



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 299 213 A7

Erteilt gemäß § 18 Absatz 2

Patentgesetz der DDR

vom 22.10.1983

in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) A 61 K 39/165

DEUTSCHES PATENTAMT

(21)	DD A 61 K / 315 349 2	(22)	04.05.88	(45)	09.04.92
------	-----------------------	------	----------	------	----------

- (71) Sächsisches Serumwerk GmbH Dresden, Herbert-Bochow-Straße 40, O - 8012 Dresden, DE
(72) Dittmann, Sieghart, Prof. Dr. sc. med.; Klamm, Horst, Dr. rer. nat.; Benedix, Armin, Dr. med. vet., DE
(73) Sächsisches Serumwerk GmbH Dresden, Herbert-Bochow-Straße 40, O - 8012 Dresden; Institut für
Hygiene, Mikrobiologie und Epidemiologie, O - 1190 Berlin, DE
(74) Stefan Kehler, Rechtsanwalt u. Patentanwalt, Hübnerstraße 2, O - 8053 Dresden, DE
-

(54) Verfahren zur Stabilisierung eines Lebendvirusimpfstoffes gegenüber Temperatureinwirkung

(55) Lebendvirusimpfstoff; Stabilisator; Aminosäure; Polyhydroxyverbindung; Polysaccharid; Lyophilisation

(57) Es wird ein Verfahren zur Stabilisierung von Lebendvirusimpfstoff gegen Temperatureinwirkung beschrieben. Die Stabilisierung erfolgt durch Zusatz eines Stabilisatorgemisches, das aus Aminosäuren, einer Polyhydroxyverbindung und einem Polysaccharid besteht und durch Wahl einer geeigneten Lyophilisationsbedingung.

Patentanspruch:

1. Verfahren zur Stabilisierung eines Lebendvirusimpfstoffes gegenüber Temperatureinwirkung unter Verwendung eines Stabilisatorgemisches auf Basis von Aminosäuren, Polyhydroxyverbindungen und Polysacchariden, **gekennzeichnet dadurch**, daß der virushaltige Zellkulturüberstand nach der Virusernte mit einem Gemisch aus L-Arginin, Saccharose, Sorbit oder Trehalose und Dextran eines Molekulargewichtes von 40 bis 70 kD im Masseverhältnis 5:2:3 versetzt wird und nach der Lyophilisation höchstens eine Restfeuchte von 0,4 Ma.-% aufweist.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Masse des Stabilisators pro Einerimpfdosis zwischen 20 und 40 mg liegt.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß virushaltiges Zellkulturmedium und Stabilisatorgemisch im Volumenverhältnis 2:3 gemischt werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Stabilisierung eines Lebendvirusimpfstoffes gegenüber Temperatureinwirkung. Das Verfahren ist in der Impfstoffproduktion auch zur Herstellung von Masernlebensvirusimpfstoff anwendbar.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Wäßrige Lösungen von Lebendvirusvakzinen sind als instabil bekannt. Die übliche Technologie, um die Instabilität zu vermindern, ist das Entfernen des Wassers durch Lyophilisation. Aber auch in getrocknetem Zustand verliert diese Vakzine beim Lagern einen Teil ihrer Infektiosität. Die Geschwindigkeit dieses Infektiositätsverlustes ist um so höher, je höher die Lager- und Handhabungstemperatur ist. Es ist deshalb wichtig, ein Maximum an Stabilität für die Vakzine durch die Wahl eines optimalen Milieus für das Virus zu erreichen. Als chemische Komponenten dieses Milieus sind eine Vielzahl von chemischen Verbindungen bekannt. Keine dieser Verbindungen allein oder deren bisher verwendete Mischungen führte zur Herstellung einer Masernvakzine, deren Virusgehalt nach thermischer Belastung 7 Tage bei 37°C weniger als eine logarithmische Titerstufe abfällt, wie es die WHO für diesen Impfstoff fordert.

In Ullmann 4. Auflage, Bd. 21, S. 303 ist die Verwendbarkeit von Aminosäuren als Stabilisatorsubstanz für Virus-Impfstoffe erwähnt. Außerdem ist in Mayr/Bachmann/Bibrack/Wittmann: „Virologische Arbeitsmethoden“, Bd. 2, Jena, 1977, S. 138 die Verwendung von oligomeren und monomeren Polyhydroxyverbindungen sowie Aminosäuren als Stabilisatoren von Viruspräparaten beschrieben. Diese Verfahren werden jedoch nicht den Anforderungen der WHO bezüglich der Thermostabilität des Lebendvirusimpfstoffes gerecht.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es daher, ein Verfahren zur Stabilisierung zu entwickeln, um z. B. der WHO-Forderung für den Masernimpfstoff zu genügen.

Darlegung des Weses der Erfindung

Es wurde überraschenderweise gefunden, daß die Thermostabilität von Virusimpfstoffen in Lösungen von Aminosäuren, Polyhydroxyverbindungen und Polysacchariden beträchtlich zunimmt.

Als Impfvirus wurde z. B. der Masernvirusstamm L 16/SSW verwendet. Das virushaltige Zellkulturmedium, eingestellt auf 10^3 bis 10^6 plaquebildende Einheiten/ml, wird mit einem sterilfiltrierten Stabilisatorgemisch im Verhältnis 2:3 Volumenteilen gemischt. Das Stabilisatorgemisch enthält die Aminosäure L-Arginin (z. B. als Hydrochlorid), die Polyhydroxyverbindung Saccharose, Sorbit oder Trehalose und das Polysaccharid Dextran mit einem mittleren Molekulargewicht von 8 kD bis 140 kD, vorzugsweise 40–70 kD, im Masseverhältnis 5:2:3. Die Masse des Stabilisatorgemisches pro Einerimpfdosis ist zu 20 bis 40 mg festgelegt. Die Mischung von Virus und Stabilisator wird unter sterilen Bedingungen wahlweise zu Einer- (0,5 ml) oder Zehnerimpfstoffdosen (5 ml) abgefüllt und anschließend eingefroren. In der letzten Stufe der Impfstoffherstellung wird das Wasser in der Vakzine durch Lyophilisation entfernt. Die Bedingungen der Lyophilisation müssen so gewählt werden, daß der gefriergetrocknete Impfstoff eine Restfeuchte, gemessen mit der Methode der WHO, von nicht mehr als 0,4% aufweist. Das erfindungsgemäße Verfahren führt durch Zugabe von 50% der Aminosäurekomponente und in reiner Form überraschend zum Erfolg. Der Lebendvirusimpfstoff weist durch das erfindungsgemäße Verfahren nach einer Temperaturbehandlung von 7 Tagen bei 37°C nur einen Abfall des Virustiters von weniger als eine logarithmische Titerstufe auf, was den WHO-Anforderungen entspricht. Der Masernimpfstoff kann einzeln verabreicht werden oder in Kombination mit anderen Virusimpfstoffen (z. B. Mumps- und/oder Rötelnimpfstoff) Anwendung finden. Durch die höhere Thermostabilität bedingt, ist eine Anwendung des Impfstoffs nicht nur in der gemäßigten, sondern auch in der subtropischen und tropischen Klimazone möglich.

Ausführungsbeispiel

Beispiel 1

Das Stabilisatorgemisch wird zusammengesetzt aus: 10 ml 0,5 mol/l L-Arginin-Hydrochlorid (eingestellt auf pH 7,0), 1,05 ml 40% Saccharose, 10,5 ml Infukoll-Infusionslösung 6% (Dextran „70 kD“). Diese Mischung wird sterilfiltriert und 18 ml werden mit 12 ml masernvirushaltigem Zellkulturüberstand vereint. Jeweils 0,5 ml dieser Vakzine werden in Rollrandfläschchen gefüllt (Einerdosis) und anschließend bei -20°C eingefroren. Die Lyophilisation wird 48 Stunden bei 22°C ausgeführt. Die Hälfte der so hergestellten lyophilisierten Masernvakzine wird 7 Tage bei 37°C inkubiert und bis zur Virusgehaltsbestimmung durch ein-Plaqueszählverfahren bei -20°C aufbewahrt. Virustiter vor der Temperaturbehandlung $10^{6,10}$ PBE/ml, Virustiter nach der Temperaturbehandlung $10^{4,29}$ PBE/ml, logarithmische Titerdifferenz: 0,81.

Beispiel 2

Das Stabilisatorgemisch wird zusammengesetzt aus:

10 ml 0,5 mol/l L-Arginin-Hydrochlorid (pH 7,0); 6,3 ml Infukoll 40 (Dextran „40 kD“); 1,05 ml 44,2% Trehalose · 2 H₂O; 4 ml 5,25 mol/l Phosphat-Puffer (pH 7,0). Die Fertigung der Impfstoffdosis erfolgte nach Beispiel 1. Die logarithmische Titerdifferenz nach der Temperaturbehandlung betrug 0,85 Einheiten.

Beispiel 3

Das Stabilisatorgemisch wird zusammengesetzt aus:

10 ml 0,5 mol/l L-Arginin-Hydrochlorid (pH 7,0); 6,3 ml Infukoll 40 (Dextran „40 kD“); 1,05 ml 40% Sorbit; 4 ml 5,25 mol/l Phosphat-Puffer (pH 7,0). Die Fertigung der Impfstoffbasis erfolgte nach Beispiel 1. Die logarithmische Titerdifferenz nach der Temperaturbehandlung betrug 0,92 Einheiten.