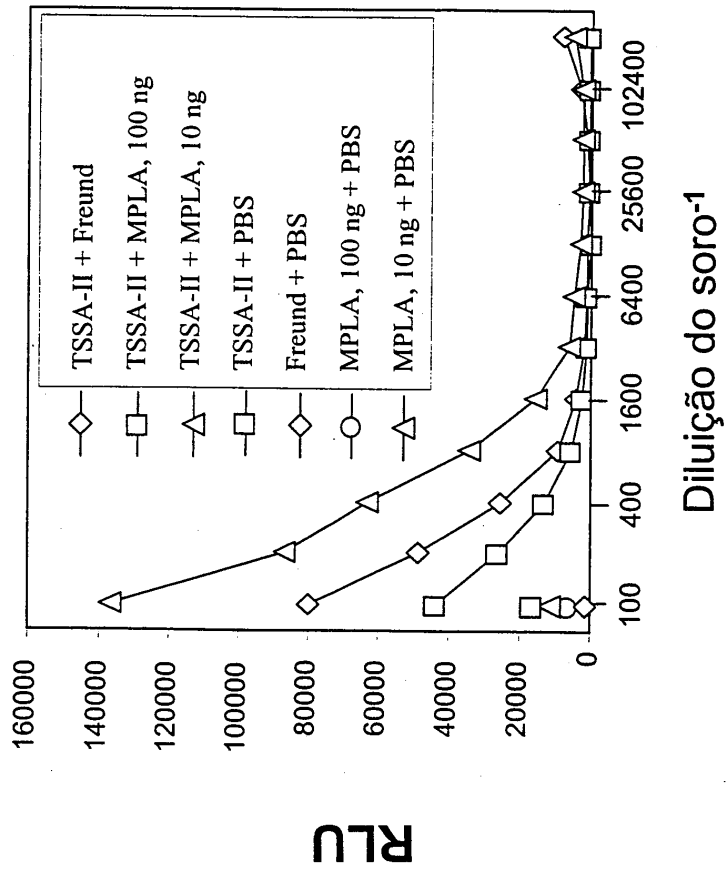


FIGURA 7

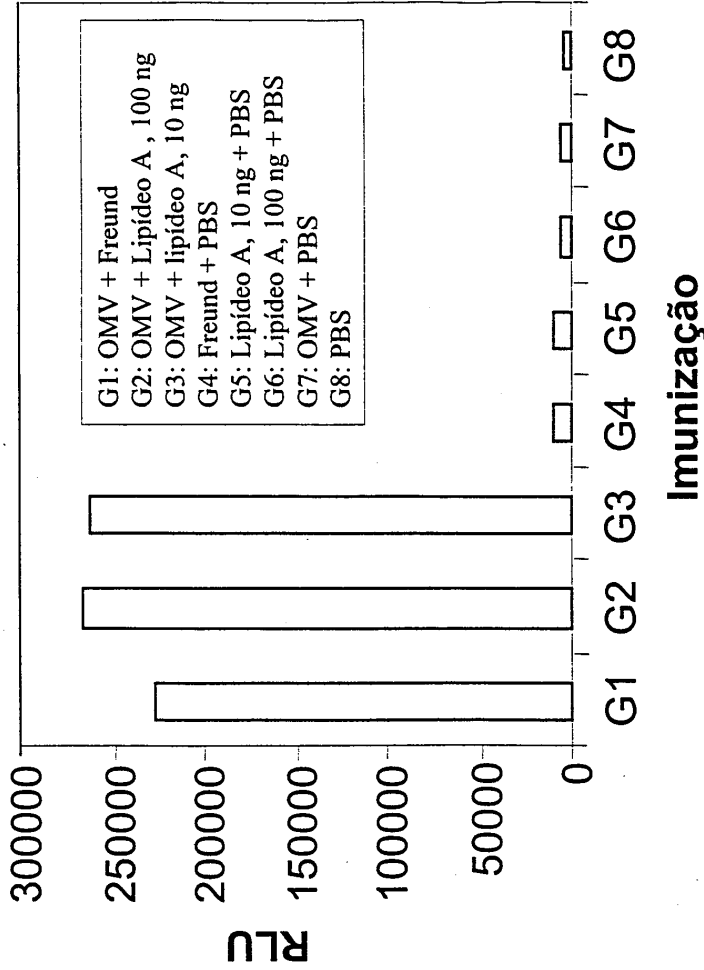


FIGURA 8

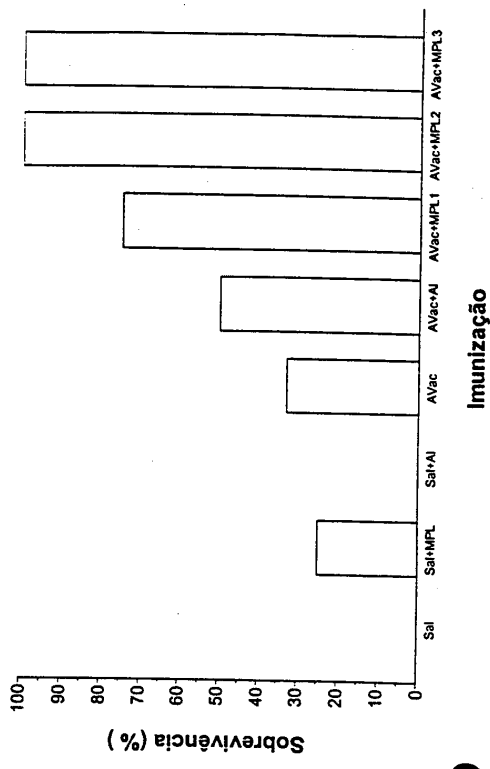
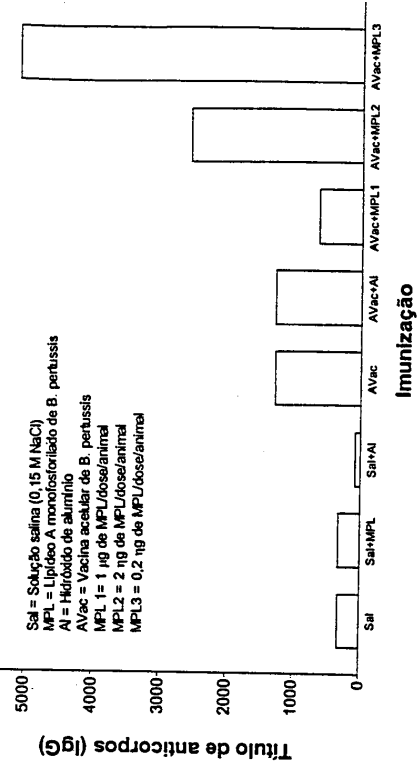


FIGURA 9