

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

| | | |
|---------|---|---------|
| (19) ES | (11) NUMERO 476.147 | (10) A1 |
| (21) | (23) FECHA DE PRESENTACION 19-DICIEMBRE-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

| | | |
|------------------------|------------|-----------------|
| (20) PRIORIDADES: | (22) FECHA | (23) PAIS |
| (21) NUMERO 862.265 | 20-12-1977 | ESTADOS UNIDOS. |

| | | |
|--------------------------|--|--|
| (47) FECHA DE PUBLICIDAD | (51) CLASIFICACION INTERNACIONAL C12K | (62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA |
|--------------------------|--|--|

| |
|--|
| (64) TITULO DE LA INVENCION " UN METODO DE OBTENCION DE UN COMPLEJO INMUNOGENICO ANTIGENICO " |
|--|

| |
|---|
| (71) SOLICITANTE (S) MERCK & CO., INC. |
|---|

| |
|---|
| DOMICILIO DEL SOLICITANTE 126 East Lincoln Avenue, RAHWAY, New Jersey - ESTADOS UNIDOS |
|---|

| |
|--|
| (72) INVENTOR (ES) YASHWANT D. KARKHANIS y DENNIS J. CARLO/ |
|--|

| |
|-------------------|
| (73) TITULAR (ES) |
|-------------------|

| |
|---|
| (74) REPRESENTANTE DON BERNARDO UNGRIA GOIBURU |
|---|

CM.-

1 unas 30.000-50.000 g durante unos 15 minutos a 1 hora apro-
 ximadamente. En general se emplean tiempos más largos a va-
 lores menores de g y tiempos más cortos a valores mayores.
 El líquido que sobrenada resultante de la centrifugación se
5 trata después para separar el ARN y el ADN. Esto puede conse-
 guirse por digestión enzimática, v.g. RNasa y DNasa. La mez-
 cla digerida se somete a un tratamiento eficaz para fraccio-
 nar las moléculas de acuerdo con su peso molecular. Como
 ejemplos de estos tratamientos podemos citar la filtración
10 por gel, la ultrafiltración, la ultracentrifugación a gran
 velocidad o la separación por gradiente de densidad. La fil-
 tración por gel es un método especialmente adecuado para es-
 te fraccionamiento. La fracción antigénicamente activa pro-
 cedente del fraccionamiento de pesos moleculares es el com-
15 plejo no tóxico e inmunogénico deseado de esta invención.

 El complejo antigénico tiene un peso molecular de
 9.200.000 a 9.500.000 aproximadamente, y está constituido
 esencialmente por varias sub-unidades cuyo peso molecular
 oscila entre 100.000 y 10.500 aproximadamente. Hay presentes
20 cinco bandas principales en cantidades aproximadamente igua-
 les de pesos moleculares 68.000, 50.000, 34.000, 27.000 y
 10.500 aproximadamente. Estas cinco bandas constituyen más
 del 80 % del complejo. Calculado sobre el peso seco, el anti-
 geno contiene alrededor de 90 a 95 % de proteínas (método de
25 Lowry empleando seroalbúmina bovina como patrón), no más de

1 alrededor del 10 % de lipopolisacárido y típicamente no más
de alrededor del 5 % (Perry y colaboradores, Can J. Biochem.,
53, 623 (1975)), aproximadamente un 2 % de hidratos de carbo-
no y menos del 1 % de ARN, ADN y fosfolípidos. El ARN y el
5 ADN se analizaron por el procedimiento de Schneider, Methods
Enzymol., 3, 680 (1957) y los fosfolípidos por el procedimiento
de Ames, Methods Enzymol., 8, 115 (1966).

El complejo inmunogénico antigénico procedente de la su-
perficie celular de N. gonorrhoeae puede ser esterilizado por
10 filtración o tratamiento con productos químicos tales como
timerosol, fenol, formaldehído y similares y subdividido en
una vasija adecuada para su distribución y administración
como vacuna. Puede ser administrado en un medio fisiológica-
mente aceptable adecuado tal como, por ejemplo, agua para
15 inyección, suero salino, suero salino tamponado con fosfato
y similares. Puede combinarse con coadyuvantes como, por
ejemplo, los descritos en la patente estadounidense 3.983.228
concedida el 28 de Septiembre de 1976, y vehículos, v.g.
alumbre.

20 Los siguientes ejemplos ilustran esta invención pero
sin limitarla.

EJEMPLO 1

Se utiliza un cultivo de N. gonorrhoeae, cepa Melvin,
ATCC 31356, para inocular un cultivo de agar durante la no-
25 che. Las células que crecen en el cultivo de agar se utilizan

1 para inocular un matraz de 2 litros que se cultiva durante
la noche y su contenido se emplea para inocular un fermentador de 14 litros que se cultiva durante la noche; el contenido del fermentador se emplea para inocular un fermentador de 200 litros que contiene medio de Frantz [J.Bact., 5
43, 757 (1942)]. La fermentación se realiza a una temperatura de 37°C y se interrumpe cuando las bacterias alcanzan su fase estacionaria de desarrollo. Al caldo de fermentación se agrega timerosol a una concentración de 1:10.000. Las
10 células se centrifugan en una centrifuga Sharpless y la pasta celular se recoge.

Se homogeneizan aproximadamente 30 g de pasta celular en 100 ml de tampón Tris-HCl en una Omni-mixer Sorvall durante 1-2 minutos, colocada en la posición 2. La mezcla se pasa a un matraz y el matraz de homogeneización se lava con 100 ml
15 adicionales de tampón Tris-HCl. La mezcla se agita a 4°C durante 15 horas. Después de extraer, el material se centrifuga a 39.100 g durante 30 minutos en una centrifuga Sorvall RC-2 y se desprecia el residuo. El líquido que sobrenada se hace
20 20 mM en MgCl₂ y se trata con RNasa y DNasa (10 µg/ml) a 37°C, durante 45 minutos. El material digerido se aplica a una columna cromatográfica de agarosa A-1.5 y las fracciones recuperadas de la columna se analizan para determinar la presencia de material antigénico por la técnica de inmunodifusión de
25 Ouchterlony, empleando el anticuerpo obtenido como se describe

1 en el Ejemplo 2. Se reúnen las fracciones que contienen el
material antigénico y se aplican a una columna cromatográfica
de Sepharose 6B. La columna se eluye con tampón de bicarbona-
to amónico 50 mM, pH 8,5 y las fracciones se analizan para
5 determinar la presencia de material antigénico, como se ha
indicado antes. La fracción activa produce 100 mg de un com-
plejo no tóxico antigénico e inmunogénico, con una pureza del
90-95 %.

EJEMPLO 2

10 Unas células vivas de N. gonorrhoeae, cepa Melvin, ATCC
31356, se inoculan intravenosamente en un grupo de 4 ratones
blancos de Nueva Zelanda. El método consiste en la inoculación
intravenosa en los días 1, 3, 10 y 14 y sangría 7 días más
tarde. A continuación sigue un periodo de descanso de 1 mes,
15 después del cual los animales reciben dos inyecciones adicio-
nales los días 3 y 7, con sangría 9 días más tarde. Se obtie-
nen sueros con buena actividad anticuerpos.

El antisuero contra el preparado de antígeno purificado
del Ejemplo 1 se prepara por inoculación intramuscular en
20 un grupo de 3 ratones. La inoculación inicial consiste en
50-100 µg de antígeno emulsionado en un volumen igual de coad-
yuvante completo de Freund. Unas dosis estimulantes subsiguien-
tes de cantidades iguales de antígeno se emulsionan en un vo-
lumen igual de coadyuvante incompleto de Freund y se adminis-
25 tran intramuscularmente. Las dosis de estimulante se adminis-

1 tran cada 3 semanas. Los conejos se sangran rutinariamente al séptimo y decimocuarto día y reciben un estímulo de antígeno después de la sangría. Se obtienen sueros con buena actividad de anticuerpos después de la segunda inyección.

5 EJEMPLO 3

Se inyectan 250 µg del material antigénicamente activo del Ejemplo 1 en un grupo de 10 ratones macho albinos CD-1 que pesan aproximadamente 10 g. Un segundo grupo de 10 ratones sirve como control. Al cabo de 1 semana, los animales de cada grupo se atacan con 10^7 células vivas de N. gonorrhoeae. Se realizan 50 replicados del procedimiento anterior. Del 90 al 100 % de los animales del grupo de control mueren dentro de las 24 horas mientras que del 90 al 100 % de los animales del grupo que recibe el material antigénico antes del ataque sobreviven.

15 EJEMPLO 4

Se agregan 20 ml de suero salino a 50 mg del complejo obtenido en el Ejemplo 1 y la suspensión resultante se esteriliza por filtración a través de un filtro microporoso de 0,45 micras y se introduce asépticamente en 40 viales de 0,1 ml. Cada vial contiene 0,25 mg de complejo. Los viales se mantienen a -20°C hasta que se utilizan.

20 EJEMPLO 5

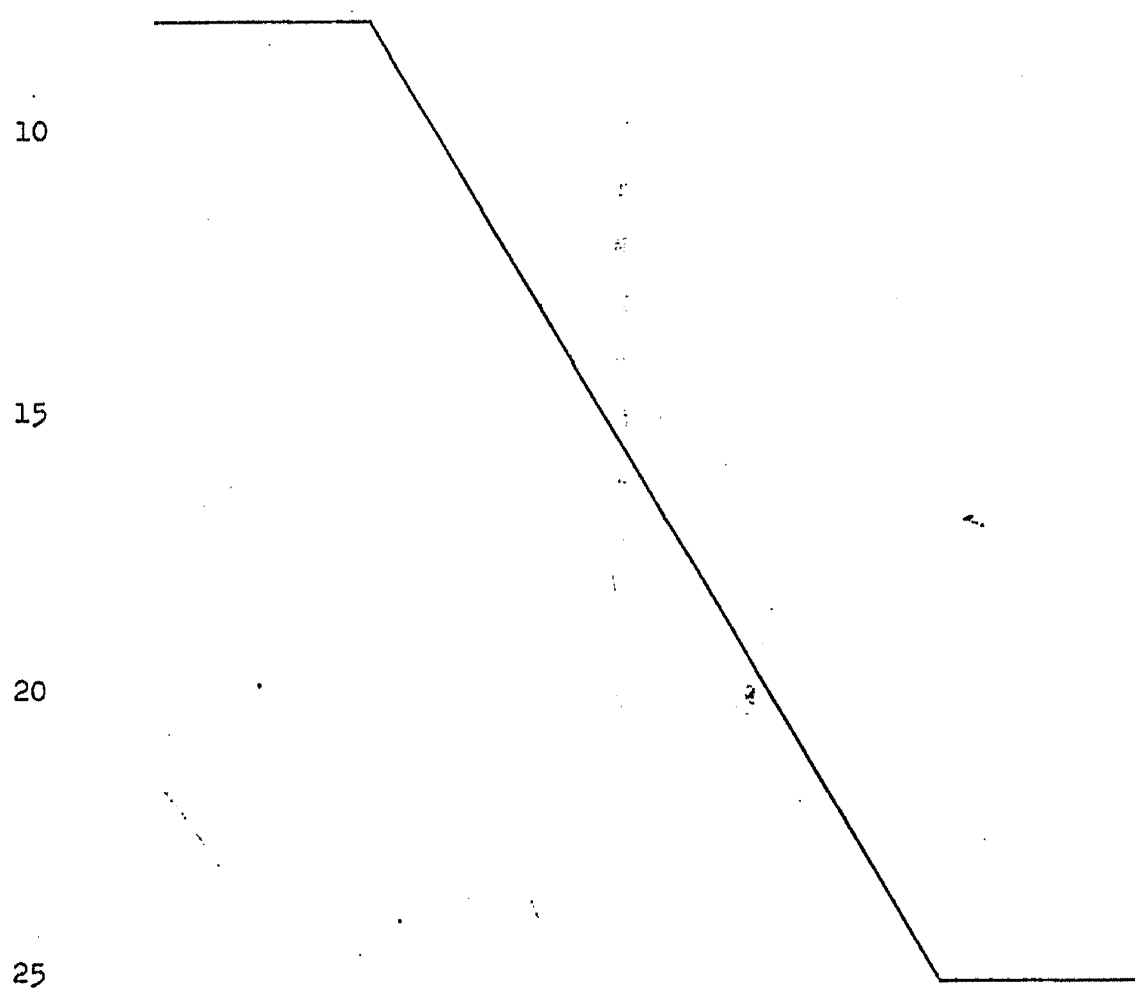
25 Un cultivo (peso húmedo 10 g) de células de N. gonorrhoeae se suspende en 200 ml de LiCl 0,2M. Las células se homogeneizan

1 durante 1 minuto aproximadamente, en la posición 2 de una
Omni-mixer Sorvall. Las células se extraen a 45°C durante
2 horas a 200 rpm en un sacudidor giratorio. El extracto se
centrifuga a 10.000 rpm (9000 g) y el líquido que sobrenada
5 se separa por aspiración. A 580 ml del líquido sobrenadante
recuperado se agregan 117,9 mg de $MgCl_2$, 5,8 mg de DNasa y
0,42 ml de RNasa. La mezcla resultante se agita durante 30
minutos a 37°C en un sacudidor rotatorio en baño de agua, en
la posición 3. Después la mezcla se dializa durante la noche
10 con dos cambios de agua. El líquido dializado se liofiliza pa-
ra dar 769,72 mg de extracto gonocócico crudo. El extracto
liofilizado se disuelve en 770 ml de agua destilada, se agita
y se centrifuga a 13.000 rpm durante 30 minutos. Después el
líquido que sobrenada se aplica a una columna de Agarosa A-5m
15 y la columna se eluye con NaCl 0,15M. Se reúne el material
eluido de la columna con una adsorción a 230 nm se dializa y
se liofiliza para dar el complejo gonocócico purificado.

Cuatro grupos de ratones se vacunan subcutáneamente con
250 µg del antígeno gonocócico purificado. Un quinto grupo
20 de ratones sin vacunar sirve como control. Ocho días después
de la vacunación, los ratones se atacan con 1×10^7 células
vivas virulentas de N. gonorrhoeae. El porcentaje de protec-
ción se determina observando el número de supervivientes al
cabo de 48 horas. Se obtienen los siguientes resultados:

25

| | <u>Grupo</u> | <u>Núm. en el grupo</u> | <u>Núm. de muertes</u> | <u>Protección, %</u> |
|---|--------------|-------------------------|------------------------|----------------------|
| 1 | 1 | 10 | 0 | 100 |
| | 2 | 10 | 0 | 100 |
| | 3 | 7 | 1 | 90 |
| 5 | 4 | 10 | 2 | 80 |
| | 5 (control) | 10 | 8 | 20 |



En resumen, la presente Patente de Invención que se solicita deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

5 1.- Un método de obtención de un complejo inmunogénico antigénico, procedente de la superficie celular de N. gonorrhoeae, con un peso molecular de 9.200.000 a 9.500.000 aproximadamente, donde más del 80 % del complejo está formado por 5 sub-unidades en cantidades aproximadamente iguales con un peso molecular de 68.000, 50.000,
10 34.000, 27.000 y 10.500 aproximadamente, conteniendo el complejo, calculado en peso seco, alrededor de 90 a 95 % de proteínas, hasta el 7 % aproximadamente de lipopolisacáridos, alrededor del 2 % de hidratos de carbono y menos del 1 % de ARN, ADN, y fosfolípidos, cuyo método comprende:
15 de:

- a) agitar una pasta celular homogeneizada de N. gonorrhoeae durante 10 a 15 horas aproximadamente;
- b) separar los residuos celulares;
- c) someter el extracto homogeneizado a reacción
20 enzimática para separar el ARN y el ADN;
- d) separar una fracción con un peso molecular superior a nueve millones aproximadamente.

2.- Un método según la Reivindicación 1, donde el residuo celular se separa por centrifugación.

25 3. Un método según la Reivindicación 2, donde la

centrifugación se realiza a 30.000 g-50.000 g aproximadamente.

4.- Un método según la Reivindicación 2, donde el ARN y el ADN se separan por tratamiento con un enzima.

5 5. Un método según la Reivindicación 1, donde la fracción se separa por filtración con gel.

6.- Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita: "UN METODO DE OBTENCION DE UN COMPLEJO INMUNOGENICO ANTIGENICO".

10

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente Memoria Descriptiva que consta de once páginas mecanografiadas.

15

Madrid, 19 de Diciembre de 1978

BERNARDO UNGRIA

D. U.

20