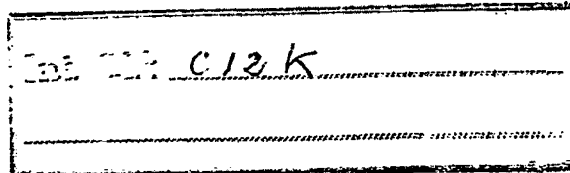


PATENTE DE INVENCION

Case 900-9102

3700/RA/HP



Memoria Descriptiva

sobre:

PROCEDIMIENTO PARA AISLAR LOS COMPONENTES HEMAGLUTININA
Y NEURAMINIDASA DEL VIRUS DE LA INFLUENZA.

433759

Solicitante: SANDOZ, A.G., entidad suiza, residente en Basilea,
Suiza.

La presente invención se relaciona con un procedi-
miento para la producción de vacunas de influenza, en parti-
cular subunidades de vacunas para influenza, mediante solubi-
lización selectiva y aislamiento de los componentes inmunogé-
nicos del virus de influenza.

La figura 1 adjunta es una representación esquemática de la partícula del virus de influenza. El material genético (1), ácido ribonucleico (RNA), asociado con la nucleoproteína de grupo específico (2), está rodeado por una
5 doble membrana consistente en una capa interna de proteína (3) y una capa externa de material lípido derivado del anfitrión (4). Dos glicoproteínas, hemaglutinina (5) y neuraminidasa (6), aparecen como proyecciones o espigas sobre la superficie de la envoltura viral. Con (7) se representa la combinación
10 RNA-polimerasa.

Se ha establecido ahora que las dos glicoproteínas, hemaglutinina y neuraminidasa, son los componentes inmunogénicos principales del virus de influenza, no siendo esenciales para la inducción de inmunidad, todos los otros componentes, incluyendo otras proteínas virales, ácido nucleico y lípidos.
15 Sin embargo, la presencia de tales materiales no esenciales en una vacuna para influenza, puede conducir a efectos secundarios indeseables y, en cualquier caso, limita la dosificación de la vacuna que puede administrarse y, en consecuencia, el
20 nivel de inmunidad que se puede conseguir.

Por lo tanto, la vacuna ideal para la influenza deberá contener los dos inmunógenos esenciales, hemaglutinina y neuraminidasa, en ausencia o ausencia sustancial de los componentes no esenciales de la partícula viral. Los intentos anteriores para separar los inmunógenos de influenza
25 han implicado, como etapa inicial, la disrupción o solubilización prácticamente completa de la partícula viral, por ejemplo con detergentes aniónicos, tales como desoxicolato de sodio o dodecilsulfato de sodio, de modo que toda la porción,
30 o la porción principal, de los componentes virales se libere.

y se ponga en solución con los inmunógenos. Se necesita una posterior purificación o purificación parcial de los inmunógenos deseados, lo cual es muy complicado y laborioso, siendo los rendimientos normalmente bajos.

5 La presente invención proporciona un método para aislar los inmunógenos hemaglutinina y neuraminidasa, que comprende solubilizar selectivamente estos componentes al mismo tiempo que se dejan partículas subvirales residuales consistentes en la membrana intacta de lípido/proteína que
10 envuelve a todos los otros componentes virales no esenciales. La diferencia de tamaño o densidad de los inmunógenos solubilizados y las partículas subvirales residuales, permite la fácil separación de los inmunógenos por los métodos convencionales de separación, utilizando tales diferencias en
15 las propiedades físicas.

 De este modo, se ha encontrado que dicha solubilización selectiva de los componentes hemaglutinina y neuraminidasa, se puede conseguir por tratamiento del virus de influenza con un detergente catiónico.

20 Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para aislar los componentes hemaglutinina y neuraminidasa del virus de influenza, que comprende tratar éste último en un medio acuoso con un detergente catiónico para solubilizar selectivamente tales componentes, y preparar
25 los componentes solubilizados resultantes de las partículas subvirales residuales.

 El método de la invención se puede aplicar adecuadamente a virus de influenza de los tipos A, A1, A2 ó B ó a mezclas de los mismos. La cepa particular empleada dependerá, naturalmente, de la inmunidad deseada de los inmunógenos
30

a aislar, pero como ejemplos se pueden mencionar las siguientes:

5 cepa A2/Aichi/68, MRC-2 (recombinación de tipo A2/ England/
/42/72), MRC-11 (recombinación de tipo A2/Port Chalmers/73),
A/Pasteur/30C ("Mutagrip", Institut Pasteur) y B/Mass/67.

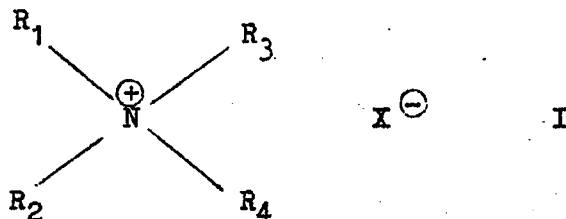
10 El virus de influenza a tratar se multiplica adecuadamente en forma convencional, por ejemplo por inoculación en huevos de pollos embrionados de 11 días de edad e incubación durante un periodo adecuado a una temperatura apropiada, por ejemplo durante 2 días a 37°C. Los fluidos alantoicos
15 recojidos son entonces agrupados adecuadamente y el virus se concentra y purifica por ultracentrifugación seguido por resuspensión del virus, por ejemplo, salina fisiologica tamponada con fosfato, o por centrifugación en una centrifuga
20 zonal de flujo continuo usando, por ejemplo, un gradiente de sucrosa en salina fisiológica tamponada con fosfato, seguido por la disminución del contenido en sucrosa, por ejemplo, a menos del 5 %, convenientemente por diálisis contra salina fisiológica, o por cromatografía Sephadex o dilución. La concentración del virus de partida no constituye un factor crítico y se puede ajustar en función del rendimiento deseado de
25 inmunógenos.

30 El pH del concentrado de virus es convenientemente de 6,5 a 8,5, empleando tampones, tal como tampón fosfato cuando se requiera, antes de la adición del detergente catiónico, y el concentrado se puede también inactivar, por ejemplo por la adición de formaldehído. El detergente catiónico se añade adecuadamente al concentrado de virus en forma de una solución acuosa. La cantidad adecuada de detergente catiónico a añadir dependerá, por ejemplo, del detergente particular

5 empleado. Sin embargo, en general, el detergente catiónico se añade convenientemente en una cantidad tal que la relación en peso de detergente a proteína en la mezcla resultante es de 1:2 a 1:10, en particular de 1:3 a 1:5. Después de la adición, la mezcla se deja reposar adecuadamente, por ejemplo durante un periodo de 30 minutos a 16 horas, a una temperatura de por ejemplo 4 a 37°C, necesitando las temperaturas mayores menores tiempos de reposo. Con preferencia, la mezcla se deja reposar durante 30-60 minutos a temperatura ambiente o durante la noche a 4°C.

10 El detergente catiónico empleado puede ser cualquier detergente catiónico suficientemente activo para solubilizar los componentes hemaglutinina y neuraminidasa, pero insuficientemente activo, bajo las condiciones empleadas para causar la disrupción de la partícula viral entera.

15 Dichos detergentes catiónicos se pueden elegir entre aquellos de la clase bien conocida de fórmula I,

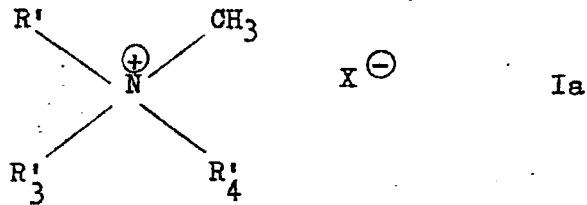


20 en la que R_4 significa alquilo ó arilo, R_1 , R_2 y R_3 , iguales o diferentes, representan alquilo o arilo, ó R_1 y R_2 , junto con el átomo de nitrógeno al cual están unidos, forman un anillo heterocíclico saturado de 5 ó 6 miembros y R_3 significa alquilo o arilo, ó R_1 , R_2 y R_3 , junto con el átomo de nitrógeno al cual están unidos, significan un anillo heterocíclico de 5 ó 6 miembros insaturado en el átomo de nitró-

25

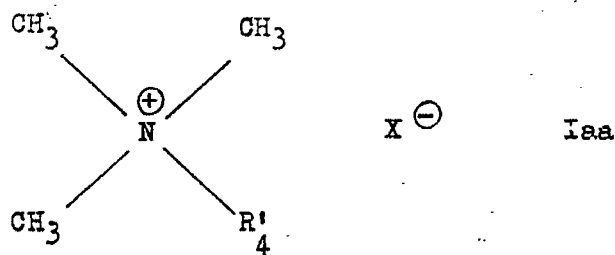
geno, y X significa un anión.

Compuestos representativos de fórmula I incluyen aquellos de fórmula Ia,

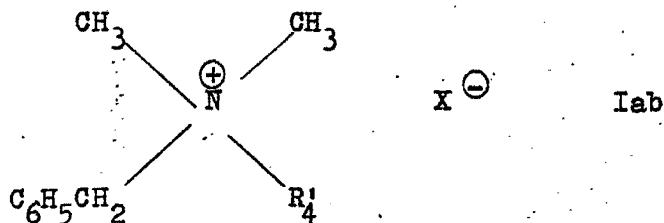


5 en la que X se define como anteriormente, y R'4 significa alquilo de 8 a 22 átomos de carbono y cualquiera de los restos R'1 y R'2 que son iguales o diferentes, representa metilo o alquilo de 8 a 22 átomos de carbono, ó R'1 significa metilo y R'2 significa bencilo; en particular los compuestos de fórmula Iaa,

10

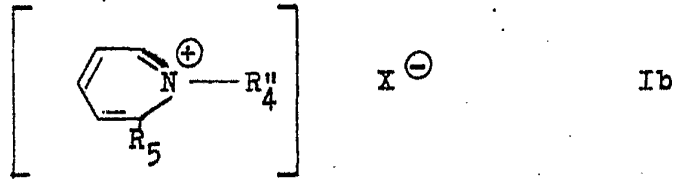


en la que R'4 y X se definen como anteriormente, ó de fórmula Iab,



15 en la que R'4 y X se definen como anteriormente.

Otros compuestos representativos de fórmula I son aquellos de fórmula Ib,



en la que X se define como anteriormente, R_4 significa alquilo de 12 a 18 átomos de carbono, y R_5 significa hidrógeno o metilo, con preferencia hidrógeno.

5

Los radicales alquilo preferidos de 8 a 22 átomos de carbono, contienen de 12 a 18 átomos de carbono. Radicales alquilo preferidos de 12 a 18 átomos de carbono, incluyen laurilo, miristilo, cetilo y estearilo.

10

En las fórmulas anteriores, X significa preferiblemente aniones tales como cloruro, bromuro, sulfato o acetato, en particular cloruro o bromuro.

15

Los compuestos preferidos de fórmula Ia_a incluyen sales de miristiltrimetilamonio y cetiltrimetilamonio, en particular cloruro o bromo, más particularmente los bromuros. Los compuestos preferidos de fórmula Ia_b incluyen sales de estearildimetilbencilamonio, en particular cloruro o bromuro, más particularmente el bromuro. Los compuestos preferidos de fórmula Ib incluyen sales de cetilpiridinio, en particular cloruro o bromuro, más particularmente el bromuro.

20

Otros detergentes catiónicos que se pueden emplear adecuadamente incluyen los cloruros y bromuros de benzalconio, por ejemplo cloruro de bencetonio o cloruro de metilbencetonio, así como agentes tales como el cloruro de decametonio.

25

El detergente catiónico preferido para utilizarse en el proceso de la invención es el bromuro de cetiltrimetilamonio.

Una vez terminado el proceso, los componentes hemaglutinina y neuraminidasa se pueden separar de las partículas subvirales residuales, intactas, empleando métodos convencionales para la separación de materiales que tienen distintos tamaños o densidades, por ejemplo mediante centrifugación en gradiente, utilizando medios de sucrosa o glutanato sódico, seguido por fraccionamiento de los gradientes, por sedimentación, por cromatografía en tamices moleculares ó mediante nodulación en una ultracentrífuga.

La mezcla de inmunógenos producida según el proceso de la invención, es adecuada para utilizarse en vacuas para la influenza. Para esta finalidad, los componentes hemaglutinina y neuraminidasa, aislados como antes se ha descrito, se resuspenden convenientemente en un diluyente convencional, por ejemplo una solución isotónica fisiológica, por ejemplo una solución de cloruro sódico al 0,9 %, opcionalmente tamponada, por ejemplo con tampón fosfato. La sucrosa que permanece tras la purificación del virus inicial o de la separación de los componentes solubilizados, deberá reducirse convenientemente a menos de 5 % en peso en la vacuna, por ejemplo por diálisis. Similarmente, el contenido en detergente catiónico restante deberá eliminarse en gran grado, por ejemplo reducirse a menos de 0,01 % en la vacuna, por ejemplo por diálisis o cromatografía de gel.

Si se desea, se pueden añadir a las vacunas agentes preservantes o inactivantes, tal como formaldehído, en cantidades convencionales, por ejemplo en una relación en peso de 1 a 10.000 partes.

La inmunogenicidad de las vacunas de la invención se puede mejorar también adecuadamente por inclusión de adyu-

vantes inmunológicos convencionales, tales como hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, en cantidades convencionales, por ejemplo por inclusión de 0,2 % de hidróxido de aluminio.

5 Como se ha indicado, las vacunas producidas según la invención son unas vacunas útiles contra los virus de influenza, por ejemplo los mencionados anteriormente, según se demuestra, por ejemplo, por comparación con vacunas de virus totales, que tienen el mismo contenido inmunogénico, en
10 el ensayo de protección del ratón. Grupos separados de 30 ratones se administraron, i.p., con 0,25 ml de vacuna de virus total y vacuna subunitaria de la invención, teniendo cada una de ellas un contenido en hemaglutinina de aproximadamente 2^8 . Se infectaron grupos separados, 3, 4 y 8 semanas después
15 de la inmunización, con un virus virulento mediante aplicación por pulverización. Al noveno día después de la infección, se evaluó en cada grupo la protección contra la mortalidad y contra las lesiones pulmonares. El ensayo se repitió utilizando diferentes contenidos antigénicos en las vacunas. Los
20 resultados indican que las vacunas subunitarias de la invención producen una inmunidad más prolongada contra el virus infectante pero, por otro lado, tiene efectos paralelos a la vacuna de virus total.

 Según sea la utilización variará naturalmente la
25 dosis a administrar. Sin embargo, en general, se obtienen resultados satisfactorios cuando se administra una sola dosis de 9 a 43 unidades internacionales por kilogramo de peso corporal del animal, aproximadamente. Para mamíferos superiores, resulta indicado una dosis simple de 600 a 3.000 unidades
30 internacionales.

La dosis se administra convenientemente por vía subcutánea o intramuscular.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención:

EJEMPLO 1

5 Virus de influenza del tipo antígeno X-31 (recombinación de la cepa A₂/Aichi/68) se multiplica en huevos de pollo embrionados por incubación a 37°C durante dos días. Los huevos se enfrían entonces a 4°C durante la noche y se agrupan los fluidos alantoicos infectados recojidos. El virus se
10 concentra a continuación y se purifica del líquido alantoico infectado por centrifugación en una centrifuga zonal de flujo continuo (modelo RK, Electro-Nucleonics) utilizando un gradiente de sucrosa en salina tamponada con fosfato. El concentrado de virus obtenido después de la reducción del contenido en sucrosa a menos del 5 % por diálisis contra salina
15 tamponada con fosfato en frío, tiene un título de hemáglutina de 1:2¹⁷ y un contenido en proteína de 0,7 mg/cc. Los inmunógenos se disocian añadiendo a la suspensión de virus 1/50 de su volumen de una solución acuosa detergente (bromuro de cetiltrimetilamonio, solución al 1 %). Después de 30-60 minutos (temperatura ambiente) la mezcla de reacción se elabora por centrifugación de gradiente zonal utilizando un gradiente de sucrosa lineal preformado y a continuación se
20 fracciona los gradientes con una bomba peristáltica. La hemaglutinina y neuraminidasa se solubilizan cuantitativamente y están presentes en la parte superior del gradiente, bien separados de las partículas virales residuales que forman un sedimento mucho más rápidamente.

EJEMPLO 2

30 La multiplicación, concentración y disociación del

virus se efectuan del modo descrito en el ejemplo 1. La elaboración se realiza por centrifugación de equilibrio en un gradiente de sucrosa preformado. Después de ajustar el equilibrio, el gradiente se fracciona y ensaya: la hemaglutinina y la neuraminidasa están presentes en la parte más clara del gradiente, bien separados de las partículas virales residuales más densas.

EJEMPLO 3

Se efectua el proceso como en el ejemplo 1 ó 2, excepto que se utiliza la cepa de influenza MRC-2 (recombinación de tipo A₂/England/42/72) ó MRC-11 (recombinación de tipo A₂/Port Chalmers/73).

EJEMPLO 4

Se efectua el proceso como en el ejemplo 1 ó 3, a excepción de que la mezcla de reacción se elabora por cromatografía en tamices moleculares.

EJEMPLO 5

Una solución acuosa (0,5 %) de bromuro de cetilpiridinio se añade a virus de influenza del tipo A/Pasteur/300 ("Mutagrip", Institut Pasteur) que ha sido inactivado con formol hasta una concentración final de 0,02 a 0,1 %. La elaboración se efectua de modo análogo al descrito en el ejemplo 1, 2 ó 4.

EJEMPLO 6

Se efectua el proceso como en el ejemplo 1, 2, 4 ó 5, excepto que se emplea la cepa de influenza B/Mass/67.

EJEMPLO 7

Se efectua el proceso como en el ejemplo 1, 3, 5 ó 6, excepto que la mezcla de disociación se elabora por nodulización en una ultracentrífuga. Esto se puede realizar por

ejemplo en una centrifuga Bechmann L-2-65 B (rotor 60 Ti, 35 000 r.p.m., 90 minutos). Los inmunógenos solubilizados están presentes en la fracción sobrenadante.

EJEMPLO 8

5. Se repite el procedimiento de cualquiera de los ejemplos 1 a 7, pero empleando, en lugar de la solución de bromuro de cetiltrimetilamonio, una solución al 1 % de bromuro de miristiltrimetilamonio, cloruro de bencetonio, cloruro de metilbencetonio, cloruro de decametonio o bromuro de estearildimetilbencilamonio. Se obtienen resultados similares.
- 10.

EJEMPLO 9

Una vacuna de influenza de la invención se puede formular como sigue:

- | | | |
|--|----|------------------------------|
| Mezcla inmunogénica | :- | 700 unidades internacionales |
| 15. Tiomerosal | :- | 1 parte en 10.000 partes |
| Tampón fosfato en 0,9 % de salina fisiológica | :- | a 0,5 ml. |

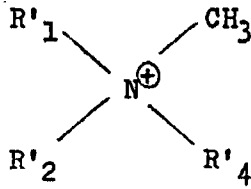
- La mezcla inmunogénica se puede producir según cualquiera de los ejemplos anteriores, por ejemplo la producida en el ejemplo 3 a partir de la cepa de influenza MRC-11 (recombinación de tipo A2/Port Chalmers/73).
- 20.

- Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarse en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental.
- 25.

REIVINDICACIONES

- 1.- Procedimiento para aislar los componentes hemaglutinina y neuraminidasa del virus de la influenza, caracterizado porque comprende tratar el virus de influenza, en un medio acuoso, con un detergente catiónico, adecuadamente un detergente
- 30.

cati6nico de f6rmula Ia:



Ia

5.

en la que X significa un anion, R'4 significa alquilo de 8 a 22 atomos de carbono y cualquiera de los radicales R'1 y R'2, que pueden ser iguales o diferentes, representan metilo o alquilo de 8 a 22 atomos de carbono o R'1 significa metilo y R'2 significa

10.

bencilo, preferiblemente con un detergente cationico de formula Ia en la que R'1 y R'2 significan cada uno metilo, mas preferiblemente con un detergente cationico que es una sal de miristiltrimetilamonio o cetiltrimetilamonio, aadiendose adecuadamente el detergente cationico en una cantidad tal que la

15.

relacion en peso de detergente a proteina en la mezcla resultante sea de 1:2 a 1:10, preferiblemente de 1:3 a 1:5; dejar reposar adecuadamente la mezcla, tal como durante un periodo de 30 minutos a 16 horas, a una temperatura de 4 a 37°C, con preferencia durante 30 a 60 minutos a temperatura ambiente, para solubilizar selectivamente tales componentes; y separar la hemaglutinina y la reuraminidasa solubilizadas resultantes de los componentes sub-virales residuales.

20.

2.- Procedimiento segun la reivindicacion 1, caracterizado porque se separa a continuacion de forma sustancial

25.

cualquier detergente cationico residual de la mezcla resultante de tales componentes.

3.- Procedimiento para aislar los componentes hemaglu-

tinina y neuraminidasa del virus de la influenza, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

30.

Esta Memoria consta de 14 hojas escritas a máquina
por una sola cara.

Madrid, 16 SET. 1976

GOMEZ ACEBO Y MUJICA
P. Firmado: L. García Fernández

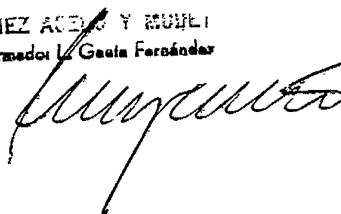
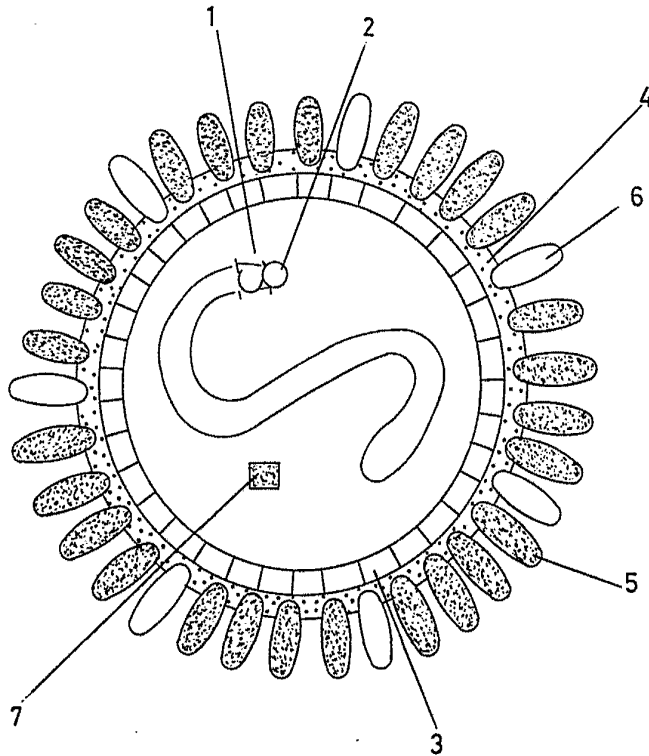


FIG. 1.



LA
VARIABLE

1976

Madrid

BOMEZ ACEBO Y MODET
Firmado: L. Gaitis Fernández