

***Stimuly pre výskum a vývoj***

**Názov projektu: Výskum nových finálnych foriem vírusových vakcín s cieľom optimalizácie ich stability a účinnosti**

**Druh projektu: projekt aplikovaného výskumu v odbore bunková biológia a virológia**

**Číslo projektu: MŠSR 3615 / 2010-11**

**Riešiteľ: IMUNA PHARM, a.s.**



Jarková 269 / 17, 082 22 Šarišské Michaľany  
tel.: 051 / 4562 204, fax: 051/4562 300, e-mail: [sekretariat@imuna.sk](mailto:sekretariat@imuna.sk)

**Doba riešenia projektu: 07/2010 – 06/2013**

**Vytvorenie / udržanie pracovných miest vo výskume a vývoji: 3 pracovné miesta**

**Etapy riešenia projektu:**

- |  |                          |
|--|--------------------------|
| <b>1. etapa: Výskum vhodnej kombinácia stabilizátorov pre vakcíny</b>            | <b>07/2010 – 12/2010</b> |
| <b>2. etapa: Výskum vhodnej koncentrácie sacharózovej a bielkovinovej zložky</b> | <b>11/2010 – 12/2012</b> |
| <b>3. etapa: Výskum vhodnej koncentrácie kombinovaných zložiek</b>               | <b>02/2012 – 08/2012</b> |
| <b>4. etapa: Založenie stabilitných štúdií</b>                                   | <b>09/2012 – 06/2013</b> |

**Zodpovedný riešiteľ: Ing. Slavomíra Ondková, PhD.**

**Hlavný cieľ projektu:**

Cieľom projektu je aplikovaný výskum finálnych foriem očkovacích látok z pohľadu stability a účinnosti, na ktorej sa veľkou mierou podieľajú prídavné látky nazývané stabilizátory. Zároveň cieľom je využiť pracovisko na skúmanie stability a účinnosti z pohľadu správania sa antigénnej zložky v tekutom stave, v zakonzervovanej podobe alebo v kritických technologických manipuláciách.

Na pracovisku spoločnosti IMUNA PHARM, a.s. by bolo možné tiež zabezpečiť zvyšovanie vzdelanostnej úrovne mladých vedeckých pracovníkov pre potreby regiónu ako aj pre SR. Nové poznatky získané projektom v značnej miere môžu prispieť k zvýšeniu konkurencieschopnosti firmy na domácom a zahraničnom trhu.

Popis čiastkových cieľov projektu:

Projekt rieši v prvej etape výber vhodných typov stabilizátorov pre následné experimentálne overenie s prihliadnutím na skutočnosť, že kombinácia stabilizátorov nesmie ovplyvniť ich aktivitu a bezpečnosť. Výstupom pre riešenie tejto etapy je doplnenie literárnej rešerše podľa aktuálnych zistení. Zároveň táto etapa rieši úpravu existujúceho priestoru a zabezpečenie technického zariadenia a prístrojov pre úspešné riešenie cieľov projektu a vytvorenie troch nových pracovných miest pre výskumných pracovníkov.

Druhou a treťou etapou je samotné riešenie úlohy t.j. aplikovaný výskum stabilizátorov ako významnej zložky vakcíny, ktoré majú nezastupiteľnú úlohu buď v polotovaroach alebo v konečnej liekovej forme. Táto pozitívna úloha môže však mať aj negatívny vplyv na organizmus s rizikom reakcie organizmu príjemcu na túto pomocnú zložku. Optimalizácia kvalifikácie a kvantifikácie stabilizátorov je významným prvkom v procese zvyšovania kvality a bezpečnosti hotových produktov. Najčastejšie používanými stabilizátormi sú komponenty na báze cukrovej zložky (manitol, sorbitol, sacharóza, laktóza), bielkovinovej zložky (ľudský albumín), aminokyseliny, želatína a pod. Objemové zastúpenie a pomer týchto zložiek môže významne meniť vlastnosti polotovarov na rôznom stupni rozpracovanosti a zásadne ovplyvniť použitie finálneho liečivého prípravku.

Štvrtá etapa rieši stabilitu účinnej zložky produktu ako aj stabilitu finálneho produktu. Testovanie stability účinnej zložky a finálneho produktu sa vykonáva s cieľom zaručiť, že si produkty zachovávajú v závislosti od času vplyvom faktorov vonkajšieho prostredia (teplota, vlhkosť a svetlo) plnú kvalitu, účinnosť a bezpečnosť od okamihu prípravy až do skončenia ich použiteľnosti.

Výstupom projektu bude vhodné zastúpenie stabilizátorov, ich objemový pomer a pilotné produkty určené pre predklinické testovanie a stabilitné štúdie. Výsledky projektu budú verejne prezentované prostredníctvom vedeckých konferencií a publikácií vo vedeckých časopisoch. Zároveň realizáciou projektu sa vytvorí odborný potenciál pre sledovanie trendov v oblasti očkovacích látok ako aj vznik podmienok pre spoluprácu s akademickou sférou.

Financovanie projektu:

Plánovaná výška oprávnených nákladov na projekt: **2 605 000 €**

Vlastné prostriedky: **655 000 €**

Požadovaná dotácia: **1 950 000 € ( 75 %)**

Podiel vlastných prostriedkov: **25 %**

<b>Sumárny rozpočet projektu</b>					
	2010	2011	2012	2013	Celkom
<b>Priama dotácia</b>					
Bežné výdavky	159 615 €	298 215 €	298 215 €	141 955 €	899 000 €
Kapitálové výdavky	1 052 000 €	0 €	0 €	0 €	1 052 000 €
<b>Celkom</b>	<b>1 211 615 €</b>	<b>298 215 €</b>	<b>298 215 €</b>	<b>141 955 €</b>	<b>1 950 000 €</b>
<b>Vlastné prostriedky žiadateľa</b>					
Bežné výdavky	0 €	30 000 €	80 000 €	50 000 €	160 000 €
Kapitálové výdavky	405 000 €	70 000 €	20 000 €	0 €	495 000 €
<b>Celkom</b>	<b>405 000 €</b>	<b>100 000 €</b>	<b>100 000 €</b>	<b>50 000 €</b>	<b>655 000 €</b>

Plánované výstupy riešenia:

<b>Očakávané výstupy riešenia projektu</b>						
<b>Katégória</b>	<b>Výstupy</b>	<b>Rok 2010</b>	<b>Rok 2011</b>	<b>Rok 2012</b>	<b>Rok 2013</b>	<b>Rok 2014</b>
Nové poznatky	Publikácie	0	0	0	3	2
Prezentácia výsledkov	Odborné konferencie	0	0	0	1	0
Pridaná hodnota	Pracovné miesta	3	0	0	0	0

Hlavné realizované výstupy za rok 2010:

*Výsledky za prvú etapu riešenia (07/2010 – 12/2010):*

Prostredníctvom odborných konzultácií a aktuálnych zistení bola doplnená literárna rešerš o vhodnom výbere stabilizátorov s prihliadnutím na skutočnosť, že ich kombinácia nesmie negatívne ovplyvniť ich aktivitu a bezpečnosť. Počas sledovaného obdobia boli ukončené investičné práce na rozšírenie pracoviska výskumu a vývoja pre úspešné riešenie projektu a taktiež sa zrealizoval nákup spotrebného materiálu.

Zároveň, v sledovanom období začalo prebiehať verejné obstarávanie na prístrojové zariadenie, ktoré boli schválené ako kapitálové výdavky projektu.

V súlade s cieľmi projektu boli vytvorené 3 nové pracovné miesta v odbore vedecko-výskumný pracovník.

Hlavné realizované výstupy za rok 2011:

*Výsledky za druhú etapu riešenia (11/2010 – 12/2012):*

V sledovanom období bolo ukončené verejné obstarávanie na prístrojové zariadenia, ktoré boli zmluvným partnerom dodané, nainštalované a odskúšané.

Na základe výskumu vhodnej kombinácie stabilizátorov (forma literárnej rešerše z predošlej etapy) sme začali s experimentálnym overovaním nami stanovených zmien v oblasti stabilizačných zložiek pri výrobe vakcín voči mumpsu a osýpkam s prihliadnutím na skutočnosť, že kombinácia nami zmenených stabilizátorov nesmie ovplyvniť aktivitu a bezpečnosť vakcíny.

Našimi konkrétnymi cieľmi za sledované obdobie bola náhrada ľudského sérového albumínu zmesou aminokyselín a vylúčenie antibiotík z radu pomocných látok.

Doteraz používaným stabilizátorom na báze bielkovinovej zložky vo vakcínach bol ľudský sérový albumín. Ľudský albumín je normálnou zložkou ľudskej plazmy a účinkuje ako fyziologický albumín. Pripravuje sa s maximálnou bezpečnosťou proti vírusom podľa

smerníc Európskeho liekopisu. Pri použití ľudského albumínu je však nemožné úplne vylúčiť riziko prenosu infekcie. Týka sa to aj patogénov dosiaľ neznámeho pôvodu a prenosu niektorých vírusov (parvovírus B19). Z týchto dôvodov je jeho náhrada dôležitým prvkom vo vývoji vakcín.

Prostredníctvom odborných konzultácií a dostupnej literatúry pre optimalizáciu zmesi aminokyselín vzhľadom na typ postranného reťazca aminokyselín (hydrofóbny, bázický, hydrofilný a kyslý), ktorý je dôležitý pri rozpustnosti aminokyselín a všeobecných informácií o použití aminokyselín ako bielkovinového stabilizátora pri výrobe vakcín, sme si svojpomocne vytipovali a pripravili štyri roztoky aminokyselín.

Následne sme v našom experimentálnom výskume nahradili ľudský sérový albumín jednotlivými pripravenými zmesami aminokyselín paralelne vo vakcíne proti osýpkam a vakcíne proti mumpsu. Urobili sme niekoľko experimentov s rovnakými, nami navrhnutými stabilizačnými zmenami a s rovnakými výrobnými podmienkami. Naším cieľom bolo dosiahnuť porovnateľné výsledky s ohľadom stability a účinnosti s kontrolnou vakcínou vyrobenou podľa zaregistrovaných výrobných podmienok, kde je použitý ľudský sérový albumín ako bielkovinový stabilizátor.

Vzhľadom na časovo náročný proces jednotlivých skúšok na overenie stability a účinnosti vakcíny sme po vzájomnej komunikácii s odborníkmi robili/budú robené jednotlivé analýzy experimentálnych vakcín počas štandardného uskladnenia (dlhodobá stabilita, +4/+8 °C) a sťažených skladovacích podmienok (zrýchlená stabilita, +25 °C, vlhkosť 60%) v určitých časových intervaloch.

V prípade doterajších získaných výsledkov z chemických skúšok (vzhľad, vzduchotesnosť, pH, vlhkosť, rozpustnosť, prítomnosť bielkovín a antibiotík), ako pri dlhodobej, tak aj pri zrýchlenej stabilite, sme nezaznamenali výrazne rozdiely oproti kontrole. Naše doterajšie výsledky z titrácií podľa WHO pri dlhodobej stabilite (3.mesiac, 6.mesiac) ukázali, že titer sa nezmenil v porovnaní s hodnotou v 0.mesiaci ako aj v porovnaní s kontrolou. Pri zrýchlenej stabilite hodnota titru sa udržala v rámci akceptovateľného zníženia ( $<10^{1.5}$ ).

V našich výskumných experimentoch sme antibiotiká (neomycín sulfát) vylúčili z výrobného procesu vakcín. Žiadnu mikrobiálnu kontamináciu sme zatiaľ nepozorovali, výsledky vo vzťahu ku sterilite boli negatívne.

Z dosiaľ získaných výsledkov nášho experimentálneho výskumu výrobného procesu vakcín voči osýpkam a mumpsu, kde sme nahradili ľudský albumín nami vytipovanými kombináciami aminokyselín, možno zatiaľ konštatovať, že sa nenarušila stabilita a účinnosť vakcín. Presnejšie informácie o úspechu resp. neúspechu nášho aplikovaného výskumu budeme mať až po ukončení a vyhodnotení všetkých skúšok stabilit.

#### Hlavné realizované výstupy za rok 2012:

*Výsledky za druhú (11/2010 – 12/2012) a tretiu etapu riešenia (12/2012 – 08/2012):*

Našimi konkrétnymi cieľmi za sledované obdobie bol **výskum cukornatej zložky a výskum vhodnej koncentrácie kombinovaných zložiek.**

---

**a) výskum cukornatej zložky**

Doteraz používaným cukornatým stabilizátorom pri výrobe našich vakcín je sacharóza. Jej hlavná funkcia je pri lyofilizačnom procese, kde sa podieľa spolu aj so želatínou na dostatočnom presušení zmesi. V našich experimentoch sme sa pokúsili nahradiť tento disacharid postupne jedným z jeho monosacharidov (glukóza, fruktóza), laktózou a alkoholovým cukrom (manitol, sorbitol). Z odbornej literatúry je známe, že sorbitol a manitol (izomér sorbitolu) sa podieľajú na rýchlom odstránení niektorých prebytočných látok z tela a ovplyvňujú pomalšie hladinu cukru v krvi, čo má pozitívny charakter u mnohých pacientov s príslušnými metabolickými poruchami. Manitol sa používa vo vakcínach kvôli svojim zvlhčujúcim vlastnostiam a nízkej hygroskopickosti (schopnosti pohlcovať vlhkosť).

Roztoky jednotlivých cukrov sme pripravili v rovnakej koncentrácii ako používaný roztok sacharózy (40 %) a použili paralelne v experimentálnej výrobe vakcín proti mumpsu a osýpkam. Naším cieľom bolo urobiť niekoľko opakovaných experimentov s rovnakými stabilizačnými zmenami (zmena cukornatej zložky) a výrobnými podmienkami a dosiahnuť porovnateľné výsledky ohľadom stability s kontrolnou vakcínou (sacharóza ako cukornatá zložka), vyrobenou podľa zaregistrovaných výrobných podmienok.

Doterajšie získané výsledky z chemických skúšok (vzhľad, strata sušením, rozpustnosť, aktuálna acidita, obsah bielkovín, obsah BSA, obsah BET) a sterility v jednotlivých experimentoch (výroba vakcín proti mumpsu a osýpkam s pozmenenou cukornatou zložkou) sú porovnateľné s kontrolou, ako počas dlhodobej tak zrýchlenej stability.

Stanovenie imunogenicity vakcíny proti parotitíde (mumpsu) je závislé od typu vakcinačného kmeňa. Nami používaná jedna dávka lyofilizovanej vakcíny musí obsahovať minimálne  $10^{3.7}$  živého oslabeného vírusu parotitídy kmeňa Jeryl Lynn počas expiračnej doby. Imunizujúci účinok živej osýpkovej vakcíny, bez ohľadu na použitý vírusový kmeň, zvykne byť vysoký. Postvakcinačná imunitná odpoveď závisí na koncentrácii živých vakcinačných vírusov v jednej dávke. Podľa odporúčania Svetovej zdravotníckej organizácie by koncentrácia vírusu nemala byť nižšia ako  $10^3$  CCID<sub>50</sub>/ml. Expiračná doba našej kontrolnej vakcíny, uskladnenej pri teplote +4/+8 °C, je 18 mesiacov, kedy sa predpokladá zníženie titru vírusu max. do  $10^{1.5}$  CCID<sub>50</sub>/ml. Pri štandardných (do 9. mesiaca) ako aj sťažených skladovacích podmienkach (do 6. mesiaca) bola hodnota titru vo výskumných skupinách (s glukózou, fruktózou a laktózou) nezmenená oproti kontrole. Stanovené titre (metódou odčítania cytopatického efektu) v ostatných skupinách (so sorbitolom a manitolom) boli signifikantne zvýšené v porovnaní s kontrolou (\*\*\*) reprezentuje  $p < 0,001$  vs. kontrola).

**b) výskum kombinácie nových stabilizátorov**

V našich pilotných kombinovaných experimentoch sme použili všetky nami vytvorené zmesi aminokyselín (štyri zmesi aminokyselín – výskum v roku 2011) spolu so sorbitolom alebo manitolom, keďže s týmito cukrami sme dosiahli najstabilnejšie výsledky.

Urobili sme paralelne niekoľko experimentov s rovnakými stanovenými zmenami kombinovaných zložiek (jednotlivé zmesi aminokyselín a manitol alebo sorbitol) vo výrobných podmienkach. Takto vyrobené vakcíny proti mumpsu a osýpkam sme použili na stabilnú štúdiu.

---

V prípade vzhľadu, straty sušením, rozpustnosti, aktuálnej acidity, obsahu BSA a BET sme nezaznamenali rozdiely oproti kontrole. Pri stanovení bielkovín sme však zistili pokles ich obsahu približne o 70% v kombinovaných skupinách v porovnaní s kontrolou. Následne sme pozorovali nízke hodnoty titrov od nultého mesiaca, ktoré nie sú akceptovateľné vo vakcínach nášho typu.

Kontrolná vakcína proti mumpsu a osýpkam je stabilizovaná ľudským plazmatickým albumínom, sacharózou a želatínou v množstvách nepresahujúcich 2,0 % v konečnej koncentrácii po rozpustení. Tieto koncentrácie sme dodržiavali aj pri našom doterajšom výskume. Avšak, po neúspešných pilotných kombinovaných experimentoch sme sa rozhodli zvýšiť na 3 % obsah cukornatej zložky. Vychádzali sme z dostupných informácií, ktoré uvádzajú v podobných prípadoch až 5,0 % množstvo cukornatého stabilizátora v konečnej koncentrácii po rozpustení vakcíny.

Pri použití kombinácií jednotlivých zmesí aminokyselín a väčšej koncentrácie manitolu (obsah sme zvýšili o 50 % oproti predošlému výskumu) sme boli úspešnejší. Doterajšie získané výsledky zo skúšok stabilit máli porovnateľnejší charakter oproti kontrole, hoci ide o vyhodnotenie iba do 3. mesiaca. Dosiahnuté titre v prípade výskumu vakcín proti mumpsu sa pohybovali tesne v okolí akceptovateľnej hodnoty v porovnaní s kontrolou.

Presnejšie informácie o tom, či je daná kombinácia vyhovujúca v porovnaní s kontrolou, budeme mať až po skončení a vyhodnotení ďalších stabilitných skúšok.