

435323

12 JUL. 1976

CONCEDIDA

Int. Cl.:

PATENTE DE INVENCION

5 Que por veinte años se solicita a favor de SCIENCE UNION ET CIE., SOCIETE FRANCAISE DE RECHERCHE MEDICALE, de nacionalidad francesa, con domicilio en 14, rue du Val d'Or, SURESNES (Francia), y que ha de recaer sobre: "NUEVO PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE PROTEINAS VIRALES".

=====

Memoria Descriptiva

10 El registro de la Patente de Invención que se solicita tiene por objeto garantizar la explotación exclusiva en todo el territorio nacional y sus posesiones de un nuevo procedimiento de obtención de proteínas virales, conforme se describe a continuación.

POOR  
QUALITY

El invento tiene por objeto un nuevo procedimiento de obtención de proteínas virales, en particular par  
tiendo de virus de la gripe.

5 Se sabe que la envoltura de los Myxovirus influenzae contiene por lo menos dos glicoproteínas específicas que pueden ser aisladas bien por acción de detergentes, o bien por acción de proteasas, o bien mediante acción combinada de estos dos tipos de reactivos.

10 Sin embargo, una publicación reciente de Skehel (Nature-New Biology 238 (1972)145) ha demostrado que los tratamientos por una proteasa, si bien aseguran una separación de estos dos elementos constitutivos a partir de la envoltura viral, dan lugar a una degradación completa de la Neuraminidasa viral. La otra glicoproteína o hemaglutinina obtenida  
15 en estas condiciones es parcialmente desnaturalizada, aunque se encuentra bajo forma cristalizada y por este motivo pierde sus propiedades hemaglutinantes.

Ahora bien, se ha observado que era muy interesante el poder aislar estas dos fracciones glicoprotéicas -  
20 purificadas y disponer de ellas, ya que constituyen un material antigénico de gran valor que permite imaginar la realización de una vacunación contra la gripe, bien por administración de hemaglutinina o de neuraminidasa viral solas, o bien recombinando estas dos fracciones glicoprotéicas para  
25 obtener un agente de vacunación dotado de más amplias características antigénicas.

Igualmente, es interesante obtener una neuraminidasa producida por los virus de la gripe bajo una forma suficientemente pura y activa, ya que la neuraminidasa es la fracción  
30 genética más estable del virus gripal. Además, los anti-

cuerpos anti-neuraminidasa viral formados en estas condiciones, aunque no tengan la posibilidad de inactivar el virus de la gripe, tienen, sin embargo, la propiedad de reducir la importancia o la gravedad de la enfermedad gripal o de reducir la proliferación del virus (Kilbourne, J. of Virology 2 (1968) 281 y 778).

El presente invento tiene pues por objeto un nuevo procedimiento de obtención de estas dos fracciones glicoprotéicas de origen viral, que permite obtenerlas en estado puro y asegura su separación sin desnaturalización.

El procedimiento, según el invento, consiste en que se somete el virus gripal previamente purificado, procedente de huevos embrionados infectados o de células de soporte infectadas, a la acción de una enzima o de una mezcla de enzimas proteolíticas obtenidas a partir de cultivos de *Streptomyces fradiae*, se concentran las fracciones que incluyen la neuraminidasa y la hemaglutinina por diafiltración en solución acuosa sobre una membrana de permeabilidad selectiva con estructura reticulada, se recoge la fracción retenida por la membrana de la célula de diafiltración y se somete esta última a un fraccionamiento por medios físicos, para recoger sucesivamente una fracción que contiene esencialmente la hemaglutinina viral y una fracción que contiene esencialmente la neuraminidasa viral.

El procedimiento según el invento, puede también ser definido por los modos de realización siguientes:

1) la enzima o la mezcla de enzimas proteolíticas está constituida principalmente por una proteasa aislada de los cultivos de *Streptomyces fradiae* que contienen por lo menos 5.000 U. Anson/mg.

2) la enzima o la mezcla de enzimas proteolíticas está constituida principalmente por una proteasa aislada de los cultivos de *Streptomyces fradiae*, cepas número 1598 y número 2019 de la colección del *Museum National d'Histoire Naturelle de Paris*.

5

3) la acción de la enzima o de la mezcla de enzimas sobre el cultivo viral tiene lugar a una temperatura que varía de 25° a 45° C.

10

4) la acción de la enzima o de la mezcla de enzimas sobre el cultivo viral se efectúa con un pH variable entre 5 y 8.

5) la acción de la enzima o de la mezcla de enzimas se efectúa durante un tiempo que pueda variar de 1 a 7 horas.

15

6) la concentración de enzima o mezcla de enzimas varía entre 1 y 30 %.

7) la separación de las fracciones protéicas - después de la diafiltración se efectúa por centrifugación en un gradiente de densidad discontinuo.

20

8) el gradiente de densidad discontinuo se obtiene a partir de soluciones de glutamato de sodio con concentraciones variables de 1 a 40 %.

25

9) como variante del procedimiento según el invento, la prolongación de la acción enzimática sobre los cultivos virales arrastra una degradación de la hemaglutinina y permite obtener una sola fracción glicoprotéica que contiene la neuraminidasa viral.

30

10) la cepa de virus gripal utilizada para la siembra es preferentemente la cepa Hong-Kong Virus A<sub>2</sub>/68 (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>), la cepa NWS del virus A<sub>0</sub>, el mutante de la cepa RI/5<sup>+</sup>

del virus A<sub>2</sub>, la cepa A<sub>3</sub>-XL del virus A<sub>2</sub>.

5 El procedimiento es aplicable también a otras cepas del virus de la gripe, tales como por ejemplo el virus humano A<sub>2</sub>/Singapur/1/57; el virus A<sub>2</sub>/Inglaterra/52/64; el virus A<sub>2</sub>/Inglaterra/76/66 o el virus recombinado X-7 (F-1).

10 El invento se extiende también a la neuraminidasa de origen viral obtenida según el procedimiento definido más arriba. Se extiende más particularmente a la neuraminidasa del virus A<sub>2</sub>/Hong-Kong/68 (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) obtenida según el procedimiento descrito más arriba.

15 El invento se extiende también a la hemaglutinina de origen viral obtenida por el procedimiento definido más arriba y más particularmente la hemaglutinina del virus A<sub>2</sub>/Hong-Kong/68 (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) obtenida según el procedimiento definido más arriba.

El invento se refiere igualmente a la aplicación como medicamento de la neuraminidasa de origen viral obtenida por el procedimiento del invento, útil, en particular como agente curativo o preventivo de la gripe.

20 Con esta finalidad, la neuraminidasa obtenida según el procedimiento del invento a partir de cultivo del virus de la gripe se presenta bajo forma de composiciones farmacéuticas tales como por ejemplo las preparaciones sólidas, líquidas o gaseosas para aerosoles.

25 Los ejemplos siguientes ilustran el invento. En manera alguna lo limitan.

#### EJEMPLO I

30 Se inoculan 200 huevos de gallina embrionados de 11 días con 0,2 ml/huevo de suspensión de virus de la gri

pe A<sub>2</sub>/Hong-Kong/68 (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) en líquido fisiológico tamponado con la concentración de 1/1000.

5 Después de 48 horas de incubación, se recogen aproximadamente 900 ml de líquido alantóico infectado que contiene aproximadamente 2050 U./hemaglutinantes y 150 U./neuraminidásicas/ml. Se procede a una primera separación mediante centrifugación a 5000 g durante media hora para eliminar los desechos celulares y las mucoproteínas. La parte líquida que queda en la superficie es centrifugada a continuación a 105.000 g durante dos horas manteniendo la temperatura en la proximidad de 4°C. Los residuos de centrifugación se reúnen y se ponen en suspensión en suero fisiológico. La suspensión así obtenida se somete durante tres minutos a la acción de ultrasonidos (12 kilociclos). Se recoge una suspensión conteniendo 12.000 U. hemaglutinantes /ml y 150 U/neuraminidásicas/ml.

20 Se toman entonces 20 ml de esta suspensión viral y se le añade la proteasa de *Streptomyces fradiae* a razón de 1 mg/ml. Se dejan en contacto a 37°C durante dos horas. A continuación se concentra la mezcla mediante diafiltración en una célula de diafiltración Diaflo que retiene las moléculas de peso molecular superior a 10.000 en presencia de agua destilada.

25 Se recogen así en la célula 9 ml constituidos por una solución concentrada con un contenido de 280 U/neuraminidasa/ml.

30 Se toman en tres veces 7,5 ml de esta solución que se sitúa en tres gradientes discontinuos de 20 ml de soluciones de glutamato de sodio, cuyas concentraciones varían de 50 % a 40 %. Se centrifuga durante 30 horas a 24.000 rpm

manteniendo la temperatura en 10° C. A la salida de la centrifugadora, se recogen fracciones de 1,2 ml que se tratan con un analizador de fracciones fabricado por la firma ISCO, modelo 640.

5                    Se recogen así tres gradientes sucesivos a razón de un gradiente por cada lote y por tanto tres veces 3 ml de la solución que contiene exclusivamente la neuraminidasa. Estos 9 ml incluyen aproximadamente 750 U./neuraminidásicas y corresponden a 20 ml de suspensión viral tratada por -  
10                    la enzima proteolítica. La cosecha de los otros picos permite obtener la hemaglutinina.

                    La actividad neuraminidásica expresada en unidades se determina midiendo la cantidad de ácido neuramínico liberado según el método de Barran modificado por C. Cottex,  
15                    G. Chatot y R. Fontanges, utilizando el suero de potro como sustrato. El porcentaje de hemaglutinina se determina con los métodos de hemaglutinación, utilizando eritrocitos de pollo y humanos O-Rh +.

                    La proteasa de *Streptomyces fradiae* utilizada, responde a las normas analíticas siguientes:

20                    Actividad proteolítica total            7000 U Anson/mg  
                    Actividad proteolítica no  
                    inhibida por el iniprol                5610 U Anson/mg  
                    Actividad proteolítica no  
25                    inhibida por el inhibidor de  
                    tripsina extraído de la soja            5570 U Anson/mg  
                    Contenido de proteínas (método  
                    de Lowry)                                45,7 % en seco  
                    Enzimo-eléctroforesis: presencia preponderante  
30                    del componente 2.

Se obtiene después del cultivo de *Streptomyces frediae* y después de secar los caldos de cultivo mediante adsorción en una resina intercambiadora de iones y elución fraccionada.

5

EJEMPLO 2

Influencia de la concentración de las enzimas sobre la cinética de la liberación de la hemaglutinina y de la neuraminidasa de origen viral.

10

CINETICA ENZIMATICA

15

	Tiempo para obtener el contenido óptimo de hemaglutinina	Tiempo para obtener el contenido óptimo de neuraminidasa	Concentración óptima de enzima
Bromelaine 1 mg/ml (+ 40° C)	3 h	30 mn	1 %
20 Bromelaine 1 mg/ml (+ 37° C)	30 mn	30 mn	1 %
25 Tripsina 1 mg/ml (+ 37° C)	30 mn	30 mn	1 %
$\alpha$ quimotripsina 1 mg/ml (+ 37° C)	30 mn	60 mn	5 %
30 Enzimas obtenidas a partir de <i>S. Frediae</i> 1 mg/ml (+ 37° C)	60 mn	60 mn	10 %

la enzima obtenida a partir de cultivos de *Streptomyces fradiae* es la que permite obtener en un plazo muy corto la liberación máxima de las dos proteínas virales con la menor concentración de enzima.

5

EJEMPLO 3

Influencia del tiempo de contacto de la enzima proteolítica sobre la posibilidad de separación de la neuraminidasa viral y de la hemaglutinina viral después de la centrifugación en gradiente de densidad discontinuo.

10

GRADIENTES DE TARTRATO DE K CON CONCENTRACIONES VARIABLES

ENTRE 1 Y 40 %

Centrifugación: 20 h a 10°C

Depósito 2,5 ml de suspensión viral tratada

15

Tiempo de contacto virus - proteasa	1 H	3 H	5 H	20 H
Bromelaina 1 mg/ml (+ 4°C)			neuramini dasa sola	neuramini dasa sola
Bromelaina 1 mg/ml (+ 37°C)	+			++
Tripsina 1 mg/ml 10 % (+ 37°C)	neuramini dasa sola			+++
Enzimas obtenidas a partir de culti vos de <i>S. Fradiae</i> 1 mg/ml 5% a 37° a 10°	+	+++		+++
	++(30 h de centri- fugación)			

30

+++ separación muy buena de la neuraminidasa y de la hemaglutinina

++ separación media

+ separación parcial

5

EJEMPLO 4

ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS PROTEOLITICAS PARA LIBERAR

NA y HA DEL VIRUS A<sub>2</sub> HONG-KONG

(NA = neuraminidasa y HA = hemaglutinina)

10

Los resultados expresan las cantidades de HA y de NA liberadas con relación a los porcentajes del virus inicial y para un tiempo de contacto virus-protasea óptimo.

	HA liberada	% de NA liberada
15 Bromelaina 4 <sup>o</sup>	x 12	1 %
Bromelaine 37 <sup>o</sup>	x 2	1 %
Tripsina 37 <sup>o</sup>	x 8	5 %
20 $\alpha$ quimotripsina 37 <sup>o</sup>	x 3	2 %
enzimas de S.Fradise brutas 37 <sup>o</sup>	x 5	5 %
Enzimas de S.Fradise purificadas 37 <sup>o</sup>	x 10	8 %

25

Como se vé en esta tabla, las enzimas obtenidas a partir de los cultivos de *Streptomyces Fradise* permiten obtener el rendimiento más elevado en neuraminidasa y en hemaglutinina virales.

EJEMPLO 5

El modo de realización es el del ejemplo 1 ligeramente modificado.

5                   Se inoculan en condiciones parecidas 200 huevos de gallina con una suspensión de virus de la gripe A<sub>2</sub>/Hong-Kong/68 (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>). Después de esos días de incubación, se reco-  
gen 1500 ml de líquido alantóico infectado conteniendo 400 U hemaglutinantes/ml y 350 U neuraminidásicas/ml (correspondien  
10 do a la liberación de 0,107 g de ácido siálico/ml). Se reali-  
zan una doble centrifugación y los residuos de centrifugación se vuelven a poner en suspensión en una solución tampón fos-  
fatada. Se obtienen así 500 ml de suspensión de virus purifi-  
cada conteniendo 12.000 unidades hemaglutinantes/ml y 520 uni-  
15 dades neuraminidásicas/ml (que corresponden a la liberación de 0,157 g de ácido siálico/ml). Se toman fracciones alícuota de esta suspensión y se someten a la acción de la proteasa -  
de *Streptomyces Frediae* a 37° durante dos horas. Estas frac-  
ciones se reúnen y concentran por diafiltración a 60 ml. Esto  
20 60 ml se distribuyen en 6 fracciones de 10 ml depositadas en 6 gradientes sucesivos de glutamato de sodio con concentra-  
ciones variables de 5 % a 40 % adicionadas de 1 % de dodeci-  
lo sulfato de sodio. Después de diafiltración se recogen 60  
ml de suspensión de virus tratada, concentrada y purificada,  
25 conteniendo 48.000 U hemaglutinantes/ml y 710 U neuraminidá-  
sicas/ml (que corresponden a la liberación de 0,212 mg de -  
ácido siálico/ml).

Después de la centrifugación a 60.000 g durante  
30 horas a 15°C, se recogen en 6 veces 144 ml de suspensión  
30 conteniendo 1600 U hemaglutinantes/ml o sea en total 228.000

y 48 ml de suspensión conteniendo 310 U neuraminidásicas/ml, o sea en total 13.800 U neuraminidásicas.

5 A continuación, las suspensiones se fraccionan en una columna de sephadex G 15 destinada a retener las impu  
rezes tales como el glutamato de sodio y el dodecil sulfato de sodio. Las fracciones obtenidas después de la elución tie  
nen actividades sensiblemente idénticas a las que se mencio  
nan más arriba.

10 Finalmente, a partir de 1.500 ml de líquido alán  
tíco infectado es posible obtener un rendimiento elevado en -  
una fracción hemaglutinina purificada y una fracción neurami  
nidásica purificada.

15 La presencia de dodecil sulfato de sodio con una  
concentración de 1 % en el gradiente de glutamato de sodio -  
permite separar muy netamente las sub-unidades hemaglutinina  
y neuraminidasa. La fracción hemaglutinina es recogida en las  
primeras fracciones de elución de la columna de sephadex G 15  
la neuraminidasa se obtiene en las fracciones siguientes ase  
gurando así una separación muy neta.

20 La electroforesis sobre gel de poliacrilamida  
y coloración con azul de Coomassie al 0,25 % indica para la  
neuraminidasa una banda única que corresponde a un solo tipo  
de polipeptida y para la hemaglutinina la existencia de dos  
cadenas polipeptídicas.

25 El espectro infra-rojo de la neuraminidasa (KBr)  
está caracterizado por una fuerte banda de absorción a  $3.333$   
 $\text{cm}^{-1}$  ( $-\text{NH}_2$  y  $\text{NH}$ -monosustituído) indicando la presencia de ca  
denas polipeptídicas, una reducida banda a  $2.849$   $\text{cm}^{-1}$  que co  
rresponde a las vibraciones de valencia de  $-\text{CH}_2-$  y una banda  
30 ancha cuyo máximo se sitúa a  $1.613$   $\text{cm}^{-1}$  que reúne de manera

verosímil las absorciones de los carbonilos, de las amidas primarias y de las amidas secundarias, una absorción más reducida a  $1.379 \text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{CH}_3$ ) y una banda ancha con máximo de absorción a  $1.090 \text{ cm}^{-1}$  que puede ser atribuida a las vibraciones de valencia de los C-OH de los polisacáridos.

El espectro infra-rojo de la hemaglutinina difiere bastante poco del de la neuraminidasa. Sin embargo el pico a  $2.849 \text{ cm}^{-1}$  es mucho más importante que en el espectro de la neuraminidasa. Además, la existencia de una elevación en  $2.778 \text{ cm}^{-1}$  traduce la presencia de vibraciones de valencia de los O-H unidos.

#### NOTA DE REIVINDICACIONES

Se reivindica como de propia y nueva invención, a favor de SCIENCE UNION ET CIE., SOCIETE FRANCAISE DE RECHERCHE MEDICALE, con domicilio en 14, rue du Val d'Or, SURESNES (Francia), lo especificado en las siguientes reivindicaciones

1.- Nuevo procedimiento de obtención de proteínas virales a partir de virus de la gripe, caracterizado porque se someten cultivos de virus de la gripe a la acción de una enzima o de una mezcla de enzimas proteolíticas obtenidas a partir de cultivos de *Streptomyces fradiae*, se concentran las fracciones que contienen la neuraminidasa y la hemaglutinina mediante diafiltración en solución acuosa sobre una membrana con permeabilidad selectiva de estructura reticulada, se recoge la fracción retenida por la membrana de la célula de diafiltración y se somete ésta aun fraccionamiento por medios físicos para recoger sucesivamente una fracción que contiene esencialmente la hemaglutinina viral y una fracción -

que contiene esencialmente la neuraminidasa viral.

2.- Nuevo procedimiento de obtención de proteínas virales, según la reivindicación 1, caracterizado además porque los modos de realización preferidos son los siguientes:

5

a) la enzima o la mezcla de enzimas proteolíticas está constituida principalmente por una proteasa producida por los cultivos de *Streptomyces fradiae* con una concentración de por lo menos 5.000 U Anson/mg;

10

b) los cultivos de *S. fradiae* son los que se obtienen a partir de cepas depositadas en el Muséum National - d'Histoire Naturelle de Paris bajo los números 1998 y 2019;

15

c) la acción de la enzima o de las enzimas sobre el cultivo viral tiene lugar a una temperatura que varía de 25° a 45° C.

d) la acción de la enzima o de las enzimas sobre el cultivo viral se efectúa con un pH que varía de 5 a 8;

20

e) la acción de la enzima o de las enzimas sobre el cultivo viral se efectúa durante un tiempo que varía de 1 a 7 horas;

f) la concentración de enzima o de enzimas de *Streptomyces fradiae* varía de 1 % a 30 %;

25

g) la separación de las fracciones protéicas después de diafiltración, se efectúa mediante centrifugación en un gradiente de densidad discontinuo;

h) el gradiente de densidad discontinuo se obtiene por medio de soluciones de glutamato de sodio, cuyas concentraciones varían de 1 % a 40 %;

30

i) el gradiente de densidad discontinuo contiene además un agente tensio activo;

j) el agente tansio activo es el dodecilo sulfato de sodio con una concentración incluida entre 0,5 % y 2 %.

k) la cepa de virus gripal es la cepa Hong-Kong Virus A<sub>2</sub>/68 (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>).

5

3.- "NUEVO PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE PROTEINAS VIRALES".

Tal y como se deja descrito en la memoria precedente, que consta de quince hojas foliadas y mecanografiadas por una sola de sus caras.

Madrid, 5 de Marzo de 1.975

P.A. de SCIENCE UNION LT CIE.,  
SOCIETE FRANCAISE DE RECHERCHE  
MEDICALE.

Victor Gal Vega

