

Stimuly pre výskum a vývoj

**VÝSKUM INOVATÍVNYCH POSTUPOV  
A TECHNOLOGICKÝCH POSTUPOV PRE  
VÝROBU KOMBINOVANEJ VAKCÍNY  
A ZALOŽENIE SEED LOT SYSTÉMU**

Projekt aplikovaného výskumu

Evidenčné číslo projektu: 2013-14549/39695:1-11



Prijímateľ:  
Poskytovateľ:

**IMUNA PHARM, a.s.**  
Ministerstvo školstva, vedy, výskumu a športu SR



## Úvod do projektu:

Spoločnosť IMUNA PHARM, a.s. je držiteľom registrácie pre vakcíny proti: mumpsu, osýpkam a rubeole. Tieto vakcíny sú na trhu od roku 1982 a boli nimi zaočkované milióny detí v ČR, SR, UK, Thajsku, Vietname a v iných krajinách. Za toto obdobie 30 rokov neboli hlásené žiadne závažné nežiadúce účinky a bola zdokumentovaná efektívnosť vakcín na veľkej a geneticky rôznorodej populácii. Napríklad túto MMR vakcínu spomína vo svojej knihe VACCINES, 2011, prof. Stanley Plotkin, nositeľ Nobelovej ceny za medicínu.

Keďže biotechnologický výskum napreduje veľmi rýchlo, nároky na výrobu vakcín od rôznych medzinárodných regulačných inštitúcií sa každý rok zvyšujú a tiež sa zvyšuje tlak konkurencie. Spoločnosť IMUNA PHARM, a.s. sa preto rozhodla, v súlade s týmito požiadavkami a trendmi, inovovať svoje produkty, aby takto zachovala samostatnosť regiónu strednej Európy v oblasti výroby MMR vakcín.

Tento projekt aplikovaného výskumu je zameraný na výskum nových bunkových substrátov, inovatívnych technologických postupov a kultivačných technológií pre vývoj novej trojzložkovej vakcíny (osýpky, mumps, rubeola). Zároveň je zameraný na založenie seed lot systému – buniek a vírusov pre komerčné účely.



*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)



*Zodpovedný riešiteľ:*

Mgr. Tekla Horňáková, PhD

*Spoluriešiteľ :*

**Bohemia Pharmaceuticals s.r.o.**

*Doba riešenia projektu:*

**11/2013 – 10/2016**

*Vytvorenie a udržanie pracovných miest vo výskume a vývoji:*

**3**

**Hlavný cieľ projektu:**

Tento projekt aplikovaného výskumu je zameraný na výskum nových bunkových substrátov, inovatívnych technologických postupov a kultivačných technológií pre vývoj novej trojzložkovej vakcíny (osýpky, mumps, rubeola). Zároveň je zameraný na založenie banky buniek a banky vírusov pre komerčné účely.



## Čerpanie finančných prostriedkov počas riešenia projektu:



Sumárny rozpočet projektu (v eurách)					
	2013	2014	2015	2016	Celkom
<b>Priama dotácia</b>					
Bežné výdavky	98 735	625 020	690 720	394 400	1 808 875
Kapitálové výdavky	0	170 000	0	0	170 000
<b>Priama dotácia celkom</b>	<b>98 735</b>	<b>795 020</b>	<b>690 720</b>	<b>394 400</b>	<b>1 978 875</b>
<b>Vlastné prostriedky</b>					
Bežné výdavky	34 300	173 200	233 800	158 489,54	599 789,54
Kapitálové výdavky	0	100 000	0	0	100 000
<b>Vlastné prostriedky celkom</b>	<b>34 300</b>	<b>273 200</b>	<b>233 800</b>	<b>158 489,54</b>	<b>699 789,54</b>

Tabuľka č. 1 Sumárny rozpočet projektu na celé obdobie realizácie a podľa jednotlivých rokov.

## Čerpanie finančných prostriedkov počas riešenia projektu:

Rozdelenie financií medzi hlavného riešiteľa a spoluriešiteľa

Rozpočet riešiteľa:

Sumárny rozpočet žiadateľa (v eurách)					
	2013	2014	2015	2016	Celkom
<b>Bežné výdavky</b>	89 135	520 020	617 220	376 276,24	1 602 651,24
<b>Kapitálové výdavky</b>	0	270 000	0	0	270 000
<b>Priama dotácia</b>	<b>66 135</b>	<b>588 020</b>	<b>461 310</b>	<b>262 710</b>	<b>1 378 175</b>
<b>Vlastné prostriedky žiadateľa</b>	<b>23 000</b>	<b>202 000</b>	<b>155 910</b>	<b>93 090</b>	<b>494 476,24</b>

Tabuľka č. 2 Čerpanie finančných prostriedkov hlavného riešiteľa.

Rozpočet spoluriešiteľa:

Sumárny rozpočet spoluriešiteľa (v eurách)					
	2013	2014	2015	2016	Celkom
<b>Bežné výdavky</b>	43 900	278 200	307 300	176 613,30	806 013,30
<b>Kapitálové výdavky</b>	0	0	0	0	0
<b>Priama dotácia</b>	<b>32 600</b>	<b>207 000</b>	<b>229 410</b>	<b>131 690</b>	<b>600 700</b>
<b>Vlastné prostriedky spoluriešiteľa</b>	<b>11 300</b>	<b>71 200</b>	<b>77 890</b>	<b>44 923,30</b>	<b>205 313,30</b>

Tabuľka č. 3 Čerpanie finančných prostriedkov spoluriešiteľa.



## Časový a vecný harmonogram riešenia projektu:

### **1.1 etapa (11/2013 – 12/2013)**

Porovnanie génovej mapy rubeoly kmeňa určeného pre výskumné účely s kmeňom určeným pre komerčné účely. Implementácia inovatívneho technologického postupu do poloprevádzkových podmienok pre výrobu trojzložkovej vakcíny (osýpky, mumps, rubeola) – vytypovanie podmienok poloprevádzkovej výroby.

### **1.2 etapa (01/2014 – 12/2014)**

Porovnanie génovej mapy rubeoly kmeňa určeného pre výskumné účely s kmeňom určeným pre komerčné účely. Implementácia inovatívneho technologického postupu do poloprevádzkových podmienok pre výrobu trojzložkovej vakcíny (osýpky, mumps, rubeola) – vytypovanie podmienok poloprevádzkovej výroby.

### **2. etapa (01/2015 – 12/2015)**

Založenie Master seed lot systému inovovaných bunkových kmeňov pre vírusy mumps, osýpky a rubeola a Cell Banking systému.

### **3. etapa (01/2016 – 10/2016)**

Príprava tekutej formy monovakcín a kombinovanej trojzložkovej vakcíny za účelom predklinického a klinického skúšania ich kvality, bezpečnosti a účinnosti.



## Hlavné realizované výstupy v 1.1 etape riešenia (11/2013 – 12/2013):

1. etapa riešenia projektu prebiehala počas 2 rokov (11/2013 – 12/2014) a je rozdelená do 2 subetáp: Etapa 1.1 (11 – 12/2013) a Etapa 1.2 (01/2014 – 12/2014)

**Hlavné realizované výstupy v 1.1 etape (11 – 12/2013) riešenia projektu sú:**

- 1) V prvých mesiacoch spustenia projektu **sa vytvorili v organizačnej štruktúre tri nové pracovné miesta pre vedecko-výskumných pracovníkov** na aktuálnom VaV pracovisku spoločnosti. Tieto pracovné miesta boli následne po výberovom konaní začiatkom roku 2014 obsadené.
- 2) Vzhľadom na náročnosť projektu boli v tomto rannom období 11-12/2013 v spolupráci so spoluriešiteľskou organizáciou vypracované **literárne rešerše o existujúcich technológiách** pre prácu s inovatívnymi substrátmi pri výrobe tekutých monovakcín mumpsu, osýpok, rubeoly

## Hlavné realizované výstupy v 1.2 etape riešenia (01/2014 – 12/2014):

- 1) V súlade s harmonogramom projektu sa zabezpečilo **obsadenie 3 novovytvorených pracovných miest, zaškolenie a začlenenie nového personálu do existujúcej organizačnej štruktúry.**

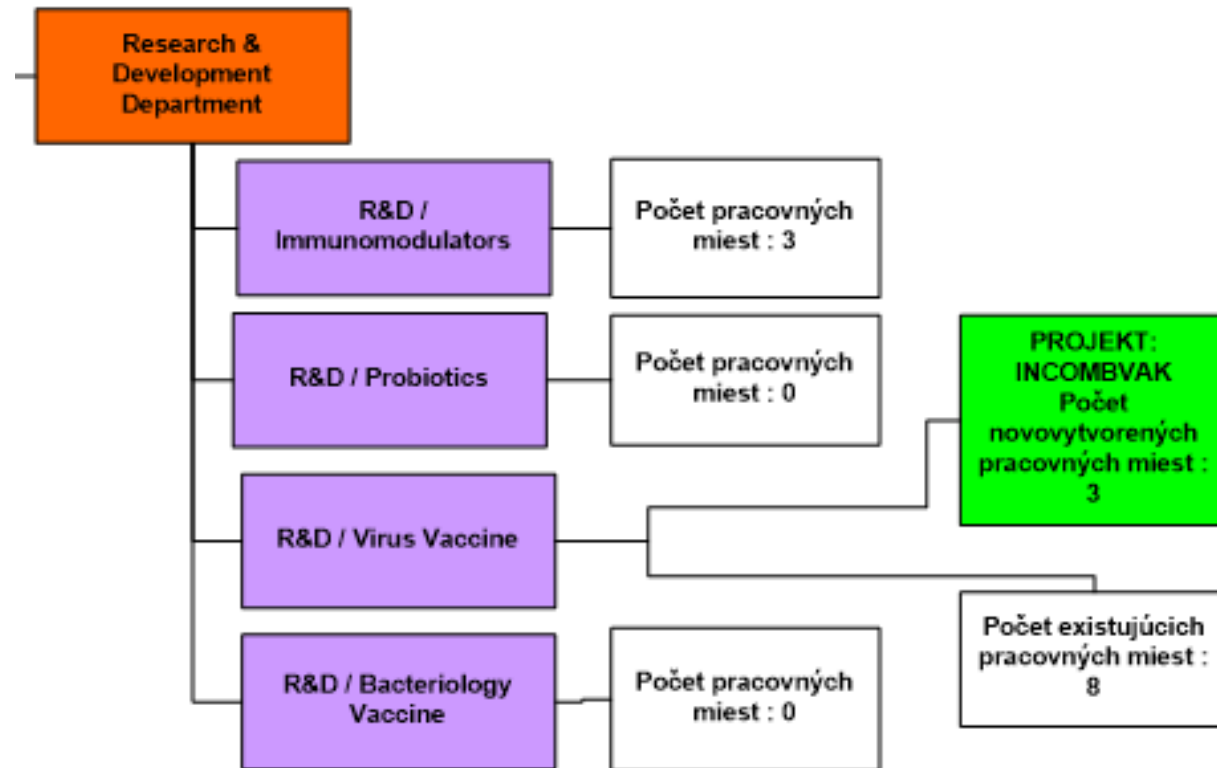


Schéma č. 1 3 novo-vytvorené pracovné miesta v aktuálnej organizačnej štruktúry pracoviska VaV.

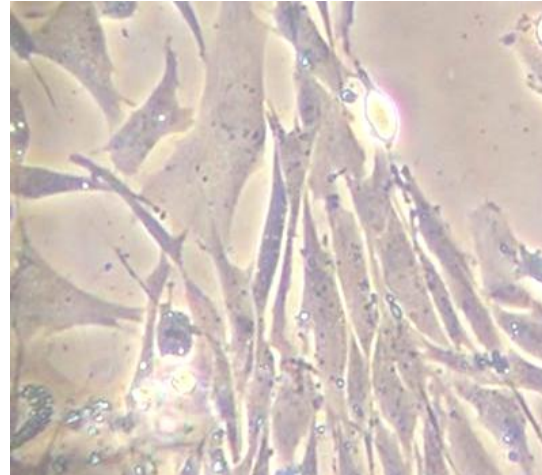


## Hlavné realizované výstupy v 1.2 etape riešenia (01/2014 – 12/2014):

- 2) Pokračovalo sa v štúdiu aktuálnych trendov a technológií v oblasti prípravy inovatívnych substrátov.
- 3) Prebehlo **praktické zaškolenie výskumno-vývojových pracovníkov do kľúčových laboratórnych metodík** a postupov.
- 4) Zrealizoval sa **nákup spotrebného materiálu** a využili sme **služby odborných konzultácií** pre zavedenie nových technologických postupov.
- 5) Zrealizovali sa **validácie na laboratórnych prístrojoch** a tiež úprava, sprevádzkovanie pracoviska.

## Hlavné realizované výstupy v 1.2 etape riešenia (01/2014 – 12/2014):

- 6) Bol preskúmaný protokol technologickej prípravy embryonálnych kuracích fibroblastov z 9-10-dňových embryí.



**Obrázok č. 1** Bunky kuracích embryonálnych fibroblastov pripravené optimalizovaným technologickým postupom tvoria 70 % porastený povrch kultivačnej misky pre následnú infekciu vírusom osýpok alebo mumpsom. Bunky podlhovastého tvaru prilnuté na kultivačnú misku sú živé, okrúhle bunky sú mŕtve. Repräsentatívna snímka.

## Hlavné realizované výstupy v 1.2 etape riešenia (01/2014 – 12/2014):

- 7) Prebehol **prieskum trhu** s cieľom identifikovať vhodný zdroj výskumného kmeňa rubeoly.
- 8) Prebehol prieskum trhu s cieľom identifikovať **vhodný software pre vizualizáciu génových informácií** kmeňov a ich porovnanie.
- 9) Prebehla **objednávka vybraného výskumného kmeňa rubeoly z atcc.org**. Výskumný kmeň rubeoly bol doručený.

## Hlavné realizované výstupy v 1.2 etape riešenia (01/2014 – 12/2014):

10) Bola vypracovaná a porovnaná génová mapa výskumného kmeňa rubeoly s génovou mapou rubeoly určeného pre komerčné účely výroby vakcíny proti rubeole.

Názov čiastkovej aktivity	Trvanie aktivity	Počet pracovníkov
Namnoženie vírusu výskumného kmeňa rubeoly na MRC-5 bunkách	1 mesiac	1 pracovník
Izolácia vírusovej ribonukleových kyselín (RNA)	2 týždne	1 pracovník
Design krátkych úsekov DNA - primerov	1 týždeň	2 pracovníci
Amplifikácia úsekov sekvencie vírusu pomocou primerov	1 mesiac	1 pracovník
Izolácia amplifikovaných úsekov a ich sekvenácia	1 mesiac	4 pracovníci
Analýza chromatogramu a Blastn programu	1 týždeň	2 pracovníci
Génová mapa	1 týždeň	2 pracovníci

**Tabuľka č. 4** Prehľad aktivít súvisiacich s prácou so sekvenáciou výskumného kmeňa rubeoly.

## Hlavné realizované výstupy v 1.2 etape riešenia (01/2014 – 12/2014):

- 11) Uskutočnil sa **prieskum trhu** s cieľom identifikovať vhodného dodávateľa **kmeňa rubeoly pre komerčné účely**. Spomínaný kmeň rubeoly určený pre komerčné účely výroby vakcíny proti rubeole bol **zakúpený od Wistar Institute, Philadelphia, USA** na základe výsledku priameho rokovacieho konania bez zverejnenia na predmet zákazky „Dodávka vírusu Rubeoly“.
- 12) Boli **zakúpené pre výskumné účely liekopisné bunkové substráty** pre pomnoženie vírusu rubeoly a prípravu vakcíny proti rubeole – **ľudské diploidné bunkové línie WI-38 a MRC-5** a taktiež **bunkové línie liekopisom určené pre stanovenie účinnosti (titer) a adaptácie vírusu rubeoly – králičie obličkové bunky RK13**.
- 13) Riešiteľský tím stanovil **optimálne podmienky pre pomnoženie uvedených buniek** a uskutočnil **prvú materskú a pracovnú banku buniek MRC-5, WI-38 a RK13**. Zároveň bola **stanovená maximálna pasáž použitia buniek WI-38 a MRC-5** vhodná pre pomnoženie vírusu rubeoly.

## Hlavné realizované výstupy v 1.2 etape riešenia (01/2014 – 12/2014):

Názov čiastkovej aktivity	Trvanie aktivity	Počet pracovníkov
Podmienky pomnoženia MRC-5 a WI-38	2 mesiace	3 pracovníci
Podmienky kultivácie a prípravy kuracích fibroblastov	6 mesiacov	4 pracovníci
Materská banka (Master Cell Bank) a Pracovná banka (Working Cell Bank) pre MRC-5, WI-38, RK13	3 mesiace	4 pracovníci
Stanovenie maximálnej pasáže MRC-5 a WI-38	2 mesiace	4 pracovníci

**Tabuľka č. 5** *Prehľad aktivít súvisiacich s prácou s bunkovými kultúrami.*

## Hlavné realizované výstupy v 1.2 etape riešenia (01/2014 – 12/2014):

14) **A.** Riešiteľský tím **zaviedol a zvalidoval podľa požiadaviek európskeho liekopisu metódu stanovenia účinnosti vírusu rubeoly** (titer/ml) na králičích obličkových bunkách RK13, ktorá umožňuje priame určenie koncentrácie vírusu v jednotkách CCID<sub>50</sub> /ml na základe odčítania cytopatického efektu (zhluky nekrotických buniek), ktorý má vírus rubeoly na RK13 bunky a použitím liekopisom odporúčaného programu Combistats.

**B.** Zároveň podľa liekopisných požiadaviek riešiteľský tím **zaviedol a zvalidoval aj interný pracovný štandard a jeho nadväznosť na medzinárodný štandard** pripravený a zakúpený z NIBSC (medzinárodného referenčného laboratória).

## Hlavné realizované výstupy v 1.2 etape riešenia (01/2014 – 12/2014):

Názov čiastkovej aktivity	Trvanie aktivity	Počet pracovníkov
Optimalizácia podmienok a vývoj metodiky	2 mesiace	2 pracovníci
Validácia metodiky	1 mesiac	4 pracovníci
Validácia interného štandardu	1 mesiac	4 pracovníci
Nadväznosť pracovného štandardu	1 mesiac	4 pracovníci
Validačný plán, štatistické spracovanie a správa	1 mesiac	2 pracovníci

**Tabuľka č. 6** *Prehľad aktivít súvisiacich s vývojom a validáciou metodiky titrácie rubeoly podľa európskeho liekopisu (Ph. Eur.) a pravidiel medzinárodnej harmonizačnej komisie (ICH).*



## Hlavné realizované výstupy v 1.2 etape riešenia (01/2014 – 12/2014):

15) Použitím validovanej metodiky titrácií vírusu rubeoly **riešiteľský tím stanovil optimálne podmienky pomnoženia vírusu rubeoly kmeň RA27/3** na ľudských diploidných bunkách MRC-5 a WI-38. Optimalizované boli:

*A. Mediá*

*B. % FBS (Fetal Bovine Serum) počas infekcie vírusom a pri zberoch harvestov*

*C. Teplota počas infekcie vírusom a pri zberov harvestov*

*D. Multiplicity of Infection (MOI) – pomer počet buniek: počet vírusových častíc*

*E. Spôsob infekcie buniek (na monovrstve, do suspenzie)*

Názov čiastkovej aktivity	Trvanie aktivity	Počet pracovníkov
Optimalizácia podmienok pre pomnoženie rubeoly na MRC-5 bunkách	9 mesiacov	3 pracovníci
Optimalizácia podmienok pre pomnoženie rubeoly na WI-38 bunkách	2 mesiace	2 pracovníci

**Tabuľka č. 7** Prehľad aktivít súvisiacich s optimalizáciou podmienok pre pomnoženie vírusu rubeoly.

## Hlavné realizované výstupy v 1.2 etape riešenia (01/2014 – 12/2014):

16) Použitím validovanej metodiky titrácií vírusu mumpsu a osýpok riešiteľský tím stanovil optimálne podmienky **pomnoženia vírusu mumpsu a osýpok** - rôzne pasáže na kuracích fibroblastoch (KEF). Optimalizované boli:

*A. Média*

*B. % FBS (Fetal Bovine Serum) počas infekcie vírusom a pri zberoch harvestov*

*C. Teplota počas infekcie vírusom a pri zberov harvestov*

*D. Multiplicity of Infection (MOI) – pomer počet buniek: počet vírusových častíc*

*E. Spôsob infekcie buniek (na monovrstve, do suspenzie)*

Názov čiastkovej aktivity	Trvanie aktivity	Počet pracovníkov
Optimalizácia podmienok pre pomnoženie osýpok na KEF	9 mesiacov	3 pracovníci
Optimalizácia podmienok pre pomnoženie mumpsu na KEF	9 mesiacov	3 pracovníci

**Tabuľka č. 8** *Prehľad aktivít súvisiacich s optimalizáciou podmienok pre pomnoženie vírusu osýpok a mumpsu na KEF.*

## 1. etapa riešenia projektu - čerpanie finančných prostriedkov:



1. etapa: 11/2013 - 12/2014 (v eurách)						
	Rok 2013 subetapa 1.1.			Rok 2014 subetapa 1.2.		
	Plánované	Skutočnosť	Oprávnené	Plánované	Skutočnosť	Oprávnené
<b>Priama dotácia</b>						
Bežné výdavky	98 735	98 735	98 735	625 020	625 020	625 020
Kapitálové výdavky	0	0	0	170 000	170 000	170 000
<b>Priama dotácia celkom</b>	<b>98 735</b>	<b>98 735</b>	<b>98 735</b>	<b>795 020</b>	<b>795 020</b>	<b>795 020</b>
<b>Vlastné prostriedky</b>						
Bežné výdavky	34 300	34 300	34 300	173 200	173 200	173 200
Kapitálové výdavky	0	0	0	100 000	100 000	100 000
<b>Vlastné prostriedky celkom</b>	<b>34 300</b>	<b>34 300</b>	<b>34 300</b>	<b>273 200</b>	<b>273 200</b>	<b>273 200</b>

**Tabuľka č. 9** Prehľad čerpania finančných prostriedkov za 1. etapu riešenia projektu.

## **Hlavné realizované výstupy v 2. etape riešenia (01/2015 – 12/2015):**

- 1) Výskumno-vývojoví pracovníci **riešiteľského kolektívu** projektu boli **zaškolení pre prácu v čistých priestoroch ako aj o vypracovaní a vedení dokumentácie podľa aktuálnych smerníc a pravidiel Správnej výrobnnej praxe (SVP)**, v rámci systému kontinuálneho vzdelávania, ktorý existuje v spoločnosti IMUNA PHARM, a.s. v rámci ISO9001 a zabezpečuje, aby úroveň vedomostí a zručností zamestnancov zodpovedala ich pracovnému zadaniu.



## Hlavné realizované výstupy v 2. etape riešenia (01/2015 – 12/2015):

2) Založenie **Materskej banky pre vírusy mumps, osýpky** na kuracích embryonálnych fibroblastoch (KEF).

Všeobecný postup prípravy možno rozdeliť do niekoľkých individuálnych krokov:

- Príprava primárnych a sekundárnych KEF,
- Infekcia buniek KEF vírusom,
- Spracovanie a skladovanie seedov.



**Obrázok č. 2** Cytopatický efekt počas prípravy Materskej banky pre vírus mumpsu (vľavo) a Pracovnej banky pre vírus osýpok (vpravo) 2 dni po infekcii kuracích embryonálnych fibroblastov (KEF).

## Hlavné realizované výstupy v 2. etape riešenia (01/2015 – 12/2015):

2) Založenie **Materskej banky pre vírusy mumps, osýpky** na kuracích embryonálnych fibroblastoch (KEF).

Všeobecný postup prípravy možno rozdeliť do niekoľkých individuálnych krokov:

- Príprava primárnych a sekundárnych KEF,
- Infekcia buniek KEF vírusom,
- Spracovanie a skladovanie seedov.

Celkovo bolo pripravených **200 ks kryo-skúmaviek** so suspenziou Materskej banky - **MSV** a **350 ks kryo-skúmaviek** so suspenziou Pracovnej banky - **WSV** pomnoženej na bunkách KEF.



## Hlavné realizované výstupy v 2. etape riešenia (01/2015 – 12/2015):

### 2) Založenie **Materskej banky pre vírusy mumps, osýpky** na kuracích embryonálnych fibroblastoch (KEF)

Názov čiastkovej aktivity	Trvanie aktivity	Počet pracovníkov
Príprava primárnych a sekundárnych KEF	3 týždne	2 pracovníci
Infekcia a zber harvestov – MSV mumps	1 týždeň	2 pracovníci
Príprava primárnych a sekundárnych KEF	3 týždne	2 pracovníci
Infekcia s MSV a zber harvestov – WSV mumps	1 týždeň	2 pracovníci

**Tabuľka č. 10** *Prehľad aktivít súvisiacich s prípravou Materských a Pracovných bánk pre vírus mumps na kuracích embryonálnych fibroblastoch.*

Názov čiastkovej aktivity	Trvanie aktivity	Počet pracovníkov
Príprava primárnych a sekundárnych KEF	3 týždne	2 pracovníci
Infekcia a zber harvestov – MSV osýpky	1 týždeň	2 pracovníci
Príprava primárnych a sekundárnych KEF	3 týždne	2 pracovníci
Infekcia s MSV a zber harvestov – WSV osýpky	1 týždeň	2 pracovníci

**Tabuľka č. 11** *Prehľad aktivít súvisiacich s prípravou Materských a Pracovných bánk pre vírus osýpky na kuracích embryonálnych fibroblastoch.*

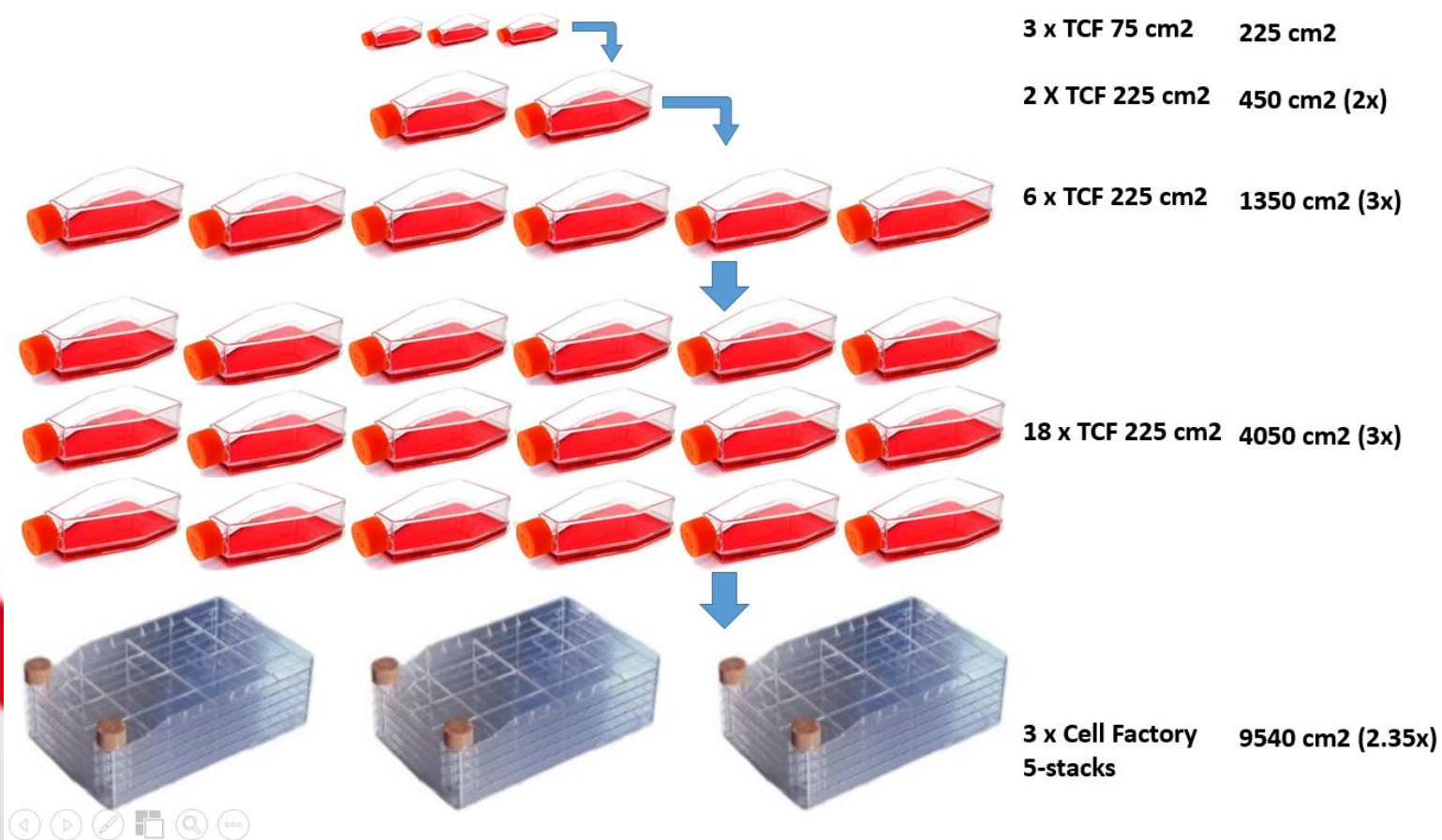
## Hlavné realizované výstupy v 2. etape riešenia (01/2015 – 12/2015):

- 3) V sledovanom období sa uskutočnil **prieskum trhu s cieľom identifikovať vhodného dodávateľa ľudských diploidných buniek MRC-5 určených pre výrobné účely** prípravy cell bankov a seedov vírusu rubeoly vakcinačného kmeňa RA27/3 od Wistar Institute, Philadelphia, USA. **Bunky MRC-5 určené pre výrobné účely** boli v sledovanom období **zakúpené z jediného WHO schváleného zdroja** – bunkovej banky **Public Health of England** (Úrad verejného zdravotníctva Anglicka), resp. NIBSC.



## Hlavné realizované výstupy v 2. etape riešenia (01/2015 – 12/2015):

- 4) Založenie pilotných **Materských a Pracovných bánk (Master a Working Cell Bank)** pre ľudské diploidné bunky MRC-5



Obrázok č. 3 Grafické znázornenie postupu použitého pri pilotnom Master Cell bank.

## Hlavné realizované výstupy v 2. etape riešenia (01/2015 – 12/2015):

- 4) Založenie pilotných **Materských a Pracovných bánk (Master a Working Cell Bank)** pre ľudské diploidné bunky MRC-5

Cell banking MRC-5	Postup	Dĺžka trvania aktivity	Počet pasáží	Počet pripravených kryoskúmaviek
Master Cell Bank - pilot	1 skúmavka po 3ks 5-poschodové kultivačné fľaše	1 mesiac	+5	41
Working Cell Bank – pilot	1 skúmavka po 6ks 5-poschodové kultivačné fľaše	1,5 mesiaca	+5	156

Tabuľka č. 12 Pilotný Master a Working Cell Bank – prehľad.

## Hlavné realizované výstupy v 2. etape riešenia (01/2015 – 12/2015):

- 5) Založenie pilotných **Materských a Pracovných vírusových bánk (Master a Working seed)** pre vírus rubeola

**Pilotný Working Seed - A**

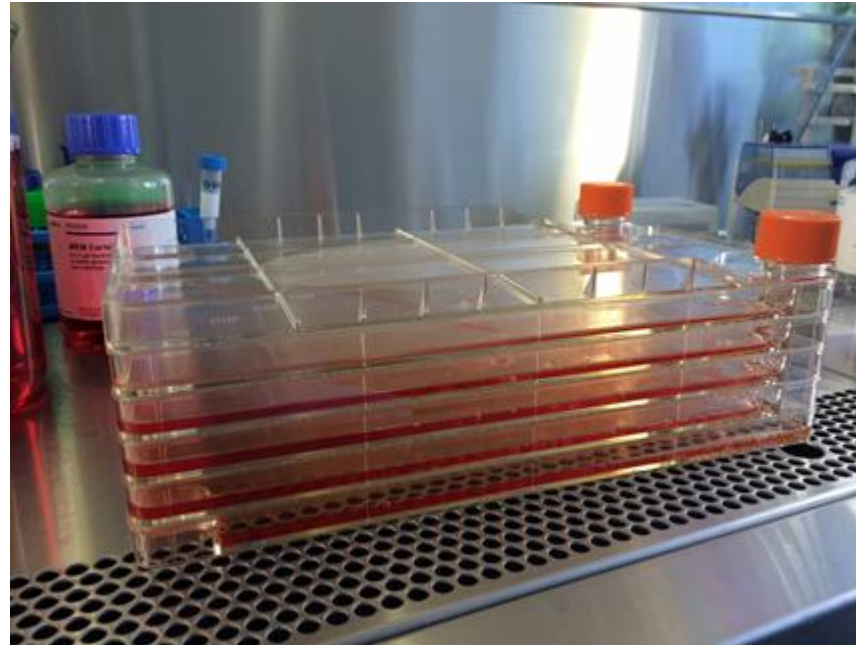


**Obrázok č. 4** *Príprava vírusu rubeola kmeňa RA27/3 pasáže +2 v pilotnom Working Seed Lot v Roller fľašiach.*

## Hlavné realizované výstupy v 2. etape riešenia (01/2015 – 12/2015):

5) Založenie pilotných **Materských a Pracovných vírusových bánk (Master a Working seed)** pre vírus rubeola

**Pilotný Working Seed - B**



**Obrázok č. 5** *Príprava vírusu rubeola kmeňa RA27/3 pasáže +2 v pilotnom Working Seed Lot v Cell Factory (5-poschodovej kultivačnej fľaši).*

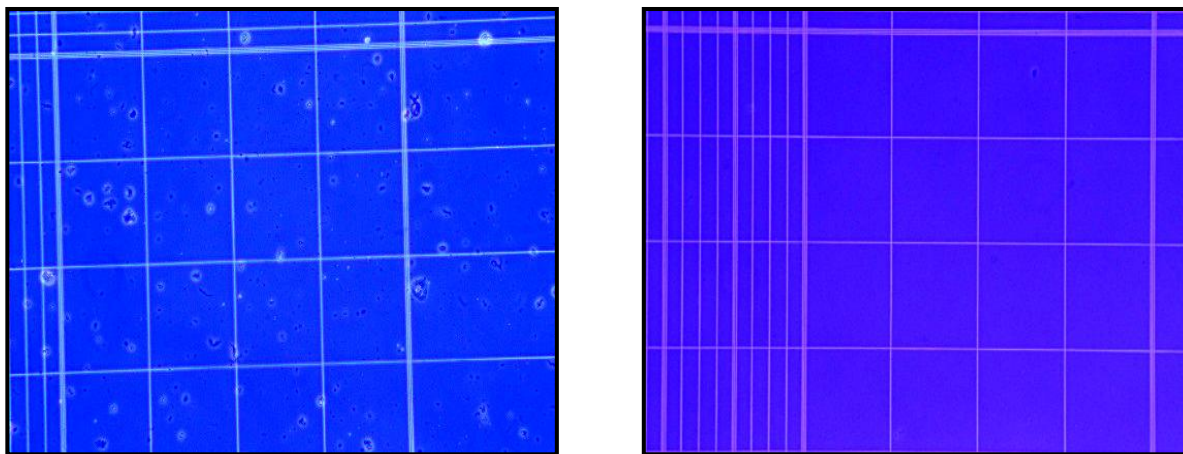
## Hlavné realizované výstupy v 2. etape riešenia (01/2015 – 12/2015):

Názov čiastkovej aktivity	Trvanie aktivity	Počet pracovníkov
MSV a WSV – mumps a osýpky	3 mesiace	2 pracovníci
Pilot MCB and WCB pre MRC-5	6 mesiacov	3 pracovníci
Príprava MRC-5 buniek pre pilot MSV	1 mesiac	3 pracovníci
Pilot MSV – rubeola	3 týždne	3 pracovníci
Príprava MRC-5 buniek pre pilot WSV	2 mesiace	4 pracovníci
Pilot WSV - rubeola	1 mesiac	4 pracovníci

**Tabuľka č. 13** *Prehľad dĺžky aktivít súvisiacich s pilot Cell banking a pilot MSV/WSV.*

## Hlavné realizované výstupy v 2. etape riešenia (01/2015 – 12/2015):

- 6) **A.** Riešiteľský tím v sledovanom období zaviedol podľa požiadaviek európskeho liekopisu metódu stanovenia morfológie plakov vírusu rubeoly („Test Identity“).
- B.** Riešiteľský tím v sledovanom období zaviedol a zvalidoval podľa požiadaviek európskeho liekopisu metódu neprítomnosti intaktných buniek vo finálnom produkte („ICCT“)



**Obrázok č. 6** ICCT test. Intaktné reziduálne bunky v živej tekutej vakcíne **pred filtráciou** (vľavo) a **po filtrácií** (vpravo) značené trypanovou modrou a počítané pomocou hemacytometra.

## 2. etapa riešenia projektu - čerpanie finančných prostriedkov:



<b>2. etapa: 1/2015 - 12/2015 (v eurách)</b>			
	Plánované	Skutočnosť	Oprávnené
<b>Priama dotácia</b>			
Bežné výdavky	690 720	690 720	690 720
Kapitálové výdavky	0	0	0
<b>Priama dotácia celkom</b>	<b>690 720</b>	<b>690 720</b>	<b>690 720</b>
<b>Vlastné prostriedky</b>			
Bežné výdavky	233 800	233 800	233 800
Kapitálové výdavky	0	0	0
<b>Vlastné prostriedky celkom</b>	<b>233 800</b>	<b>233 800</b>	<b>233 800</b>

**Tabuľka č. 14** *Prehľad čerpania finančných prostriedkov za 2. etapu riešenia projektu.*

## Výstupy v 3. etape riešenia (01/2016 – 10/2016):

- 1) Presun procesov do čistých priestorov triedy čistoty A (s pozadím B/C), vypracovanie riadenej dokumentácie pre prácu v čistých priestoroch podľa pravidiel Správnej výrobnnej praxe (SVP) a pre procesy realizované v priestoroch podliehajúcich SVP.



## Výstupy v 3. etape riešenia (01/2016 – 10/2016):

2) Testovanie založených **Master a Working seedov pre vírusy** mumps, osýpky na kuracích embryonálnych fibroblastoch (CEF).

Zoznam testovaných MSL a WSL:

**WSL M (p +2)** – KEF, 27/11/15 - vírus osýpok

**WSL P (p +2)** – KEF, 25/11/15 – vírus mumpsu

**MSL M (p +1)** – KEF, 16/11/15 – vírus osýpok

**MSL P (p +1)** – KEF, 12/11/15 – vírus mumpsu

NÁZOV TESTU	POPIS METÓDY	TYP VZORKY	OČAKÁVANÝ VÝSLEDOK
Sterility test	Kultivácia inokula na sójovom kaseine a FTM médiu pre detekciu aeróbných a anaeróbných baktérii a plesní.	Harvesty	Vyhovuje
Titer vírusu	TCID50	Harvesty	Hodnota TCID50 $\geq$ 5.0 log10
Mycoplasma	PCR	Harvesty	Negatívne
Sekvenovanie genómu	-	Master a Working Seed Lot	Stabilita kmeňov po každej ďalšej pasáži.

**Tabuľka č. 15** Prehľad základných testov na MSL a WSL pre vírus osýpky a mumps na KEF.

## Výstupy v 3. etape riešenia (01/2016 – 10/2016):

3) **Opätovné založenie Master a Working seedov pre vírusy mumps, osýpky na kuracích embryonálnych fibroblastoch (CEF) v priestoroch triedy čistoty A (s pozadím B/C).**

Master Seed Lot MOVIVAC\_CEF= 200 kryovialiek

Master Seed Lot PAVIVAC\_CEF= 200 kryovialiek

Working Seed Lot PAVIVAC\_CEF= 200 kryovialiek

## Výstupy v 3. etape riešenia (01/2016 – 10/2016):

- 4) Cell banking pre diploidnú bunkovú líniu MRC-5 v priestoroch triedy čistoty A (s pozadím B/C).



**Obrázok č. 7** Členovia riešiteľského tímu pri výmene média počas prípravy Cell Bank buniek MRC-5 v čistých priestoroch.

## Výstupy v 3. etape riešenia (01/2016 – 10/2016):

4) Cell banking pre diploidnú bunkovú líniu MRC-5 v priestoroch triedy čistoty A (s pozadím B/C).

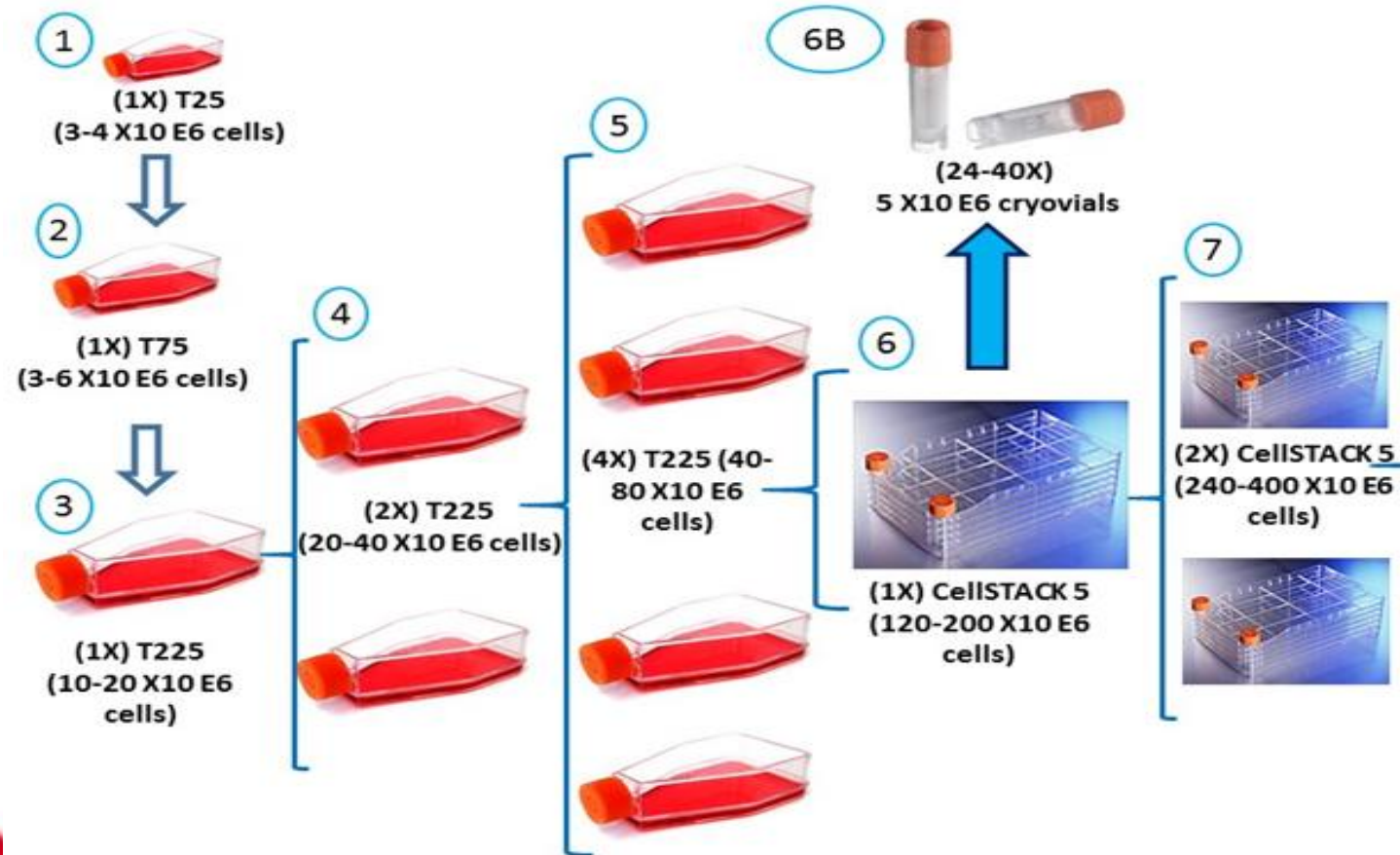


Schéma č. 2 Kroky procesu prípravy Cell Bankingu.

## Výstupy v 3. etape riešenia (01/2016 – 10/2016):

5) **Stabilizácia tekutej vakcíny proti rubeole** pre jej uskladnenie.

Z 5 testovaných kombinácií stabilizátorov sa ako najvhodnejší stabilizátor tekutej vakcíny proti rubeole sa javí **SHS kombinácia**.



## Výstupy v 3. etape riešenia (01/2016 – 10/2016):

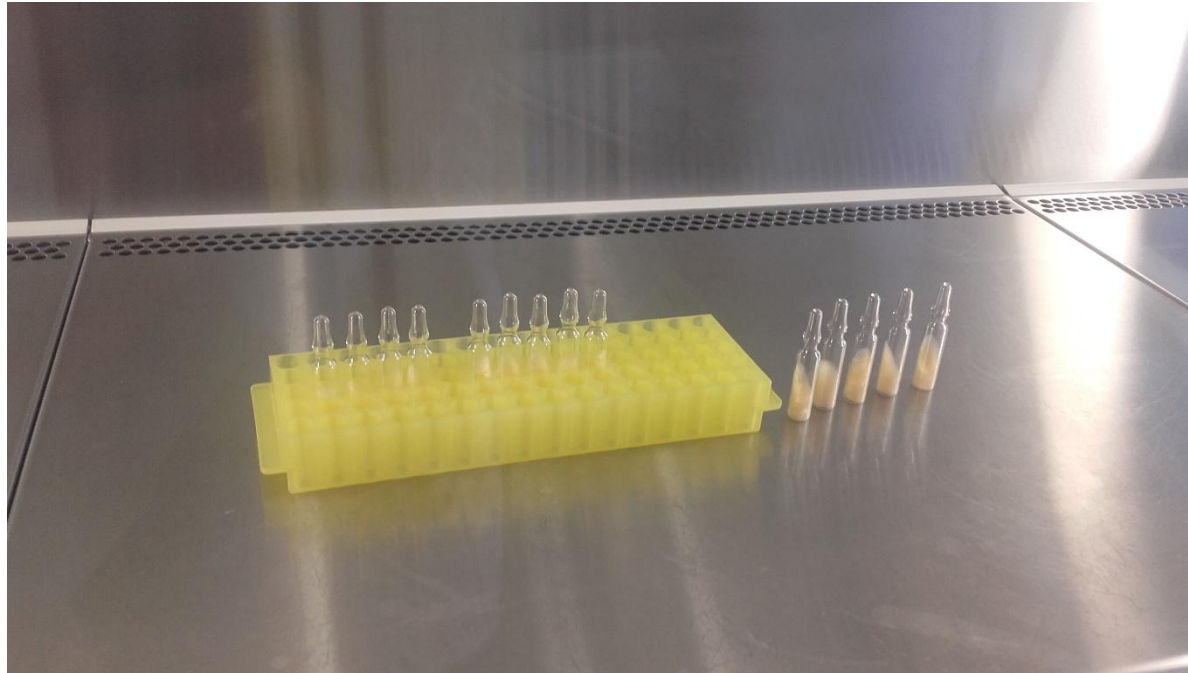
6) **Výroba šarží lyofilizovanej monovakcíny proti rubeole, výstupná kontrola a založenie stabilitných štúdií** pre overenie vplyvu teploty uskladnenia na kvalitu a bezpečnosť prípravku.



**Obrázok č. 8** Členovia riešiteľského tímu pri výrobe šarží lyofilizovaných monovakcín proti rubeole v čistých priestoroch.

## Výstupy v 3. etape riešenia (01/2016 – 10/2016):

6) **Výroba šarží lyofilizovanej monovakcíny proti rubeole, výstupná kontrola a založenie stabilitných štúdií** pre overenie vplyvu teploty uskladnenia na kvalitu a bezpečnosť prípravku.

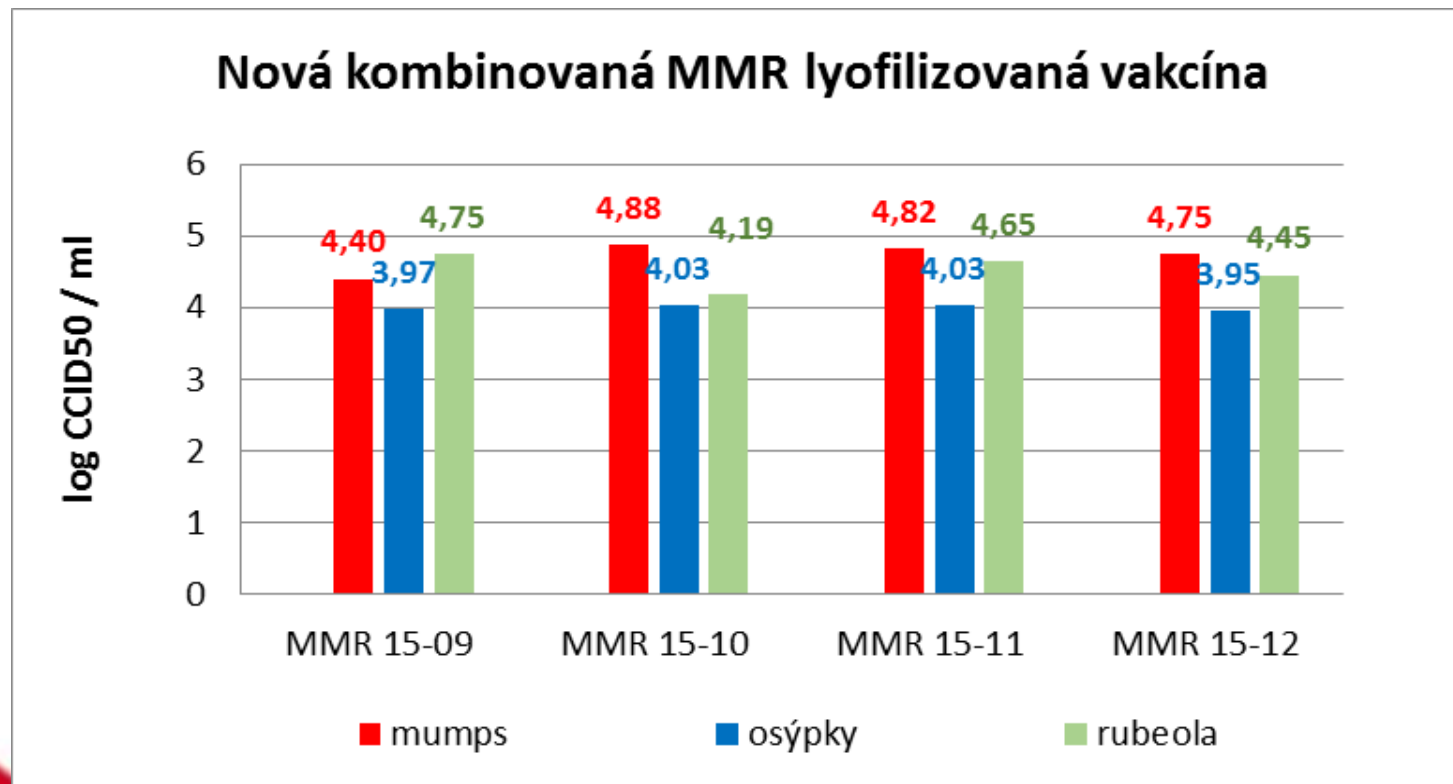


Obrázok č. 9 *Lyofilizovaná monovakcína proti rubeole.*

Z 10 testovaných kombinácií stabilizátorov sa ako najvhodnejší stabilizátor lyo monovakcíny proti rubeole javí **Kombinácia zmes AMK a Mannitolu.**

## Výstupy v 3. etape riešenia (01/2016 – 10/2016):

- 7) Výroba šarží lyofilizovanej trojvalentnej vakcíny MMR, výstupná kontrola a založenie stabilitných štúdií pre overenie vplyvu teploty uskladnenia na kvalitu a bezpečnosť prípravku.



**Graf č. 1** Stanovenie titra (účinnosti) vírusov mumps, osýpky, rubeola v šaržiach lyofilizovanej MMR vakcíny v čase 0 a založenie stabilitných štúdií (s nastaveným titrom 4,1 (osýpky); 5,0 (mumps); 4,3 (rubeola) log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml).



## Výstupy v 3. etape riešenia (01/2016 – 10/2016):

7) **Výroba šarží lyofilizovanej trojvalentnej vakcíny MMR, výstupná kontrola a založenie stabilitných štúdií** pre overenie vplyvu teploty uskladnenia na kvalitu a bezpečnosť prípravku.



**Obrázok č. 10** Nová kombinovaná trojvalentná lyofilizovaná MMR vakcína (šarža 15-09).

## Výstupy v 3. etape riešenia (01/2016 – 10/2016):

### 8) Predklinické skúšanie - *in vivo* skúšky bezpečnosti a neškodnosti vakcín.

Za účelom predklinického testovania novovyrobených šarží vakcíny pre humánne použitie a posúdenia jej bezpečnosti bolo nevyhnutné v priebehu kontrolovaného obdobia vykonať dve *in vivo* skúšky na zvieracích modeloch:

*Dôkaz cudzích agens v humánných vírusových vakcínach / Tests for extraneous agents in viral vaccines for human use, Ph. Eur. (2.6.16.)*

*Skúška na neškodnosť - imunoséra a vakcíny pre humánne použitie / Abnormal toxicity-immunosera and vaccines for human use Ph.Eur. (2.6.9)*

**Výsledok:** Všetky testované šarže vakcín (tekutých aj lyofilizovaných) vyhovujú požiadavkám bezpečnosti a neškodnosti.



## Výstupy v 3. etape riešenia (01/2016 – 10/2016):

9) **Vývoj kontrolných metodík** pre kontrolu kvality a bezpečnosti tekutých a lyofilizovaných vakcín.

Boli vyvinuté a zavedené do praxe 2 nové metodiky pre testovanie tekutej a lyofilizovanej vakcíny podľa odporúčaní Ph. Eur.

Detekcia *Mycoplasma spp.* v bunkových kultúrach, virálnej tekutine, tekutej/lyofilizovanej vakcíne

Stanovenie stupňa farebnosti rozpustenej očkovacej látky kolorimetrickou metódou Lovibond (Ph.Eur. 2.2.2; II.)

## Výstupy v 3. etape riešenia (01/2016 – 10/2016):

### 10) Publikácie a prezentácie výsledkov na medzinárodnom kongrese.

AFG-Petrovajová D., Tomková M. and Horňáková T . Mumps Virus Propagation in Vero Cell Culture System. Zborník abstraktov z prednášok 12<sup>th</sup> International Congress of Cell Biology, Prague, Czech Republic, 2016, July, p.230

AFG-Tomková M., Bubanová M., Lopez Cardoso F. M., Horňáková T., Evaluation and Validation of a Potency Testing Method for Live Rubella Virus Vaccine. Zborník abstraktov z prednášok 12<sup>th</sup> International Congress of Cell Biology, Prague, Czech Republic, 2016, July, p. 230

ADD- Tomková M., Cardoso F.M., Bubanová M. and Horňáková T., Evaluation and Validation of a Potency Testing Method for Live Rubella Virus Vaccine. 2016. Acta Virologica – submitted.

ADD- Cardoso F.M., Petrovajová D. and Horňáková T. ,Viral vaccine stabilizers: current status and trends. 2016. Acta Virologica – accepted, in press.



### 3. etapa riešenia projektu - čerpanie finančných prostriedkov:



<b>3. etapa: 1/2016 - 10/2016 (v eurách)</b>			
	Plánované	Skutočnosť	Oprávnené
<b>Priama dotácia</b>			
Bežné výdavky	394 400	394 400	394 400
Kapitálové výdavky	0	0	0
<b>Priama dotácia celkom</b>	<b>394 400</b>	<b>394 400</b>	<b>394 400</b>
<b>Vlastné prostriedky</b>			
Bežné výdavky	138 000	158 489,54	158 489,54
Kapitálové výdavky	0	0	0
<b>Vlastné prostriedky celkom</b>	<b>138 000</b>	<b>158 489,54</b>	<b>158 489,54</b>

**Tabuľka č. 16** Prehľad čerpania finančných prostriedkov za 3. etapu riešenia projektu.

## Hlavné realizované výstupy za celé riešenie

Výstup hmotný/nehmotný*	Názov výstupu	Charakteristika výstupu	Priebežný stav plnenia	Konečný termín dosiahnutia výstupu	Výstup, ktorý bude predmetom realizácie po ukončení riešenia / termín	Určený realizátor/užívateľ/ostatní predpokladaní nepovinní realizátori resp. užívateľa	Patentovoprávna ochrana a ostatné využitie (patenty, úžitkové vzory, licencie, aplikované výsledky a pod.)
Hmotný	3 pracovné miesta	Pridaná hodnota	Výstup splnený	2014	-	IMUNA PHARM, a.s.	-
Nehmotný	2 publikácie	Nové poznatky	Výstup čiastočne splnený	2016	-	IMUNA PHARM, a.s.	-
Nehmotný	konferencia	Prezentácia výsledkov	Výstup zrealizovaný	2016	-	IMUNA PHARM, a.s.	-
Hmotný	Master seed lot systém	Seed lot systém pre vírusy Mumps a Osýpky	Výstup splnený	2015	-	IMUNA PHARM, a.s.	-
Hmotný	Cell bank systém	Inovovaný bunkový substrát	Výstup splnený	2016	-	IMUNA PHARM, a.s.	-
Hmotný	Prototyp	Tekutá vakcína proti rubeole	Výstup splnený	2016	-	IMUNA PHARM, a.s.	-
Hmotný	Prototyp	Lyofilizovaná monovakcína proti rubeole	Výstup splnený	2016	-	IMUNA PHARM, a.s.	-
Hmotný	Prototyp	Inovovaná lyofilizovaná vakcína MMR	Výstup splnený	2016	-	IMUNA PHARM, a.s.	-

Tabuľka č. 17 Prehľad hlavných realizovaných výstupov za celé obdobie realizácie projektu.

## Popis prínosov za celé riešenie

### Ekonomické prínosy:

**1. Názov prínosu:** Tvorba vysokokvalifikovaných pracovných miest  
**Charakteristika prínosu:** Vytvorenie nových výskumných pracovných miest v regióne s dlhodobo nepriaznivým vývojom zamestnanosti.  
**Druh výstupu :** priamo – novovytvorené pracovné miesta (3)  
nepriamo – udržanie existujúcich pracovných miest

**2.Názov prínosu:** Master seed lot systém a cell bank systém  
**Charakteristika prínosu:** Vytvorenie zásoby vstupných výrobných surovín pre výrobu vakcín pre komerčné účely.  
**Druh výstupu:** priamo – zvýšenie konkurencieschopnosti  
priamo – prototyp nového produktu  
nepriamo – nové pracovné miesta

**2.Názov prínosu:** kmeň rubeoly RA27/3 pre komerčné účely  
**Charakteristika prínosu:** Zakúpenie kmeňa RA27/3 rubeoly ako základnej vstupnej suroviny pre výrobu vakcín pre komerčné účely.  
**Druh výstupu:** priamo – zvýšenie konkurencieschopnosti  
priamo – prototyp nového produktu  
nepriamo – nové pracovné miesta

### Spoločenské prínosy:

**1. Názov prínosu:** Prepojenosť vývojových a výrobných aktivít a tým rozvoj odborného a technického potenciálu ľudských zdrojov.  
**Charakteristika prínosu:** Vytvorenie podmienok pre ďalší odborný rast ľudských zdrojov a vytvorenie úzkej spolupráce výskumných, výrobných a kontrolných zložiek, ktoré umožňuje rýchlejšiu aplikáciu vedeckých poznatkov do praxe.

**2.Názov prínosu:** Zlepšenie kvality a bezpečnosti vakcín.  
**Charakteristika prínosu:** Zavedenie nových kontrolných testov v súlade s aktuálnymi požiadavkami Ph. Eur. a WHO ako súčasť výstupnej kontroly nových produktov.  
**Druh výstupu:** priamo - zvýšenie stability produktu  
priamo – zvýšenie bezpečnosti produktu  
nepriamo – zvýšenie konkurencieschopnosti produktu







# INOVUJEME TRADÍCIU

