

Stimuly pre výskum a vývoj

Názov projektu: **Výskum nových kultivačných substrátov pre prípravu očkovacích látok**

Druh projektu: **projekt základného výskumu**

Číslo projektu: **CD-2009-36912/39534-1:11**

Riešiteľ: **IMUNA PHARM, a.s.**



Jarková 269/17, 082 22 Šarišské Michalčany
tel.: 051 / 4562 204, fax: 051/ 4562 300, e-mail: sekretariat@imuna.sk

Spoluriešiteľ: **Virologický ústav SAV**
Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava

Doba riešenia projektu: **12 / 2009 - 10 / 2012**

Vytvorenie / udržanie pracovných miest vo výskume a vývoji: **4 pracovné miesta**

Etapy riešenia projektu:

| | | |
|------------------|--|--------------------------|
| 1. etapa: | Výskum nových bunkových substrátov | 12/2009 – 03/2010 |
| 2. etapa: | Výskum nových bunkových substrátov pre vakcínu voči osýpkam | 03/2010 – 03/2011 |
| 3. etapa: | Výskum nových bunkových substrátov pre vakcínu voči mumpsu | 04/2011 – 03/2012 |
| 4. etapa: | Overenie substrátov pre prípravu živých vakcín | 04/2012 – 10/2012 |

Zodpovedný riešiteľ: **Ing. Michal Gocník, PhD.**

Hlavný cieľ projektu:

Tento projekt základného výskumu bol zameraný na vyhľadávanie a experimentálne overenie nových kultivačných substrátov, ktoré by sa dali použiť na prípravu vírusových očkovacích látok. Jeho hlavným zámerom bolo nájsť nový / nové kultivačné substráty, na ktorých by sa pripravovala živá vakcína voči osýpkam a živá vakcína voči mumpsu, ako dve zložky z kombinovanej MMR trivakcíny voči osýpkam mumpsu a rubeole.

Cieľom spoločnosti IMUNA PHARM, a.s. bolo nájsť nový spôsob prípravy týchto vakcín na nových kultivačných substrátoch, ktoré by reflektovali najnovšie svetové trendy v oblasti očkovacích látok a zároveň by viedli k zvýšeniu kvality a bezpečnosti ponúkaných produktov.

Popis čiastkových cieľov projektu:

Projekt riešil v prvej etape výskum nových vhodných kultivačných substrátov pre prípravu vírusových očkovacích látok. Pre realizáciu výskumu v 1. etape zabezpečil prístrojové vybavenie a vytvoril 3 nové pracovné miesta v roku 2010 a 1 pracovné miesto v roku 2011 pre výskumných a technických pracovníkov.

Druhou a tretou etapou bolo využitie výsledkov a poznatkov z 1. etapy a výskum nového spôsobu získavania jednotlivých zložiek (monovakcín) vo vývoji kombinovanej MMR trivakcíny voči osýpkam, mumpsu a rubeole podľa posledných trendov v oblasti očkovacích látok. Dve zložky tejto trivakcíny, monovakcíny voči osýpkam a mumpsu, sa doteraz pripravovali pomnožením vakcinačných kmeňov týchto vírusov na línii primárnych psích obličkových buniek, čo predstavuje síce bezpečnú, ale staršiu technológiu. Pre konkurencieschopnosť výslednej trivakcíny bolo perspektívne pripraviť nový spôsob výroby jednotlivých zložiek (monovakcín). Základným cieľom výskumu bolo zvýšenie bezpečnosti a kvality výslednej MMR trivakcíny, ktorej použitie je o.i. zahrnuté aj do Imunizačného programu SR.

Štvrtou etapou bolo experimentálne overenie výsledkov základného výskumu pre prípravu živých vakcín v simulácii poloprevádzkovej výroby.

Výstupom samotného projektu je vhodný kultivačný substrát a technologický postup pre prípravu trivakcíny voči osýpkam, mumpsu a rubeole a pilotný produkt určený pre fázu predklinického testovania. Realizáciou projektu sa vytvoril odborný potenciál pre sledovanie svetových trendov a následnú podporu výskumu v tejto oblasti a súčasne sa vytvorí priestor pre intenzívnu spoluprácu s odbornými vedeckými kapacitami z univerzitného a akademického prostredia.

Financovanie projektu:

Plánovaná výška oprávnených výdavkov na projekt: **1 969 004 €**

Vlastné prostriedky: **0 €**

Požadovaná dotácia: **1 969 004 € (100%)**

Podiel vlastných prostriedkov: **0 %**

| <i>Sumárny rozpočet projektu</i> | | | | | |
|----------------------------------|--------------------|------------------|------------------|------------------|--------------------|
| | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 | Celkom |
| Dotácia | 1 144 819 € | 302 433 € | 266 990 € | 254 762 € | 1 969 004 € |
| <i>Bežné výdavky</i> | 248 119 € | 302 433 € | 266 990 € | 254 762 € | 1 072 304 € |
| <i>Kapitálové výdavky</i> | 896 700 € | 0 € | 0 € | 0 € | 896 700 € |
| <i>Vlastné prostriedky</i> | 0 € | 0 € | 0 € | 0 € | 0 € |
| Celkom | 1 144 819 € | 302 433 € | 266 990 € | 254 762 € | 1 969 004 € |

Rozdelenie financií medzi riešiteľa a spoluriešiteľa:

| Rozpočet riešiteľa a spoluriešiteľa | | | | | |
|--|--------------------|------------------|------------------|------------------|--------------------|
| | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 | Celkom |
| Riešiteľ | 1 129 819 € | 268 433 € | 233 990 € | 236 762 € | 1 869 004 € |
| Spoluriešiteľ | 15 000 € | 34 000 € | 33 000 € | 18 000 € | 100 000 € |
| Celkom | 1 144 819 € | 302 433 € | 266 990 € | 254 762 € | 1 969 004 € |

Plánované výstupy riešenia:

| Očakávané výstupy riešenia | | | | | | | |
|-----------------------------------|-----------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Kategória | Výstupy | Rok 2009 | Rok 2010 | Rok 2011 | Rok 2012 | Rok 2013 | Rok 2014 |
| Nové poznatky | publikácie | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 |
| Pridaná hodnota | pracovné miesta | 0 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 |

Hlavné realizované výsledky za rok 2009

Výsledky za 1. etapu riešenia - 12/2009 - 3/2010:

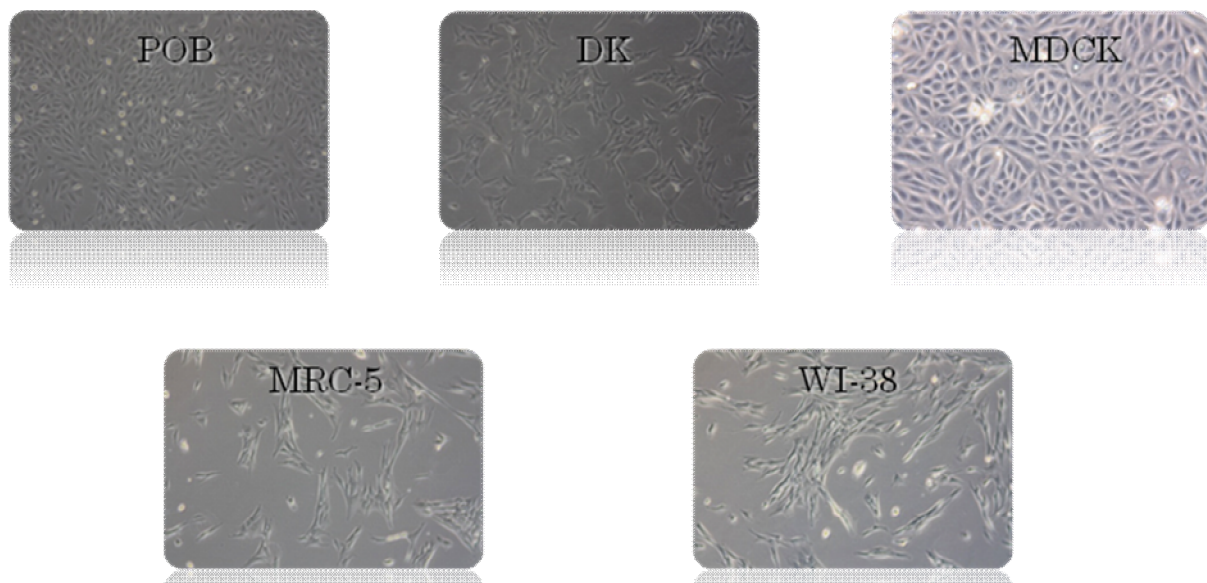
V spolupráci so spoluriešiteľskou organizáciou (Virologický ústav SAV, Bratislava) a prostredníctvom odborných konzultácií bol vykonaný literárny výskum a boli vytipované vhodné kultivačné substráty potenciálne použiteľné pre prípravu humánných vírusových očkovacích látok, najmä pre zmenu kultivačného substrátu pre prípravu MMR trivakcíny (vakcínu voči osýpkam, mumpsu a rubeole). Ide tak o stabilné bunkové línie MRC-5 alebo WI-38 (línie ľudských diploidných embryonálnych pľúcnych fibroblastov) a primokultúry kuracích fibroblastov, ktoré podľa požiadaviek Európskeho liekopisu na prípravu humánných vírusových vakcín, musia pochádzať z *SPF* chovu hydiny (*Specified Pathogen Free* - chov bez špecifických patogénov). Počas sledovaného obdobia sa zrealizoval nákup diploidných bunkových línií, spotrebného materiálu a vakcinačných vírusových kmeňov, ktoré sa použijú pre testovanie vhodnosti daného kultivačného substrátu a získanie základného súboru informácií o kultivačných podmienkach a výťažnosti daného substrátu v kontexte použitia pre pomnoženie vakcinačných vírusov pri príprave humánných vakcín.

Zároveň, v sledovanom období prebehlo verejné obstarávanie na prístrojové a technologické zariadenia, ktoré boli schválené ako kapitálové výdavky projektu. V súlade s cieľmi projektu boli vytvorené 4 nové pracovné miesta v odbore vedecko-výskumný pracovník.

Hlavné realizované výsledky za rok 2010

V kontrolovanom roku 2010 sme na základe výsledkov z 1. etapy začali s testovaním vytipovaných nových bunkových substrátov vzhľadom na ich vhodnosť pre prípravu vakcíny voči osýpkam a mumpsu, pomnožením našich vakcinačných kmeňov vírusu osýpok a mumpsu. V tomto roku sme ako cieľ výskumu mali naplánovaný len výskum nových kultivačných substrátov pre prípravu vakcíny voči osýpkam. Vzhľadom na skutočnosť, že proces adaptácie vírusov na nových kultivačný substrát je veľmi časovo náročný, paralelne sme začali pracovať aj s vírusom mumpsu, riešenie ktorého sme plánovali samostatne až v 3. etape projektu.

Proces adaptácie vírusov sme začali na dvoch ľudských diploidných bunkových líniiach MRC-5 a WI-38 a dvoch stabilných psích obličkových bunkových líniiach (DK a MDCK), nakoľko pôvodné vakcinačné kmene vírusov osýpok a mumpsu sú adaptované na primárnych psích obličkových bunkách (POB).



Obr.1: Bunkové línie testované pre vhodnosť prípravy vakcíny voči osýpkam a mumpsu

Počas testovania vhodnosti vytipovaných bunkových kultúr sme skúšali rôzne kultivačné podmienky, spôsoby infekcie, kultivačné médiá a pod. s cieľom zistiť najlepšiu formu infekcie týchto bunkových línii za účelom maximálneho výťažku vírusu pre samotnú prípravu vakcíny. Napriek všetkému úsiliu sa nám doteraz nepodarilo adaptovať vírus osýpok, ani mumpsu na DK bunkovú líniu. Vírus osýpok pomnožený na MDCK bunkovej línii vykazuje nízky titer, a preto budú potrebné dodatočné pasáže tohto vírusu s cieľom získať lepšie adaptovaný vírus.

V prípade ľudských diploidných línii sa na základe výsledkov nášho výskumu javila ako vhodnejšia línia MRC-5 buniek, na ktorej sa nám úspešne podarilo adaptovať vírus osýpok Schwarz.

Paralelne sme v spolupráci s kolegami z Virologického ústavu SAV vyvinuli a čiastočne optimalizovali novú metodiku pre stanovenie titra infekčného vírusu osýpok, mumpsu a rubeoly, ktorá je rýchlejšia a citlivejšia ako doteraz používaná metóda.

Hlavné realizované výsledky za rok 2011

V priebehu kontrolovaného roku 2011 sme v spolupráci s kolegami Z Virologického ústavu zopakovali adaptáciu vakcinačných vírusov osýpok (Schwarz) a mumpsu Jeryl Lynn na vytipovanú líniu MRC-5 buniek (ľudské pľúcne fibroblasty). Proces adaptácie sme urobili pri dvoch rôznych teplotách (37°C a 33°C), pričom získané výsledky poukazujú na fakt, že vírus osýpok sa na MRC-5 bunkách lepšie množí pri 37°C a naopak, vírus mumpsu pri 33°C.

Priamym porovnaním dvoch metód detekcie vírusov: CTP - priama detekcia založená na mikroskopickom odčítavaní cytopatického efektu a ELISA testu za pomoci špecifických monoklonových protilátok, sme dokázali vyššiu citlivosť nami vyvinutého ELISA testu.

Paralelne s adaptáciou na MRC-5 bunky sme optimalizovali podmienky pre priamu infekciu MDCK buniek (psie obličkové bunky). Zistili sme, že na výťažky vírusu nemá zásadný vplyv typ média použitého pre narastenie buniek, ale musí ísť o menej výživné médium, ktoré spomalí metabolizmus buniek počas infekcie. Jedným z našich cieľov bolo aj zistenie onkogénneho potenciálu MDCK buniek testovaním expresie onkomarkerov STAT 3 a VEGF. Získané výsledky preukázali, že dlhodobé pasážovanie MDCK buniek v rôznych typoch kultivačných médií nevedie k ich zvrhnutiu na nádorové bunky, a teda MDCK bunky nemajú onkogénny potenciál.

Vo všeobecnosti môžeme na základe získaných výsledkov konštatovať, že na prípravu vakcíny voči osýpkam sa viac hodí MRC-5 bunková línia a teplota kultivácie 37°C. Naopak, pre prípravu vakcíny voči mumpsu sa zdá vhodnejšia MDCK bunková línia a teplota kultivácie 34°C.

V priebehu roka 2011 sme s pomocou vírusu osýpok Schwarz adaptovaného na MRC-5 (11. pasáž) pripravili pilotnú poloprevádzkovú šaržu vakcíny voči osýpkam. U tejto vakcíny v súčasnosti prebieha dlhodobá stabilná štúdia pre overenie, či si takto pripravená vakcína v priebehu zamýšľanej expirácie zachová účinnosť, imunogénnosť a bezpečnosť.

Hlavné realizované výsledky za rok 2012

Výsledky dosiahnuté riešením projektu v roku 2012 môžeme rozdeliť na 2 časti. Po prvé, v spolupráci s kolegami z Virologického ústavu SAV sme pokračovali v začatej adaptácii vírusov osýpok (Schwarz) a mumpsu (Jeryl Lynn) na líniu MRC-5 buniek pri dvoch rôznych kultivačných teplotách 33°C a 37°C. Z literatúry vyplýva, že úspešná adaptácia podobného vírusu osýpok na primárne kuracie fibroblasty prebehla až po 156 pasážach (Tillieux et al., 2009, Vaccine 27, 2265 -2273). Preto sme sa rozhodli pokračovať adaptačnom procese začatom v roku 2011.

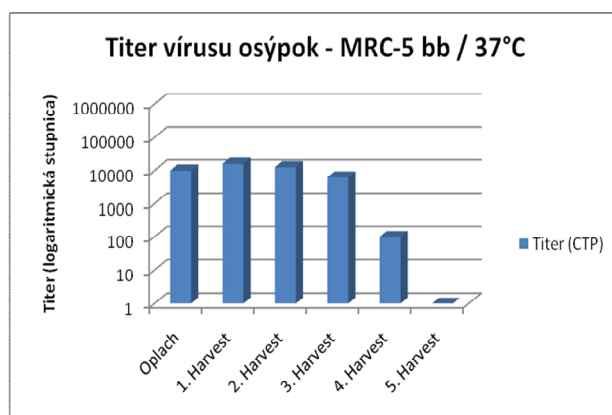
Druhou časťou, na základe stanovených cieľov pre riešenie v roku 2012, bolo poloprevádzkové overenie vhodnosti vybraných bunkových substrátov pre prípravu živých atenuovaných vakcín voči osýpkam a mumpsu. V roku 2011 sme urobili pilotnú poloprevádzkovú šaržu vakcíny voči osýpkam za použitia MRC-5 bunkovej línie, na ktorej sme pomnožili čiastočne adaptovaný kmeň (11. pasáž vírusu na MRC-5 bb) vírusu osýpok Schwarz. Takto pripravená vakcína bola použitá na stabilitnú štúdiu za účelom overenia jej kvality, bezpečnosti a účinnosti.

V roku 2012 sme prípravu tejto šarže zopakovali a zároveň sme pripravili pilotné poloprevádzkové šarže vakcíny voči mumpsu s použitím MRC-5 buniek ako bunkového substrátu a čiastočne adaptovaného vírusu Jeryl Lynn (10. pasáž vírusu na MRC-5 bb pri 33°C) resp. poloprevádzkovú šaržu, kedy boli MDCK bunky (stabilné psie obličkové bunky) priamo infikované pôvodným kmeňom vírusu mumpsu Jeryl Lynn.

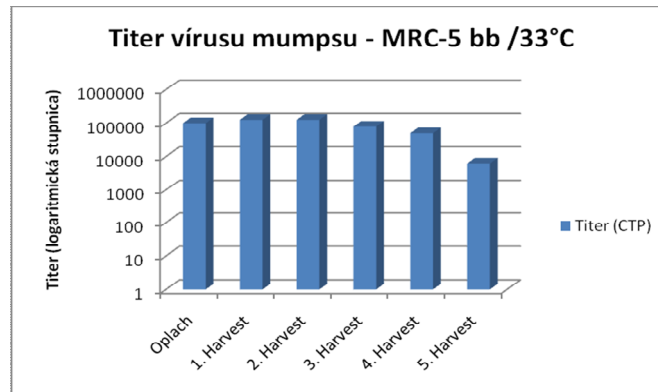
Dosiahnuté výsledky ukazujú, že získané množstvá vírusov pri príprave týchto vakcín nie sú ešte ideálne, ale veríme, že ďalšou optimalizáciou tohto postupu dosiahneme v budúcnosti reálne využitie týchto výsledkov základného výskumu v praxi. Výborné výsledky sme dosiahli pri priamej infekcii MDCK buniek vírusom mumpsu, kedy hodnoty titrov vírusu dosiahnuté v poloprevádzkových podmienkach už zodpovedali reálnym hodnotám pre efektívnu výrobu vakcíny voči mumpsu.

Výstupom projektu za rok 2012 bola aj jedna odborná publikácia uverejnená v karentovanom časopise *Acta Virologica*.

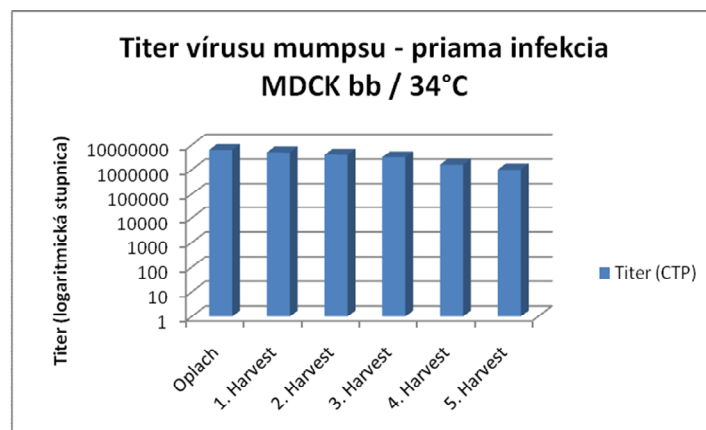
Obrázok 1: Titrácia harvestov poloprevádzkovej šarže čiastočne adaptovaného vírusu osýpok Schwarz na MRC-5 bunkách



Obrázok 2: Titrácia harvestov poloprevádzkovej šarže čiastočne adaptovaného vírusu mumpsu Jeryl Lynn na MRC-5 bunkách



Obrázok 3: Titrácia harvestov poloprevádzkovej šarže – priama infekcia MDCK buniek pôvodným vírusom mumpsu



Záverečné zhrnutie hlavných výsledkov získaných počas riešenia projektu

Projekt základného výskumu bol zameraný na vyhľadanie a overenie nových bunkových substrátov, ktoré by sa dali použiť pri príprave inovovaných vakcín voči osýpkam a mumpsu. V prvých fázach riešenie projektu sme vytipovali vhodné bunkové línie, ktoré boli neskôr detailne testované a charakterizované vzhľadom na kultivačné podmienky. Na vybranej bunkovej línii MRC-5 buniek sme začali s procesom adaptácie vírusov osýpok a mumpsu na nový bunkový substrát pri dvoch rôznych teplotách 33°C a 37°C. V súčasnosti máme približne 30 pasáží oboch vírusov na danom substráte. Získané výsledky však poukazujú, že obidva vírusy ešte nie sú dostatočne adaptované na nový substrát a preto je potrebné v adaptácii pokračovať. Paralelne s procesom adaptácie vírusov na MRC-5 bunky sme vyskúšali aj priamu infekciu MDCK buniek pôvodnými vírusmi osýpok a mumpsu, kedy sme boli úspešní pri infekcii buniek s vírusom mumpsu.

Na základe získaných výsledkov sme overili vytipované bunkové substráty v poloprevádzkových podmienkach pre prípravu inovovaných vakcín voči osýpkam

a mumpsu. Pripravili sme pilotné šarže vakcín voči osýpkam a mumpsu použitím čiastočne adaptovaných vírusov, ktoré boli množené na MRC-5 bunkovej línii. Hodnoty titrov vírusov získaných pri poloprevádzkovom procese boli nižšie ako by bolo potrebné pre štandardnú výrobu, ale napriek tomu dokázali, že po optimalizácii procesu a ďalšej adaptácii vírusov, je proces výroby inovovaných vakcín na novom substráte reálny. Reálne je aj použitie MDCK bunkovej línie pre priamu infekciu vírusom mumpsu, kedy dosiahnuté titre vírusu sú relatívne vysoké a postačujú pre štandardnú, efektívnu výrobu vakcíny.

Na základe vyššie prezentovaných výsledkov môžeme konštatovať, že všetky naplánované ciele projektu boli úspešne splnené. Priamymi výstupmi projektu boli 4 novovytvorené pracovné miesta pre výskumno-vývojových pracovníkov a zatiaľ 1 odborná publikácia v domácom karentovanom časopise. Zároveň sa vytvorili dobré partnerstvo s akademickou obcou (Slovenská akadémia vied), čo vedie k dobrému predpokladu k úspešnému riešeniu ďalších výskumno-vývojových úloh.