

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA
Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

474811

(19) ES	(11)	(10) AI
(21)		
(22)	FECHA DE PRESENTACION	
	4-11-78	

5 FEB. 1978
Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

PATENTE DE INVENCION

(30) PRIORIDADES:		
(31) NUMERO	(32) FECHA	(33) PAIS
P 27 50 045.4	9-11-77	Rep. Fed. Alemana
(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	B01D; A 61K	
(64) TITULO DE LA INVENCION		
"PROCEDIMIENTO PARA LA ELIMINACION DE DETERGENTES A PARTIR DE SUSPENSIONES DE ANTIGENOS DE VIRUS QUE LOS CONTIENEN"		
(71) SOLICITANTE (ES)		
BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT		HOE 77/B 025
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
D-3550 Marburg/Lahn, República Federal Alemana		
(72) INVENTOR (ES)		
Dr. Edgar Reichert y Dr. Mirko Majer		
(73) TITULAR (ES)		
(74) REPRESENTANTE		
D. OSCAR DE ELZABURU FERNANDEZ		(P.- 70.130)

La invención se refiere a un procedimiento para la eliminación de detergentes a partir de suspensiones de antígenos de virus que contienen detergentes.

5 El virus de influenza o gripe es de forma esférica. Su superficie está guarnecida con prolongaciones en forma de púas, las llamadas "púas", que confieren al virus un aspecto similar al de un erizo. Posee dos tipos diferentes de púas, la hemoaglutinina y la neuraminidasa.

10 Ambos tipos de púas son glucoproteínas. Ellos solos son responsables de las propiedades inmunizadoras de una vacuna contra la gripe. Todas las demás proteínas de virus carecen de importancia para la inmunización, e incluso mediante aumento del contenido de proteínas de una vacuna pueden influir negativamente sobre su compatibilidad.

15 Por ello es deseable una vacuna contra la gripe que contenga solamente los dos antígenos superficiales. Estos antígenos superficiales pueden separarse selectivamente respecto del virus por medio de un cierto número de sustancias tensioactivas, llamadas detergentes, sin que el cuerpo residual restante del virus sea destruido. Estos cuerpos residuales de virus, por lo demás intactos, pueden separarse mediante ultracentrifugación respecto de las púas remanentes en la porción sobrenadante. Un detergente especialmente bien adecuado y conocido para este aislamiento selectivo de púas es Triton-N-101 (nonilfenoxipolietoxietanol).

20

25

La suspensión de púas, obtenida mediante tratamiento con Tritón-N-101, exenta de cuerpos residuales de virus, contiene también el Triton-N-101. Si las púas obtenidas de esta manera han de ser empleadas para la preparación de una vacuna, es necesario eliminar el Triton-N-101 por razones de compatibilidad y estabilidad.

Han sido descritos ya procedimientos para la eliminación del detergente Triton-N-101 a partir de cargas de desdoblamiento de virus, los cuales son no obstante incómodos, tienen muchas pérdidas o son insuficientes. Así, se propuso una separación de fases después de alcanzar el punto de enturbiamiento mediante el aumento de la concentración de sal. No obstante, dado que la separación no es completa, debe agregarse una etapa adicional, por ejemplo la adsorción a hidróxido de aluminio, la cual no obstante es eficaz de nuevo solamente si el Triton-N-101 está presente en una concentración mínima. Después de la adsorción a hidróxido de aluminio, los antígenos no pueden ser eluidos a continuación sin grandes pérdidas de éste. Así mismo fue descrita ya una precipitación con alcohol. En tal caso, existe no obstante el peligro de que los antígenos sean desnaturalizados. También ha sido mencionada ya la ultrafiltración. Sin embargo, este método puede utilizarse con éxito solamente en el caso de concentraciones de Triton por debajo de la concentración crítica de mices-

las, de aproximadamente 0,01. En caso contrario la concentración debe ser disminuida, por ejemplo mediante dilución, lo que a su vez hace nuevamente la ultrafiltración larga y de muchas pérdidas. La eliminación de Tritón-N-101 por medio de adsorción a glóbulos Bio Beads SM2 (Bio Rad Laboratories, Estados Unidos de América), un copolímero de estireno y divinilo en forma de perlas, es cara. La preparación de los Bio Beads para la adsorción es complicada y no es posible la eliminación de Tritón-N-101, que no está presente en forma de micelas. Por lo tanto, por medio de Bio Beads la concentración de Triton sólo puede eliminarse hasta una concentración de aproximadamente 0,01 %, lo que no es suficiente.

Se ha hallado ahora un procedimiento para la eliminación de detergentes a partir de suspensiones de antígenos de virus que los contienen, que se caracteriza por que los antígenos de virus se precipitan con polietilenglicol a partir de la suspensión de antígenos de virus que contienen detergentes, se recupera por sedimentación el precipitado de antígenos de virus exento de detergente y, si se desea, se le recoge en un disolvente.

El procedimiento se caracteriza además por que se precipita con 6 - 18 %, preferentemente 12 %, de polietilenglicol, y porque el peso molecular del polietilenglicol empleado es mayor de 1.000, preferentemente es

de 6.000.

El nuevo procedimiento puede utilizarse con todas las suspensiones de antígenos de virus, que pueden ser desdobladas con el detergente N 101. Se incluyen entre éstos los virus de influenza o gripe; los virus de parainfluenza o para-gripe y los rhabdovirus, por ejemplo el virus de la rabia. Como detergente es especialmente adecuado el nonilfenoxipolietoxietanol, que en la bibliografía la mayor parte de las veces es denominado Triton-N-101. Triton es la designación de una serie de sustancias tensioactivas, no ionógenas. Se distingue entre una serie X y una serie N. Los compuestos de la serie N, a la que pertenece el Triton-N-101, se forman mediante reacción de nonilfenol con óxido de etileno. El Triton-N-101 es un nonilfenoxipolietoxietanol, significando la sílaba "poli" 9 - 10 grupos etoxi. Sin embargo el procedimiento puede realizarse también con otros detergentes, por ejemplo con Arkopal N 110 (Hoechst), un detergente no iónico, con Hoe S 2407 (Hoechst), un detergente aniónico, con Genamin O-080 (Hoechst), un detergente catiónico, y con Hoe S 1982 (Hoechst), un detergente anfótero.

Como disolvente en el sentido de la invención es adecuada agua así como soluciones tampón acuosas en el margen de pH en el que el antígeno empleado es en cada caso máximamente estable. Por ejemplo, el valor de pH más

favorable para la resuspensión de antígeno superficial de gripe está en aproximadamente pH 7. Las soluciones tampón pueden contener también sales neutras. Se ha acreditado por ejemplo solución de sal común tamponada con fosfato.

5 En el caso de virus de gripe que fueron desdo-
blados con aproximadamente 1% del detergente Triton-N-101, se procede convenientemente separando primeramente median-
te centrifugación los antígenos superficiales separados de la partícula residual inactiva. En tal caso el detergente
10 permanece juntamente con los antígenos superficiales de vi-
rus en la suspensión sobrenadante. Esta es mezclada a con-
tinuación con polietilenglicol, convenientemente con uno
que tenga un peso molecular mayor de 1.000, preferentemen-
te 6.000. Con 12 % de polietilenglicol se consigue en tal
15 caso una precipitación de prácticamente 100 %. Los anti-
genos precipitados son aislados mediante centrifugación y
la porción sobrenadante que contiene detergente es desecha-
da. El Tritón-N-101 no puede ser ya detectado en el pre-
cipitado después de esta etapa de precipitación.

20 Si se desea, la precipitación de los antígenos de virus puede ser repetida en el mismo vaso de centri-
fuga al disolverse el sedimento con una solución tampón y
precipitarse nuevamente con polietilenglicol.

25 No obstante el sedimento puede ser separado
por lavado también con una solución tampón, que contiene

5 por lo menos 1 % de polietilenglicol. Si se disuelve el
sedimento en una solución tampón, la solución obtenida es-
tá exenta de detergente. Las trazas restantes de polieti-
lenglicol pueden ser eliminadas de manera conocida, si se
desea, mediante ultrafiltración a través de membranas con
adecuada anchura de poros. El Tritón-N-101 puede detectar
se según el método descrito por Gareval para Triton-X-100.
El método se basa en la formación de un precipitado de co-
lor azul mediante la reacción de los grupos poli(óxido de
10 etileno) del Triton con cianato de cobalto. El color azul
del precipitado es extraído por medio de dicloruro de eti-
leno y evaluado por fotometría.

15 Los antígenos de virus, liberados de detergen-
te de acuerdo con la invención, pueden ser tratados de ma-
nera conocida para formar vacunas.

Ejemplo 1

20 El virus de gripe A Victoria se reproduce de
manera conocida durante dos días a 35°C en huevos de ga-
llina embrionados. Los líquidos de alantoína que contie-
nen virus son recogidos y mezclados. El virus es purifi-
cado y concentrado mediante centrifugación en gradientes
de azúcar en una ultracentrífuga Elektronucleonics modelo
K2.

25 A un litro del concentrado de virus se aña-

den 10 ml = 1 % de Triton-N-101. Después de reposar durante 3 horas a 4°C son sedimentados durante 1 hora los cuerpos de virus exentos de púas a 53.700 g (g = aceleración de la gravedad). Se desecha el sedimento.

5 A la porción sobrenadante se le añaden 120 g = 12 % de polietilenglicol 6.000. Después de incubación durante 18 horas a 4°C son sedimentadas las púas precipitadas durante 30 minutos a 10.000 rpm. El sedimento es recogido en solución de sal común tamponada con fosfato. Con-

10 tiene los dos tipos de púas del virus, la neuraminidasa y la hemoaglutinina. El Triton ya no puede ser detectado en la suspensión. Como ensayo, sirve el método de Gareval, cuyo límite de detección se encuentra en 0,005 % de Triton-N-101. En sentido inverso, después de la precipitación

15 con polietilenglicol puede volver a hallarse en la porción sobrenadante cuantitativamente el Tritón-N-101 utilizado.

La hemoaglutinina es identificada en el ensayo de difusión radial según Schild frente a suero anti-hemoaglutinina. Por medio de electroforesis a través de gel

20 de poliacrilamida se encuentran tres bandas. Estas pueden asignarse a las dos hemoaglutininas y a la neuraminidasa y son típicas de las glucoproteínas investigadas.

El antígeno de virus aislado de esta manera es administrado en una cantidad de 1 ml sin diluir y en

25 las diluciones de 10^{-1} y 10^{-2} por vía subcutánea en cada

caso a dos conejos. Después de tres semanas se miden las concentraciones o títulos de anticuerpos de inhibición de hemoaglutinación de los sueros de conejos. Estas ascienden a 128, 64, 16, es decir en estas diluciones se llega todavía a una reacción antígeno-anticuerpo.

Ejemplo 2

Tal como está descrito en el ejemplo 1, el virus de gripe B de Hongkong es tratado con polietilenglicol 6.000. Tampoco en el caso de este virus puede ser detectado después de ello ninguna cantidad adicional de Triton-N-101.

Ejemplo 3

Tal como está descrito en el ejemplo 1, virus de sendai, cepa 52, es tratado con polietilenglicol 6.000. Tampoco en el caso de este virus puede detectarse después de ello en el sedimento ninguna cantidad adicional de Triton-N-101.

Ejemplo 4

Virus de rabia cepa Pitman-Moore, reproducido en células diploides humanas cepa WI-38, es tratado tal como está descrito en el ejemplo 1 con Triton-N-101 y a continuación con polietilenglicol. En la suspensión de anti-

genos obtenida no puede detectarse nada de Triton. El antígeno superficial es detectado en la electroforésis como banda típica.

5 Ejemplo 5

El virus de gripe A Victoria es desdoblado durante la noche por medio de 2 % de Triton. En tal caso no sólo son desprendidas las púas, sino que son desdoblados también los cuerpos de virus. Mediante tratamiento de la suspensión, que contiene Tritón, de todos los antígenos de virus - tal como en el ejemplo 1 - se obtiene un sedimento, que contiene todos los antígenos de virus, pero está exento de Triton.

10

15 Ejemplo 6

1 litro de un concentrado de virus - obtenido como en el ejemplo 1 - del virus de gripe A Victoria es tratado con 10 g de Arkopal N 110. Después de la precipitación por medio de 12 % de polietilenglicol no puede detectarse en la suspensión de antígenos nada de Arkopal N 110.

20

Ejemplo 7

Se utilizan análogamente los detergentes Hoe S 2407, Genamin O-080 y Hoe S 1982. En todos los ensayos,

25

después de la precipitación con polietilenglicol, no puede detectarse ninguna cantidad adicional de detergente.

Ejemplo 8

5 Tal como está descrito en el ejemplo 1, son precipitadas las púas del virus de gripe A Victoria con polietilenglicol 1.550, con polietilenglicol 4.000, con polietilenglicol 20.000 y 10 con polietilenglicol 40.000.

En todos los ensayos el sedimento contiene los antígenos de virus exentos de detergentes.

Ejemplo 9

15 Tal como está descrito en el ejemplo 4, son precipitados los antígenos del virus de rabia cepa Pitman-Moore, obtenidos por medio de Triton-N-101 con polietilenglicol 1.500, con polietilenglicol 4.000, 20 con polietilenglicol 20.000 y con polietilenglicol 40.000.

En todos los ensayos el sedimento contiene los antígenos de virus exentos de detergentes.

25

31108

REIVINDICACIONES

5

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

10

1ª.- Procedimiento para la eliminación de detergentes a partir de suspensiones de antígenos de virus que los contienen, que se caracteriza porque se precipitan con polietilenglicol los antígenos de virus a partir de la suspensión de antígenos de virus que contiene detergentes, se obtiene el precipitado de antígenos de virus exento de

15 detergentes mediante sedimentación y, si se desea, se le recoge en un disolvente.

15

2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, que se caracteriza porque como disolvente se emplea agua o una solución tampón acuosa.

20

3ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, que se caracteriza porque se precipita con 6 - 18 %, preferentemente 12%, de polietilenglicol.

25

4ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, que se caracteriza porque el peso molecular del polietilenglicol empleado es mayor de 1.000, preferentemente es

de 6.000.

5ª.- PROCEDIMIENTO PARA LA ELIMINACION DE DE-
TERGENTES A PARTIR DE SUSPENSIONES DE ANTIGENOS DE VIRUS
QUE LOS CONTIENEN.

5 Tal y como se ha descrito en la Memoria que an-
tecede y para los fines que se han especificado.

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

10

Madrid, 04.NOV.1978

P.A.

Oscar de Elzaburu
Per [illegible]

15

20

25

31108

MPB.-