CH 638 984 A5

(19) SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

(51) Int. Cl.³: A 61 K 39/095

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

ETH-BIBLIOTHEK ZÜRICH

(12) **PATENTSCHRIFT** A5

(11) **638 984**

(21) Gesuchsnummer: 8306/78

(22) Anmeldungsdatum: 04.08.1978

(30) Priorität(en): 05.08.1977 US 822309

(24) Patent erteilt: 31.10.1983

(45) Patentschrift veröffentlicht: 31.10.1983

(73) Inhaber:
Merck & Co., Inc., Rahway/NJ (US)

(72) Erfinder:
Glen Douglas Graham, Stockton/NJ (US)
William Arthur Sklarz, Edison/NJ (US)

(74) Vertreter:
Bovard AG, Bern 25

(54) Verfahren zum Lyophilisieren von Meningokokken-Vakzinen ohne Aktivitätsverlust.

(57) Das aus N. meningitidis für die Impfung gegen diese Art von bakterieller Meningitidis isolierte, gereinigte Gruppe A Polysaccharid-Antigen wird aus einer isotonen wässrigen Natriumchloridlösung durch Gefriertrocknung im Temperaturbereich von -20 bis -30 °C erhalten. Durch die Lyophilisation in diesem niedrigen Temperaturbereich trocknet das Natriumchlorid/Polysaccharid-Lösungsmittel ohne Herabsetzung des Molekulargewichts, d. h. ohne Aktivitätsverlust.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zum Konservieren von aus Polysacchariden von N. meningitidis der Gruppe A erhaltenen Vakzinen unter Verhinderung einer Herabsetzung des Molekulargewichts, dadurch gekennzeichnet, dass man eine isotone Lösung des Polysaccharids bei einer Temperatur von −20 bis −30 °C bis zum Erreichen eines Feuchtigkeitsgehalts unter 3 Prozent lyophilisiert.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die Lyophilisation bis zu einem Feuchtigkeitsgehalt von weniger als 1 Prozent fortsetzt.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die Lyophilisation bei einem Druck von weniger als 66,6 Pa ausführt.

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die Lyophilisation bei einem Druck von weniger als 26,6 Pa ausführt.

5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man das Polysaccharid vor der Lyophilisation auf eine Temperatur von −30 bis −40 °C abkühlt und mindestens 12 Stunden lang bei dieser Temperatur stehen lässt, und dass man die Lyophilisation bei dieser erniedrigten Temperatur beginnt.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zum Konservieren von aus Polysacchariden von N. meningitidis der Gruppe A erhaltenen Vakzinen unter Verhinderung einer Herabsetzung des Molekulargewichts.

Meningokokken-Meningitis ist eine entzündliche Erkrankung der Gehirn- und Rückenmarkmembranen. Früher nahmen die meisten Fälle von Meningitis einen akuten und tödlichen Verlauf. Durch die Einführung der Therapie mit Antibiotika konnte die Sterblichkeitsrate in früh erkannten Fällen vermindert werden. Trotzdem bleibt aber eine nicht diagnostizierte Meningitis eine tödlich verlaufende Erkrankung. Auch bei der Verabfolgung von Antibiotika ist die Prognose ungünstig, insbesondere bei jüngeren Patienten. Diese negative Progrnose beruht teilweise darauf, dass Kinder von 3 Monaten bis 2 Jahren selten die typischen Krankheitssymptome zeigen. Somit verzögert sich die Therapie mit Antibiotika, die an sich früh einsetzen muss, so lange, bis das Kind hoffnungslos und offenkundig erkrankt ist oder bis die Krankheit durch Laborbefunde bestätigt wird.

Meningokokken-Meningitis ist eine durch die Spezies Neisseria meningitidis hervorgerufene Infektion. Diese Spezies lässt sich in verschiedene serologische Gruppen einteilen, nämlich A, B, C, D usw. Jede dieser Gruppen ist durch ein charakteristisches, kapsuläres Polysaccharid, das mit der Zellwand der speziellen Gruppe assoziiert ist, gekennzeichnet. Es wurde festgestellt, dass dieser aus Polysaccharid bestehende Zellbestandteil bei Einführung in Säugetiere eine Antikörperbildung induziert und somit einen Schutz gegen spätere Infektionen bietet. Derartige Vakzine können aus vollständigen Mikroorganismenkulturen isoliert und nach üblichen Verfahren verabfolgt werden.

Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zum Konservieren von derartigen Vakzinen zur Verfügung zu stellen, bei dem kein Abbau des Molekulargewichts eintritt.

Diese Aufgabe wird durch das erfindungsgemässe, im Patentanspruch 1 definierte Verfahren gelöst.

Im erfindungsgemässen Verfahren wird somit zur Konservierung des Vakzinprodukts eine das Molekulargewicht nicht abbauende Lyophilisationsstufe angewendet. Dies ist von Vorteil, da bekanntlich Polysaccharidprodukte von höherem Molekulargewicht im Vergleich zu Produkten von niedrigerem Molekulargewicht ein grösseres Mass an Immunogenität ergeben.

Die Antigenität oder Aktivität von Meningitidis-Vakzinen erweist sich bei den Polysacchariden der Gruppe A und C als molekulargewichtsabhängig. Das für Meningitidis-Vakzine verwendete Polysaccharidmaterial erweist sich nach Isolation und Reinigung als sehr unstabil. Um seine Aktivität zu erhalten, wird es wie andere biologische Substanzen der Lyophilisation unterworfen. Aus der FR-PS 1 055 841 und der US-PS 3 271 875 ist es beispielsweise bekannt, Substanzen in wässriger Umgebung durch Lyophilisation zu stabilisieren. Bei der Lyophilisation wird die wässrige Umgebung durch Einfrieren zum Erstarren gebracht. Anschliessend wird das Eis durch selektive Sublimation unter vermindertem Druck entfernt. Das gefriergetrocknete oder lyophilisierte Material ist zumeist bei Temperaturen von 0 °C oder darunter stabil und kann bei diesen Temperaturen relativ lange gelagert werden.

Die Gefriertrocknung von Polysacchariden verläuft zwar bei Temperaturen über −20 °C wirksamer, es wurde jedoch festgestellt, dass die bei diesen Temperaturen zu erzielenden kürzeren Trocknungszeiten mit einem offensichtlichen Abfall des Molekulargewichts verbunden sind. Dabei handelt es sich nicht um einen Abbau, bei dem Bindungen gespalten werden. Vielmehr scheint eine Konformationsänderung abzulaufen, bei denen Monomere ein geringeres Volumen einnehmen, so dass das Molekül eine geringere Grösse aufzuweisen scheint. Ferner wurde festgestellt, dass die Assoziierung von Wassermolekülen am Polysaccharid für die Aufrechterhaltung der Polymerkonformation wesentlich ist.

Nach dem erfindungsgemässen Verfahren ist es möglich, das isotone Medium auf einen Feuchtigkeitsgehalt von weniger als 3 Prozent zu lyophilisieren, ohne dass das Polysaccharid entwässert wird und ein anschliessender Abfall des Molekulargewichts auftritt. Dies wird erfindungsgemäss dadurch erreicht, dass die Temperatur des zu lyophilisierenden Materials während der Dauer der Lyophilisation auf −30 bis −20 °C gehalten wird. Bei dieser verminderten Temperatur wird das freie Wasser (Eis) aus dem Salzmedium sublimiert, während gebundenes Wasser, das bei der verminderten Temperatur fester mit dem Polysaccharid assoziiert ist, nicht verflüchtigt wird. Vorzugsweise wird eine sterile Lösung mit einem Gehalt an 1,47 mg/ml Meningokokken-Gruppe A-Polysaccharid und 1,25 Prozent (Gew./Vol.) Natriumchlorid in einer Tiefe von 0,15 bis 0,35 cm lyophilisiert.

Bei der Ausführung des erfindungsgemässen Verfahrens können die Polysaccharid-Vakzine der Gruppe A in Aliquotanteilen von zweckmässiger Grösse aseptisch in entsprechende Ampullen verteilt werden. Die Lösungen in den Ampullen werden zweckmässig auf −40 °C eingefroren und bei dieser Temperatur in einem Fach eines Tablett-Gefriertrockners gelagert. Diese Lagerung vor der tatsächlichen Lyophilisation ist für das erfindungsgemässe Verfahren nicht wesentlich. Dieser Schritt ist jedoch zweckmässig und somit bevorzugt, da dadurch vermieden wird, dass während des restlichen Lyophilisationsverfahrens eine übermässig gekühlte Flüssigkeit erhalten wird.

In der Kammer der Gefriertrocknungsvorrichtung wird zweckmässig ein Unterdruck von weniger als 66,6 Pa eingestellt. Bei Anwendung dieses Drucks werden zufriedenstellende Ergebnisse erzielt. Vorzugsweise beträgt der Unterdruck jedoch weniger als 26,6 Pa, bevor die Temperatur wesentlich über −40 °C steigt.

Wird das isotone Polysaccharidmaterial in eine Lyophilisationsvorrichtung bei einer Temperatur von −30 bis −20 °C und einem Druck von weniger als 66,6 Pa gebracht,

so führt dies zu guten Ergebnissen. Vorzugsweise wird jedoch die Äquilibrierungsstufe angewendet, um das zu lyophilisierende Material auf eine Temperatur unter −30 °C zu bringen. Ferner wird die Anwendung eines verminderten Drucks unter 26,6 Pa bevorzugt. Die Lagerungstemperatur in der Gefriertrocknungsvorrichtung wird auf maximal −30 °C erhöht und konstant gehalten, bis in das sublimierende Eis eingesetzte Thermoelemente während mehr als 2 Stunden einen konstanten Wert anzeigen. Die Unterdruckkammer kann sodann mit einem sterilen Gas belüftet werden, vorzugsweise mit trockenem Argon. Die Ampullen mit dem nunmehr lyophilisierten Vakzin werden zweckmässig verstöpselt. Man erhält ein trockenes, voll aktives gefriergetrocknetes Produkt mit einem Feuchtigkeitsgehalt unter 1 Prozent.

Beispiel 1

2,2 ml einer sterilen wässrigen Lösung mit einem Gehalt an 1,47 mg/ml Gruppe A-Meningokokken-Polysaccharid und 12,5 Prozent (Gew./Vol.) Natriumchlorid werden jeweils in 50 Ampullen von 3,18 cm Durchmesser verteilt. Die Ampullen werden unter Verwendung von geriffelten Stopfen, die einen Austritt von Dampf erlauben, teilweise verschlossen.

Sodann werden die Ampullen auf −40 °C in einem Tablett-Gefrierschrank bis zur Durchführung der Lyophilisationsstufe eingefroren. Die Ampullen werden sodann in ein Fach von −40 °C eines 1,49 m² grossen Tablett-Gefriertrocknungsgeräts gebracht und bei Atmosphärendruck gehalten. Ein Vakuum von weniger als 13,3 Pa wird angelegt, wobei die Temperatur im Fach linear innerhalb von 3 Stunden auf −30 °C ansteigt. Diese Temperatur von −30 °C wird 46 Stunden lang aufrechterhalten. Das Vakzinprodukt erweist sich nach 36 Stunden bei der gegebenen Temperatur im Fach als äquilibriert. Das endgültige Vakuum beträgt 3,06 Pa.

Die Vakuumkammer wird sodann mit sterilem Argon belüftet und die Ampullen werden verstöpselt. Es ergibt sich ein Feuchtigkeitsgehalt von 0,25 Prozent, gemessen unter Verwendung von P_2O_5. Das Molekulargewicht, gemessen unter Bestimmung des Verteilungskoeffizienten bei der Chromatographie an Sepharosegel, entspricht einem Kd-Wert von 0,10. Dies stellt einen Anstieg des Kd-Werts von weniger als 0,05 dar.

Beispiel 2

Aliquotanteile von jeweils 0,44 ml einer sterilen wässrigen Lösung mit einem Gehalt von 1,47 mg/ml Gruppe A-Meningokokken-Polysaccharid und 12,5 Prozent (Gew./Vol.) Natriumchlorid werden in 3744 Ampullen für 10fache Dosen verteilt.

Die partiell verstöpselten Ampullen werden etwa 12 Stunden lang bei −40 °C gelagert. Sodann werden die Ampullen in ein Fach eines 0,75 m² grossen Tablett-Gefriertrocknungsgeräts von −40 °C gebracht und 1 Stunde lang bei Atmosphärendruck bei −40 °C gehalten. Ein Vakuum von weniger als 13,3 Pa wird angelegt. Die Temperatur des Faches wird sodann innerhalb von 3 Stunden linear auf −30 °C angehoben und 24 Stunden lang bei dieser Temperatur gehalten. Das Vakzinprodukt äquilibrierte sich bei dieser Temperatur innerhalb von 15 Stunden. Das endgültige Vakuum beträgt 2,26 Pa.

Der Feuchtigkeitsgehalt beträgt 0,37 Prozent und der Verteilungskoeffizient bei der Chromatographie 0,22.

Beispiel 3

Aliquotanteile von jeweils 0,5 ml einer sterilen Lösung mit einem Gehalt an 110 µg/ml Meningokokken-Gruppe A-Polysaccharid und 0,9 Prozent (Gew./Vol.) Natriumchlorid werden in 92 400 Ampullen für Einzeldosen verteilt.

Die Ampullen werden partiell verstöpselt und bis zur Lyophilisation bei −40 °C gelagert. Sodann werden die Ampullen bei −40 °C in ein Fach von 15,8 m² Grösse eines Tablett-Gefriertrocknungsgeräts von −40 °C gebracht und 1 Stunde lang bei −40 °C gehalten. Ein Vakuum von weniger als 13,3 Pa wird angelegt. Die Temperatur im Fach steigt innerhalb von 3 Stunden linear auf −30 °C. Diese Temperatur wird 46 Stunden lang aufrechterhalten. Nach 36 Stunden ergibt sich eine Äquilibrierung von Fach und Produkt. Das endgültige Vakuum beträgt 3,73 Pa.

Der Feuchtigkeitsgehalt des getrockneten Produkts beträgt 0,6 Prozent. Der Verteilungskoeffizient Kd = 0,29 zeigt einen Anstieg von weniger als 0,10.

Beispiel 4

Aliquotanteile von 2,2 ml einer sterilen Lösung mit einem Gehalt an 1,47 mg/ml Meningokokken-Gruppe A-Polysaccharid werden in 50-Dosen-Ampullen von 3,18 cm Durchmesser verteilt. Die Ampullen werden bei −40 °C eingefroren und in ein Fach eines Tablett-Gefriertrocknungsgeräts von −40 °C gebracht. Die Temperatur des Fachs steigt linear innerhalb von 5 Stunden auf 1 °C. Diese Temperatur wird 15 Stunden lang aufrechterhalten. Das erhaltene Produkt weist einen Feuchtigkeitsgehalt von 0,51 Prozent und einen Verteilungskoeffizienten bei der Chromatographie von Kd = 0,41 auf, was einem Anstieg von weniger als 0,05 entspricht.

Aus den vorstehenden Beispielen ergibt sich, dass der Endpunkt des Feuchtigkeitsgehalts bei einer Verminderung unter 3 Prozent und vorzugsweise unter 1 Prozent erreicht ist. Im allgemeinen wird dies nach 15 bis 48 Stunden bei den angegebenen Temperaturen und Drücken erreicht.