

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

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

19 ES	11	21	23	10 AI
NÚMERO		8 57 15		
FECHA DE PRESENTACION		6-11-79		

PATENTE DE INVENCION

50 PRIORIDADES:	52 FECHA	53 PAIS
51 NUMERO		
P 28 48 965	11-11-78	Rep. Federal Alemana

47 FECHA DE PUBLICIDAD	61 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C07C 7/00 // A61K 39/02	

54 TITULO DE LA INVENCION
"PROCEDIMIENTO MEJORADO PARA LA PREPARACION DE PROTEINAS DE MEMBRANAS".

71 SOLICITANTE (S)	(HCE 78/B 018)
BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT	

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
D-3550 Marburg/Lahn, República Federal Alemana

72 INVENTOR (ES)
Dr. Torsten Bertil Helting y Dr. Gerhard Guthörlein

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE	(P.- 73.174)
DON FERNANDO DE ELZABURU MARQUEZ	

POOR QUALITY

La invención se refiere a un procedimiento mejorado para la preparación de proteínas de membranas a partir de *Neisseria meningitidis*, así como una vacuna que contiene estas proteínas de membranas.

5 El agente patógeno de la Meningitis cerebrospinalis epidémica es la *Neisseria meningitidis*, llamada también meningococo. La rigidez de la nuca o la inflamación de la meninge transmisible por infección por las gotitas de saliva aparece sobre todo en niños y personas que habitan en barrios de gran hacinamiento. Existe por lo tanto una necesidad de
10 inmunizar a los grupos de personas expuestas al peligro.

Según los conocimientos presentes la proteína de membranas más importante (major outer membrane proteín) de la *Neisseria meningitidis* es capaz de inducir anticuerpos bactericidas. Estos ofrecen una protección serológicamente
15 específica de tipo contra la enfermedad. Otros componentes de las *Neisserias*, especialmente los polisacáridos encapsulados de los grupos A y C de las mismas pueden establecer una protección específica de grupo. Sin embargo, ellos no inducen ninguna protección efectiva contra *Neisserias* del
20 grupo B. Asimismo faltan indicaciones de que el polisacárido encapsulado del grupo B pueda inducir tal protección. Por lo tanto las proteínas de membranas de la *Neisseria meningitidis* grupo B son de interés especial..

Para la preparación de una vacuna es necesario

5 obtener en cantidad suficientes proteínas de membranas a partir de *Neisseria meningitidis* grupo B. El procedimiento descrito por Frasch en Bact. 127, 973 - 981 (1976) conduce a un preparado útil. El rendimiento según este procedimiento se encuentra no obstante en el límite inferior, económicamente soportable. La esencia del procedimiento según Frasch consiste en que gérmenes o bacterias de la *Neisseria meningitidis* se lavan primeramente con soluciones salinas (soluciones de CaCl_2 ó LiCl) y el extracto se trata a continuación con desoxicolato. Tal como ya se ha mencionado este procedimiento conduce, no obstante, a un rendimiento malo.

15 Se ha hallado ahora sorprendentemente que el rendimiento puede aumentarse esencialmente si la masa de gérmenes se somete a un tratamiento directo con detergentes. El material obtenido conforme a la invención no se distingue de forma reconocible de preparados de proteínas de membranas según Frasch. Aquél posee las mismas propiedades electroforéticas en soluciones tampón que contienen SDS. Su contenido de endotoxinas es tan comparable con el material obtenido según Frasch como su capacidad de inducir anticuerpos protectores en animales.

20 Objeto de la invención es, por consiguiente, un procedimiento para la preparación de proteínas de membranas a partir de *Neisseria meningitidis*, especialmente la del

grupo B, caracterizado porque se deja reposar aquella con la solución acuosa de un detergente en una concentración de 0,1 % hasta 2 % durante 15 minutos hasta 24 horas, eventualmente con movimiento, se separa el extracto respecto del residuo de bacterias y eventualmente se purifica adicionalmente.

5

10

15

20

5 Como detergente se emplea preferentemente desoxicolato, especialmente en su forma soluble en agua de manera relativamente fácil, de la sal sódica. La concentración del detergente de 0,1 hasta 2 % se refiere al peso del detergente en gramos por volumen en ml. La proporción de masa húmeda de bacterias a la solución de detergente se encuentra ventajosamente en 1 : 3 - 1 : 20, preferentemente 1 : 5 (peso/volumen).

10 Si como detergente se emplea desoxicolato de sodio, éste se utiliza en una concentración de 0,3 % hasta 1 % en una solución acuosa. Como soluciones acuosas entran en consideración sobre todo las soluciones tampón habituales en la práctica bioquímica o microbiológica.

15 Como material de partida se recupera el cultivo de la Neisseria meningitidis que se puede obtener según procedimientos conocidos, y la masa celular se separa de la porción sobrenadante del terreno nutritivo o medio de cultivo. Es ventajosa para ello la centrifugación. El residuo de la centrifuga se suspende en la solución que contiene detergente y se deja reposar durante un cierto tiempo conforme a la invención. Después de ello, el extracto se separa del residuo celular. Igualmente es ventajosa aquí la realización de una centrifugación.

20

25 La temperatura, a la que se realiza la extracción se limita hacia abajo por el punto de congelación de las
10109

soluciones empleadas. El límite superior se deduce de la pérdida de inmunogenicidad de las proteínas de membranas mediante desnaturalización por calor. Por lo tanto, se recomienda trabajar en el margen de temperaturas comprendido entre la temperatura ambiente y aproximadamente 60°C.

El extracto se puede purificar adicionalmente, si se desea. Es conveniente, para ello, someter primeramente el residuo obtenible por ultracentrifugación a una nueva extracción con la solución que contiene detergente y repetir esta extracción de nuevo, si se desea. En tal caso se desecha en cada caso la porción sobrenadante de la ultracentrifugación y el residuo se suspende en la solución acuosa que contiene detergente.

Un enriquecimiento o una purificación es también posible con agentes precipitantes, habituales en bioquímica, para proteínas y correspondientes antígenos. Así el antígeno de *Neisseria meningitidis* puede ser precipitado por adición de por ejemplo 4 partes en volumen de etanol y el precipitado puede volver a recogerse en solución acuosa.

El antígeno de *Neisseria meningitidis*, filtrado en condiciones estériles y eventualmente liofilizado, es adecuado para inducir anticuerpos protectores contra el agente patógeno.

Este antígeno puede ser mezclado con agentes coadyuvantes, aditivos estabilizadores, materiales de carga

o excipientes y sustancias similares, que hallan utilización habitualmente en la preparación de vacunas.

Las proteínas de membranas desarrollan un efecto inmunógeno. Una vacuna que contiene las proteínas de membranas, que pueden prepararse conforme a la invención, en una cantidad eficaz desde el punto de vista de la inmunización constituye en especial el objeto de la invención. La vacuna puede ser administrada en una dosificación de aproximadamente 10 - 200 μ g por dosis.

La invención se explicará más detalladamente con ayuda de los ejemplos siguientes:

Ejemplo 1

300 g de masa de gérmenes (peso en húmedo) de *Neisseria meningitidis*, grupo B, cepa 986, fueron resuspendidos en 1.500 ml de solución de desoxicolato de sodio (0,5% de desoxicolato de sodio en Tris-HCl 0,01 M, pH 8,5, EDTA 0,01 M,)

Tris = tris(hidroximetil)-amino-metano, EDTA = ácido etilendiaminotetraacético, que se había llevado previamente a 60°C, y se mantuvieron durante 15 minutos en un baño de agua (56°C). A continuación se efectuó una centrifugación para la separación de la masa de gérmenes (Rotor Sorvall GSA 10.000 r.p.m). A continuación, el residuo se trató de nuevo tal como anteriormente durante 15 minutos con solución de desoxicolato de sodio y la segunda porción sobrenadante se

reunió con la primera porción sobrenadante después de nueva centrifugación. Las porciones sobrenadantes reunidas se centrifugaron luego en una centrífuga Beckmann L 75 a 40.000 r.p.m. en un rotor 45 Ti durante 60 minutos. El sedimento se suspendió en 150 ml de solución de desoxicolato de sodio y se agitó durante la noche a 4°C.

Para la purificación adicional la suspensión fue calentada al día siguiente en un baño de agua (56°C, durante 15 minutos), se centrifugó de nuevo en la ultracentrífuga tal como anteriormente (rotor 45 Ti 40.000 r.p.m, durante 60 minutos) y el sedimento se resuspendió en 150 ml de solución de desoxicolato de sodio. Para la resuspensión se empleó un dispositivo lavador ultrasónico (ultrasonic Cleaner) de la firma Laboratory Supplies Co., Inc. Hicksville Nueva York, Estados Unidos de América. Partes alícuotas de 50 ml fueron tratadas cada vez durante 3 minutos, con onda sónica y reunidas a continuación. Material en partículas se separó por una centrifugación repetida (rotor Sorvall, SS-34 20.000 r.p.m, durante 20 minutos) y la porción sobrenadante se filtró. A continuación la proteína de membranas se precipitó en condiciones estériles por adición de 600 ml de etanol al 96% y se dejó reposar durante 60 minutos. El precipitado se recuperó por centrifugación (Sorvall, rotor GSA), se lavó una vez con 100 ml de etanol y a continuación se recogió en condiciones estériles en 150 ml de rafinosa al 5% y se agitó durante

la noche a 4°C. Se determinó la densidad óptica (D.O.) del material (a 280 nm) y por adición de rafinosa al 5% se ajustó a $D.O._{280} = 1,2$. Este concentrado se transformó luego de manera habitual en una vacuna. Para la determinación de la densidad óptica se tomó una parte alícuota en condiciones estériles, se precipitó con 1 parte en volumen de ácido tricloroacético (TCA) (al 10 %), el precipitado se lavó en TCA al 5 % y se recogió en KOH 1 M.

Ejemplo 2

50 g de masa de gérmenes se trató tal como en el ejemplo 1, pero en lugar de 0,5 % de desoxicolato de sodio se empleó una solución con 0,1 % de desoxicolato de sodio. El rendimiento fue de 0,8 mg/g de masa celular, mientras que el rendimiento según el ejemplo de realización 1 fue de 2,3 mg/g.

Ejemplo 3

50 g de masa de gérmenes se trató tal como en el ejemplo 1, pero en lugar de 0,5 % de desoxicolato de sodio se empleó una solución con 2,0 % de desoxicolato de sodio. El rendimiento fue de 2,2 mg/g de masa celular, mientras que el rendimiento según el ejemplo de realización 1 fue de 2,3 mg/g.

Ejemplo 4

50 g de masa de gérmenes se trató tal como en el ejemplo 1, pero en lugar de 0,5 % de desoxicolato de sodio en Tris-HCl 0,01 M, EDTA 0,001 M, se empleó 0,5 % de desoxicolato de sodio en a) tampón de fosfato 0,1 M, pH 7,8, b) tampón Hepes (0,1 M, pH 7,8) ó c) tampón de carbonato de sodio 0,1 M, pH 8,5. Los rendimientos varían entre 1,8 mg/g y 2,5 mg/g.

10

Ejemplo 5

Conforme al ejemplo 1 se realizó la extracción con otros detergentes. La siguiente tabla muestra los rendimientos:

15	Detergente	Concen-tración	Rendi- (mg/g peso en húmedo) miento
	Urea	4 M	1,2
	Emulphogen 1 % (GAF Corp.)	1 %	1,3
20	Tween 20	1 %	2,6
	Triton x 100	1%	2,7

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 mejorado para la preparación de proteínas de membranas a partir de Neisseria meningitidis, caracterizado porque se deja reposar con la solución acuosa de un detergente en una concentración de 0,1 hasta 2% en peso/volumen durante 15 minutos hasta 24 horas, eventualmente con movimiento, se separa el extracto respecto del residuo de bacterias y eventualmente se purifica adicionalmente.

15

2ª. Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque como Neisseria meningitidis se emplea una cepa del grupo B.

20

3ª. Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque como detergente se emplea desoxicolato.

4ª. "PROCEDIMIENTO MEJORADO PARA LA PREPARACION DE PROTEINAS DE MEMBRANAS".

25
31109

Tal y como se ha descrito en la Memoria que ante

cede y para los fines que se han especificado.

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

Madrid, 06. NOV. 1979

P.A.

Fernando de Elizaburu
Por Poder.



5

10

15

20

25
31109
EBL.-