

Oltóanyagok: Működés, követelmények, típusok, előállítási lehetőségek

Dr. Kupcsulik Bálint

Tartalom

- ▶ Bemutatkozás
- ▶ Védőoltások
 - ▶ miért és mikor oltanak?
 - ▶ mit oltanak?
 - ▶ szabályozás
 - ▶ technológia fejlesztés alapjai
- ▶ Omics vs. Nagy hatékonyságú módszerek
 - ▶ 1. példa – komplex *Actinobacillus* oltóanyag
 - ▶ 2. példa – Klasszikus statisztikai alapú fejlesztés - *Manheimia haemolytica* leukotoxin
 - ▶ 3. példa – Gyártástechnológia kiválasztása – Elölt vírus antigén előállítása

...illetve ameddig jutunk...



Ceva



- ▶ A Ceva olyan állategészségügyi cég, ami maga fejleszti, gyártja és forgalmazza termékeit.
- ▶ A Ceva a menedzsment többségi tulajdonában van.
- ▶ 43 országban van jelen saját céggel, 110 országban ad el.
- ▶ A Cevának ~5000 alkalmazottja van világszerte.
- ▶ Innovation, Entrepreneurial Spirit, Solidarity

“Together, we are building a new reference to create value beyond animal health”

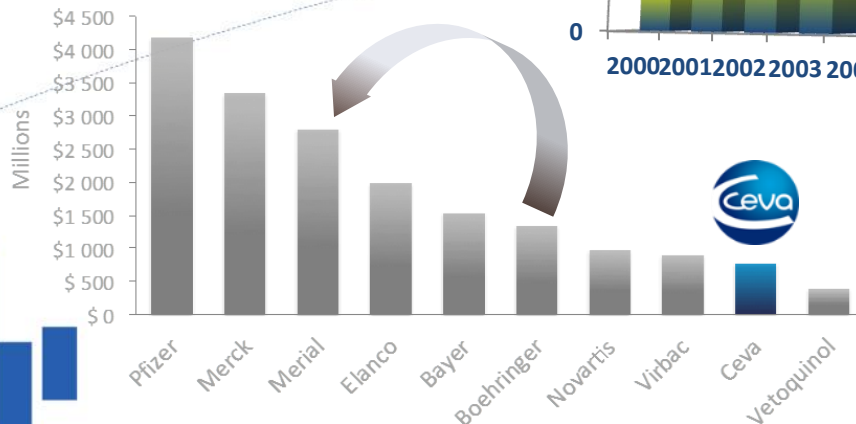


Ceva a top állatgyógyászati cégek között

A Ceva eladásai 3 év alatt ötszörösére nőttek.



Market value USD



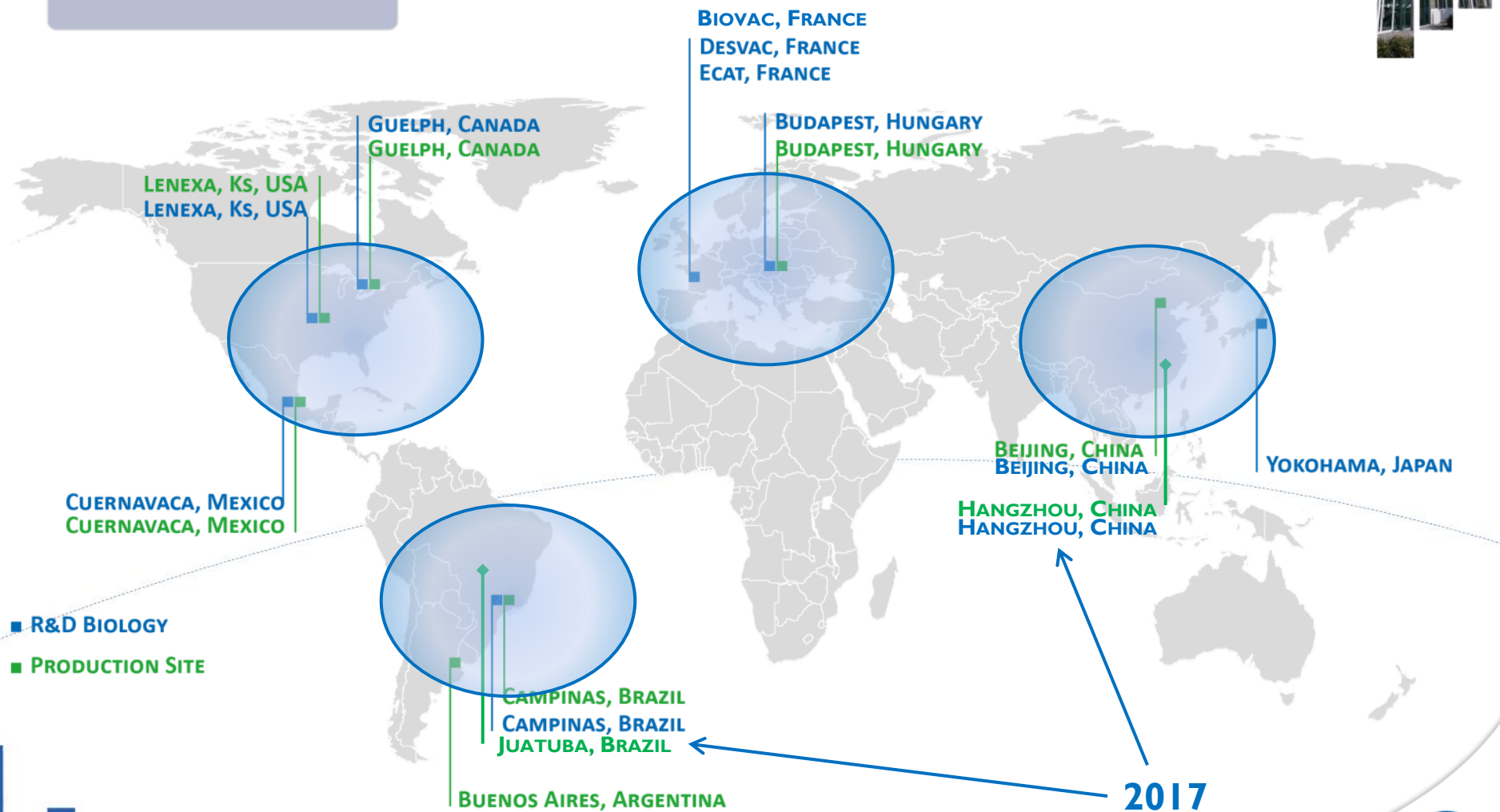
2015 : 856.4 M EUR
2016 : 912.3 M EUR



Ceva biológiai gyártás/fejlesztés



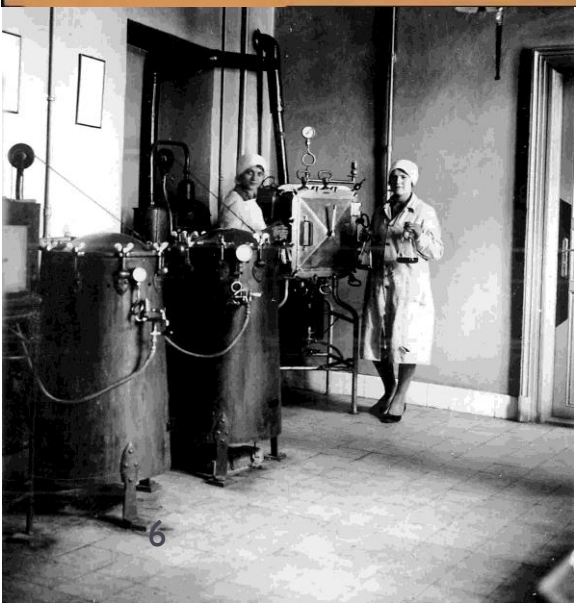
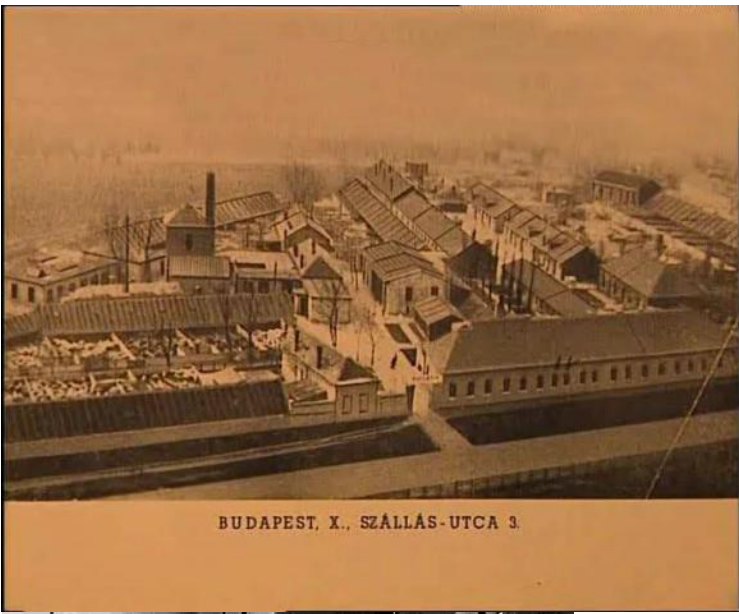
Global Biology network



2017



Ceva-Phylaxia Zrt.

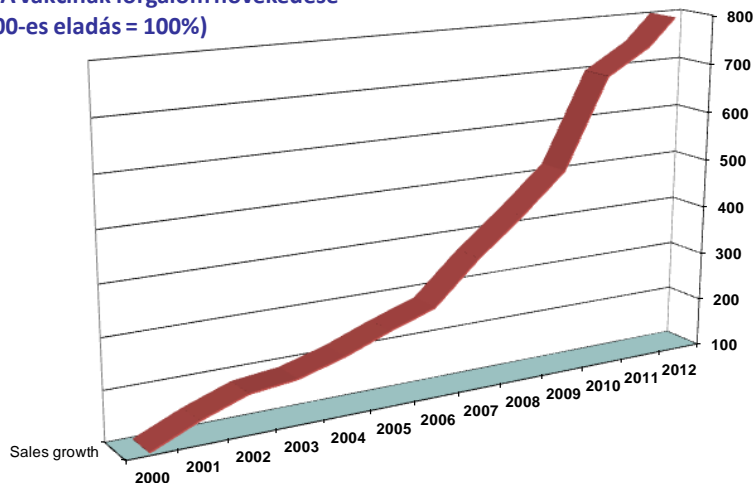


Ceva-Phylaxia Zrt.

CEVA-PHYLAXIA

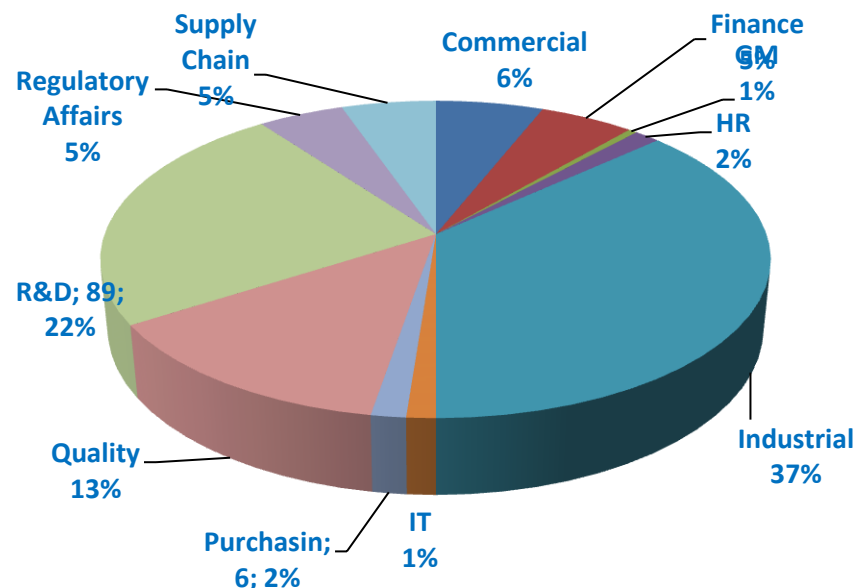
- ▶ Budapest, EU
- ▶ Európai GMP gyártás

A CEVA-PHYLAXIA vakcinák forgalom növekedése
(2000-es eladás = 100%)



Ceva csoport tagja:

- 1991



Létszám: 450 (550)

Pl. Cevac Transmune vakcina: 50. milliárd dózis eladva 2015-ben!

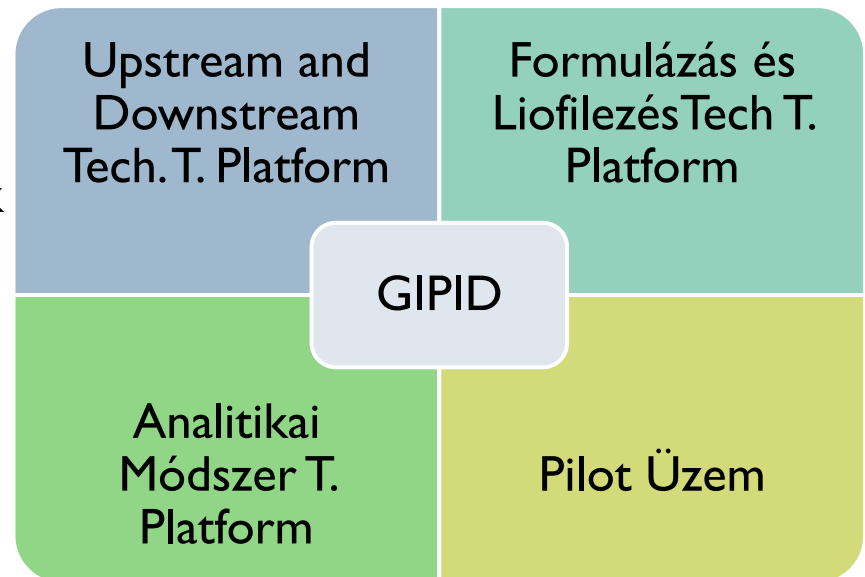
Globális iparosítási és folyamatfejlesztési igazgatóság

Tevékenység

- ▶ Gyártás és analitikai technológia transzfer a K+F-ből a termelésbe, Ceva telephelyek között, külső partnertől/hez
- ▶ Kiemelt folyamat fejlesztési projektek
- ▶ K+F támogatás

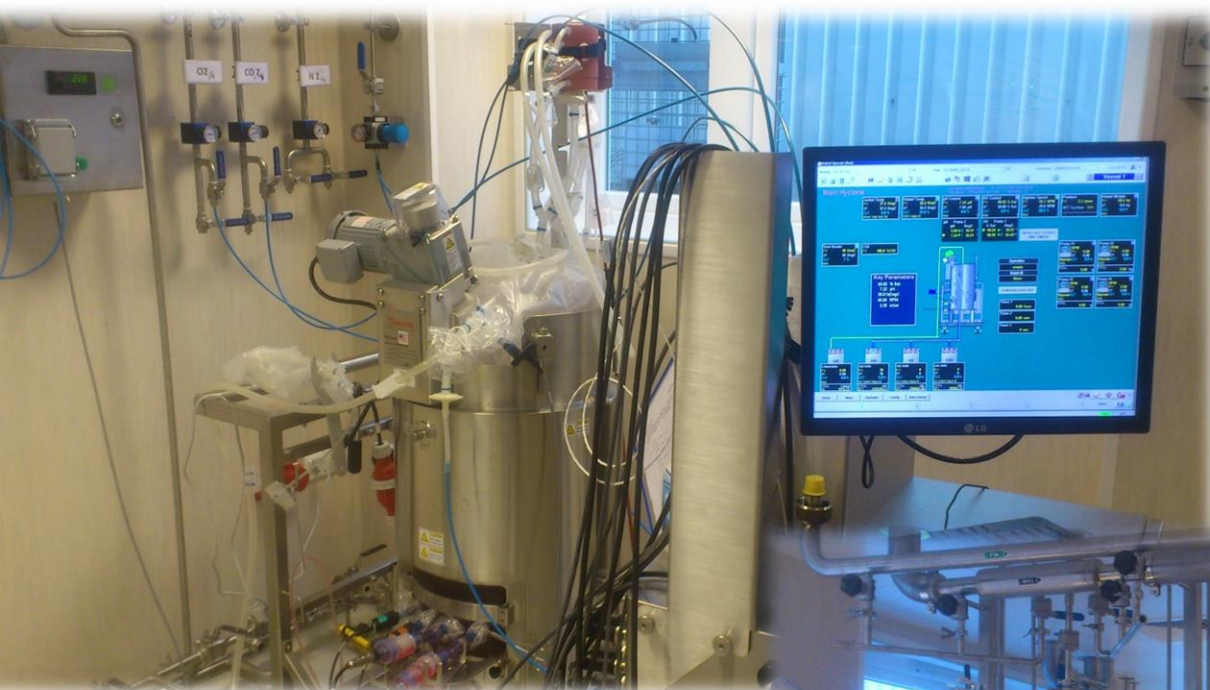
Szervezet

- ▶ 6 telephelyen 50 fő
- ▶ ebből 28 fő Budapesten
- ▶ Biomérnökök, biológusok, állatorvosok
- ▶ Technikusok
- ▶ Dedikált laboratóriumok



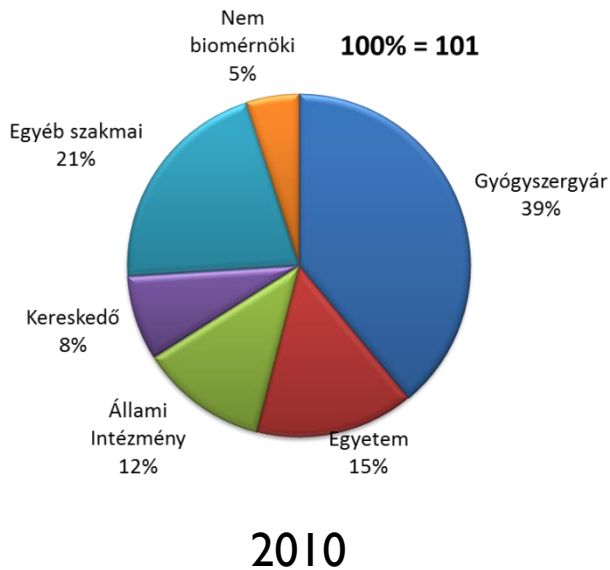


Pilot Plant

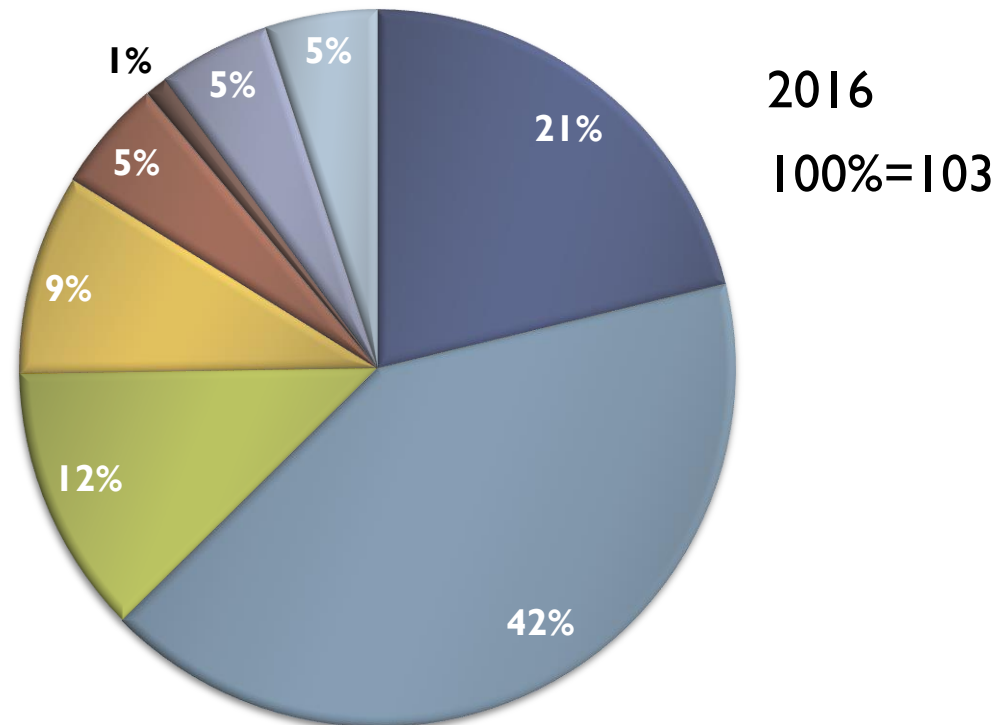


Mit fog Ön csinálni, ha lediplomázott?

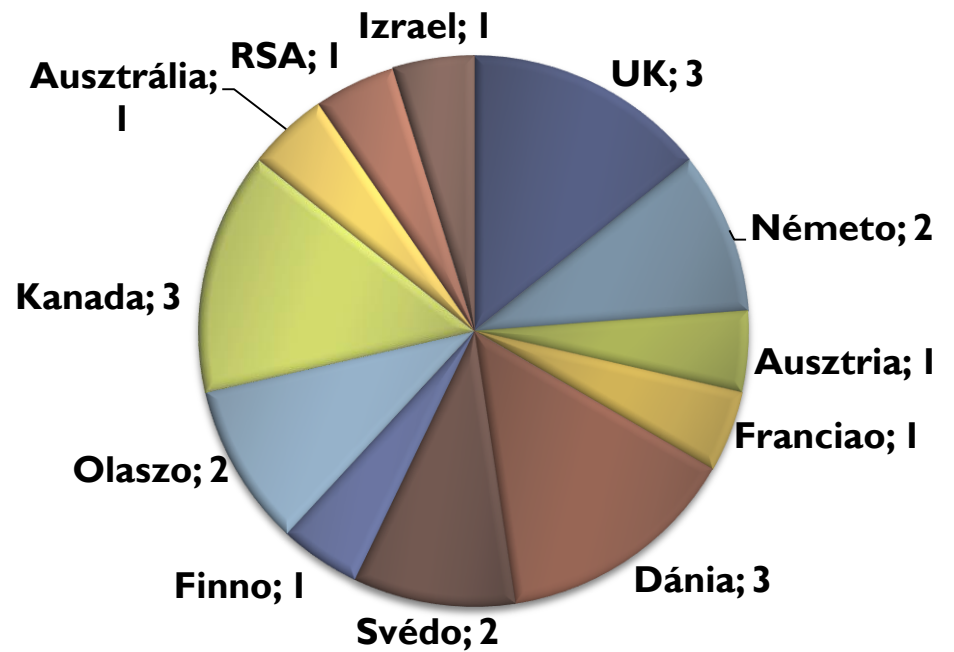
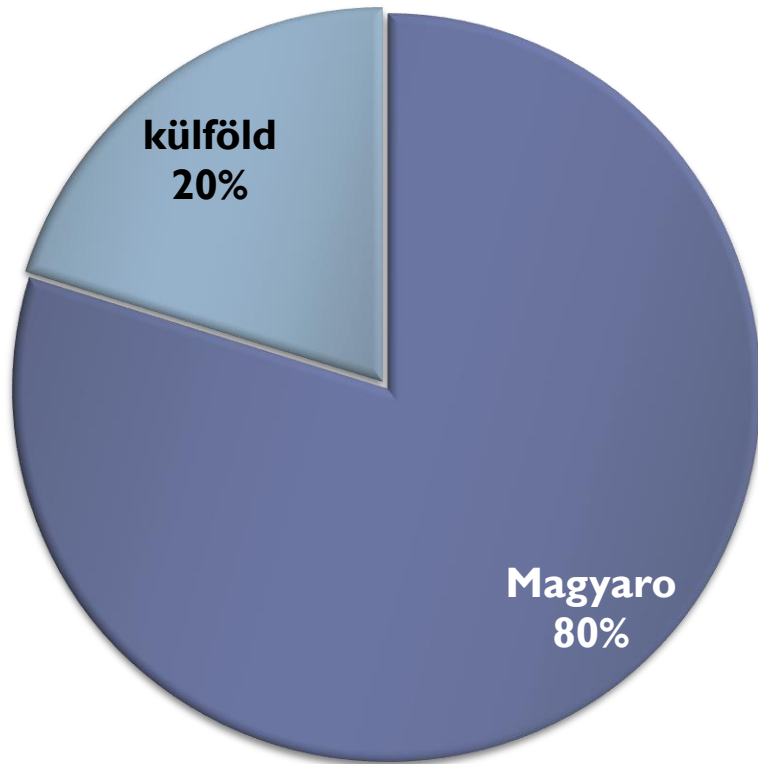
- ▶ A felmérés nem reprezentatív, a szakmai kapcsolatban állók vélhetőleg fölül reprezentáltak



akadémiai gyógyszeripar állami hivatal spin-off
kereskedelem élelmiszeripar szolgáltatás vegyipar



Hol fog élni?



Kötelező védőoltások Magyarországon

0-4 hét	BCG
2 hónap	DTPa + Hib + IPV +PCV-13
3 hónap	DTPa + Hib + IPV
4 hónap	DTPa + Hib + IPV +PCV-13
12 hónap	PCV-13
15 hónap	MMR I.
18 hónap	DTPa + Hib + IPV
6 év	DTPa + IPV
11 év	dTap emlékeztető
11 év	MMR revakcináció
14 év	Hepatitis B I; II; HPV

T - gümőkór (tuberculosis), BCG Bacillus Calmette-Guérin/tuberculosis oltóanyag
D -torokgyík (diphtheria),
P - szamárköhögés (pertussis),
T - merevgörcs (tetanus),
IPV (inaktivált polio vírus) - gyermekbénulás (poliomyelitis anterior acuta),
PCV-13 (Streptococcus pneumoniae)- 13-valens konjugált vakcina
M - kanyaró (morbilli),
R - rózsahimlő (rubeola),
M - mumpsz (parotitis epidemica),
Hib - b típusú Haemophilus influenzae
hepatitis B
HPV – humán papillóma vírus

WHO ajánlása szerint az élővírus tartalmú Sabin vakcina (OPV) alkalmazását 2010-ig minden országban fel kell váltani az inaktivált poliiovírus tartalmú vakcinával (IPV), ugyanis a teljes polioeradikáció mindennemű poliiovírus módosulat cirkulációjának megszüntetése után/útján érhető el.

Mikor oltanak?

- ▶ **Ember:**

- ▶ járványt és súlyos lefolyású megbetegedést okozó vírusok
- ▶ gyors lefolyású bakteriális betegségek (toxinok)
- ▶ nehezen diagnosztizálható, kezelhető betegségek
- ▶ speciális veszélynek kitett személyek
- ▶ **Nem csak egyéni, hanem közösségi védelmet ad!!!** akit nem oltanak be, opportunistá, aki mások jóindulatán élősködik

baktérium

vírus

Kötelező védőoltások Magyarországon

<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	T - gümőkór (tuberculosis), BCG Bacillus Calmette-Guérin/tuberculosis elleni oltóanyag
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	D -torokgyík (diphtheria),
<i>Bordetella pertussis</i>	P - szamárköhögés (pertussis),
<i>Clostridium tetani</i>	T - merevgörcs (tetanus),
polio vírus (Enterovirus)	IPV (inaktivált polio vírus) - gyermekbénulás (poliomyelitis anterior acuta),
Morbilli vírus (Paramyxovirus)	M - kanyaró (morbilli),
Morbilli vírus (Paramyxovirus)	R - rózsahimlő (rubeola),
Mumpsz vírus	M - mumpsz (parotitis epidemica),
<i>Haemophilus influenzae</i>	Hib - b típusú Haemophilus influenzae
haepatitis B vírus (<i>Orthohepadnavirus</i>)	hepatitis B
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Középfül-, arcüreg, agyhártya- és tüdőgyulladás
Human papilloma virus 6, 11, 16, 18	Nemi szerv daganatok, szemölcsök

Közösségi védelem - Rubeola



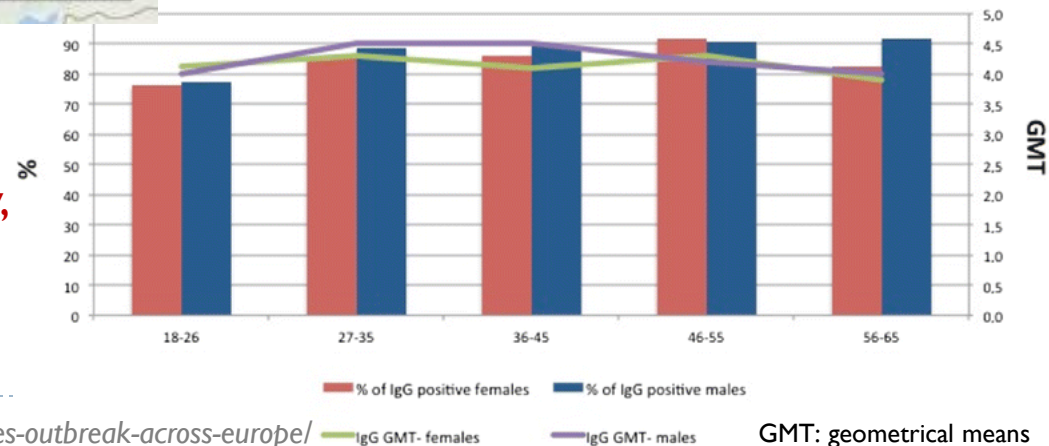
Nem csak egyéni, hanem közösségi védelmet ad!!! akit nem oltanak be, opportunista, aki mások jóindulatán élőködik

„Seven countries, where vaccination rates are low, have had the worst outbreaks in Europe

Measles is spreading across Europe wherever immunisation coverage has dropped, the World Health Organization is warning.

The largest outbreaks are being seen in Italy and Romania.”

„A great proportion of young individuals showed lower levels of protective immunity, probably because they missed out on vaccination in catch up programmes.”



Védőoltások Magyarországon

Dátum / Date	(év / hó / nap) (YYYY / mm / dd)	BCG (TBC/TB)	Diftéria / Diphtheria	Pertusszisz / Pertussis	Tetanusz / Tetanus	Poliomyelitis / IPV	H. influenzae B	Pneumococcus (konjugált) / PCV	Kanyaró / Measles	Mumpsz / Mumps	Rubeola / Rubella	Hepatitis B
2013 FEBR 04									X			
2012 NOV 30			X	X	X	X	X	X				
2012 OKT 20			X	X	X	X	X	X				
2012			X	X	X	X	X	X				
2012		X										
09. 27.												
09. 28.			X	X	X	X	X	X				

Infant's name: AN C. K.

741-1

Lot: H2212-1	Exp: 11-2013	Lot: J4086-1	Exp: 08-2014
Lot: H2212-1	Exp: 11-2013	Lot: F9583-4	Exp: 09 2014

Oltóanyag neve, száma /
 Brand name and batch of vaccine

Oltóorvos aláírása
 Official stamp of

Rotarix
 Lot: AR0LA498A1

NeisVac-C
 Lot: VN920615

Dr. Némethy
 Dr. Némethy
 Dr. Némethy



Mikor oltanak?

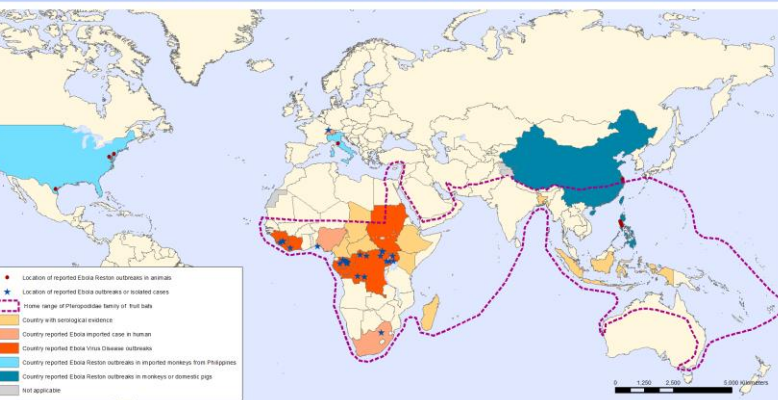
▶ Ember:

- ▶ járványt és súlyos lefolyású megbetegedést okozó vírusok
- ▶ gyors lefolyású bakteriális betegségek (toxinok)
- ▶ nehezen diagnosztizálható, kezelhető betegségek
- ▶ speciális veszélynek kitett személyek

Miért nincs Ebola elleni védőoltás?

Miért nincs Ebola elleni oltás?

Geographic distribution of Ebola virus disease outbreaks in humans and animals



boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted and dashed lines on maps represent approximate border lines which there may not yet be full agreement.

Data Source: World Health Organization
Map Production: Health Statistics and Information Systems (HSIS)
World Health Organization

World Health Organization
© WHO 2014. All rights reserved.

mert eddig nem volt piaca.



First outbreak of Ebola in Zaire

1976
318
280



Ebola Reston introduced into US quarantine facilities by monkey from the Philippines

1989
0
0



Outbreak in DRC Index patient worked in the forest adjoining the city

1995
315
250



Outbreak in Uganda associated with funeral attendance and caring for patients with Ebola without proper PPE

2000-2001
425
224



Outbreak in DRC Last confirmed case on 10/4 and last death 10/10

2007
264
187



Lab infection by accidental stick of contaminated needle



Outbreak in Gabon in gold-mining camps in the rainforest



Lab contamination in Russia



First outbreak reported in the Republic of Congo



Outbreak of a new strain of Ebola in western Uganda

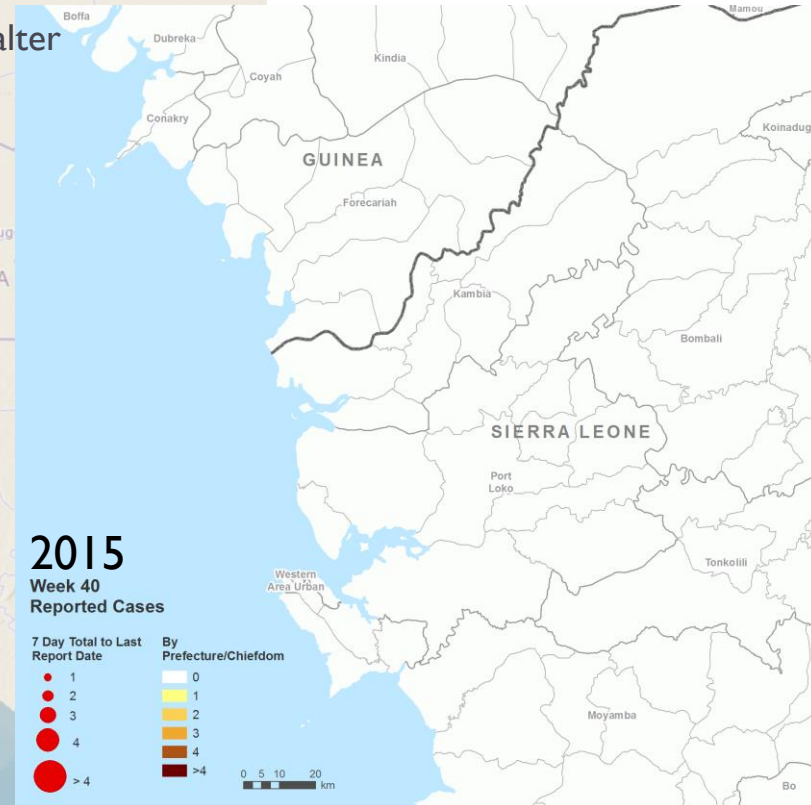
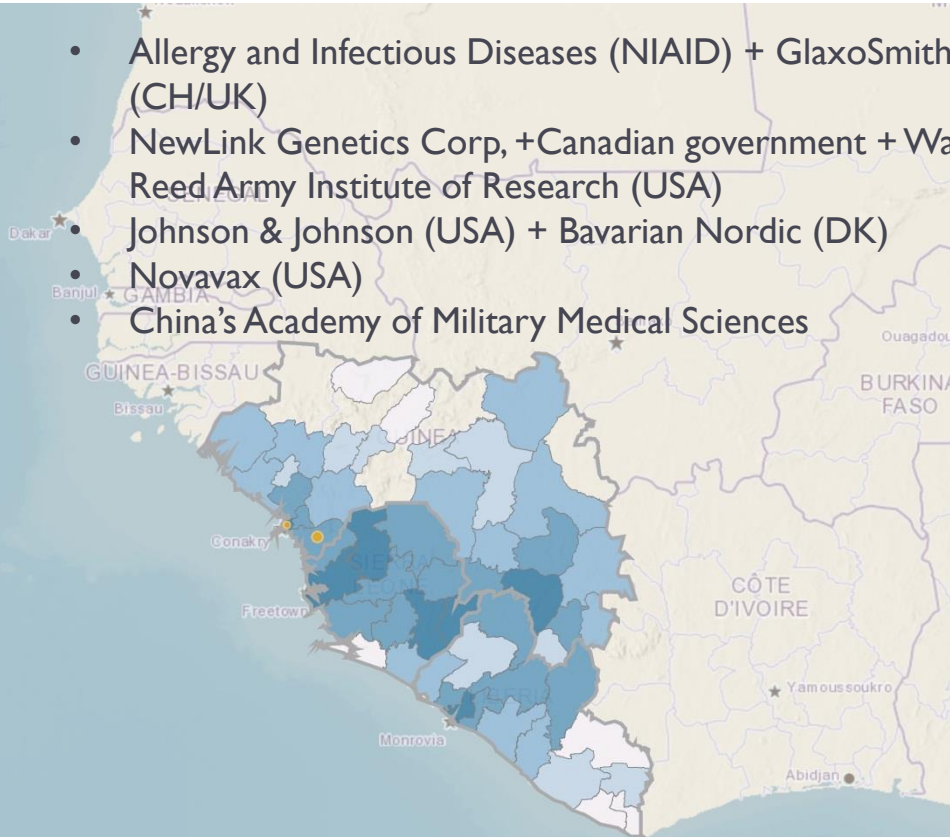


Ebola outbreak in West Africa; largest in history

Miért nem volt Ebola elleni oltás?

Most már van anyagi forrás és jelentős marketing érték:

- Allergy and Infectious Diseases (NIAID) + GlaxoSmithKline (CH/UK)
- NewLink Genetics Corp, +Canadian government + Walter Reed Army Institute of Research (USA)
- Johnson & Johnson (USA) + Bavarian Nordic (DK)
- Novavax (USA)
- China's Academy of Military Medical Sciences





Mikor oltanak?

▶ Állat:

- ▶ gazdasági okokból: hatékony állattartás: gazdasági és szabályozásbeli kérdés: pl. antibiotikum vs. oltás
- ▶ állatjóléti okokból: pl. számos társállat oltás
- ▶ és zoonotikus betegségek (pl. Salmonella enteritidis csirkénél, Coxiella burnettii, Chlamydia, Brucella kérődzőknél, veszettség)

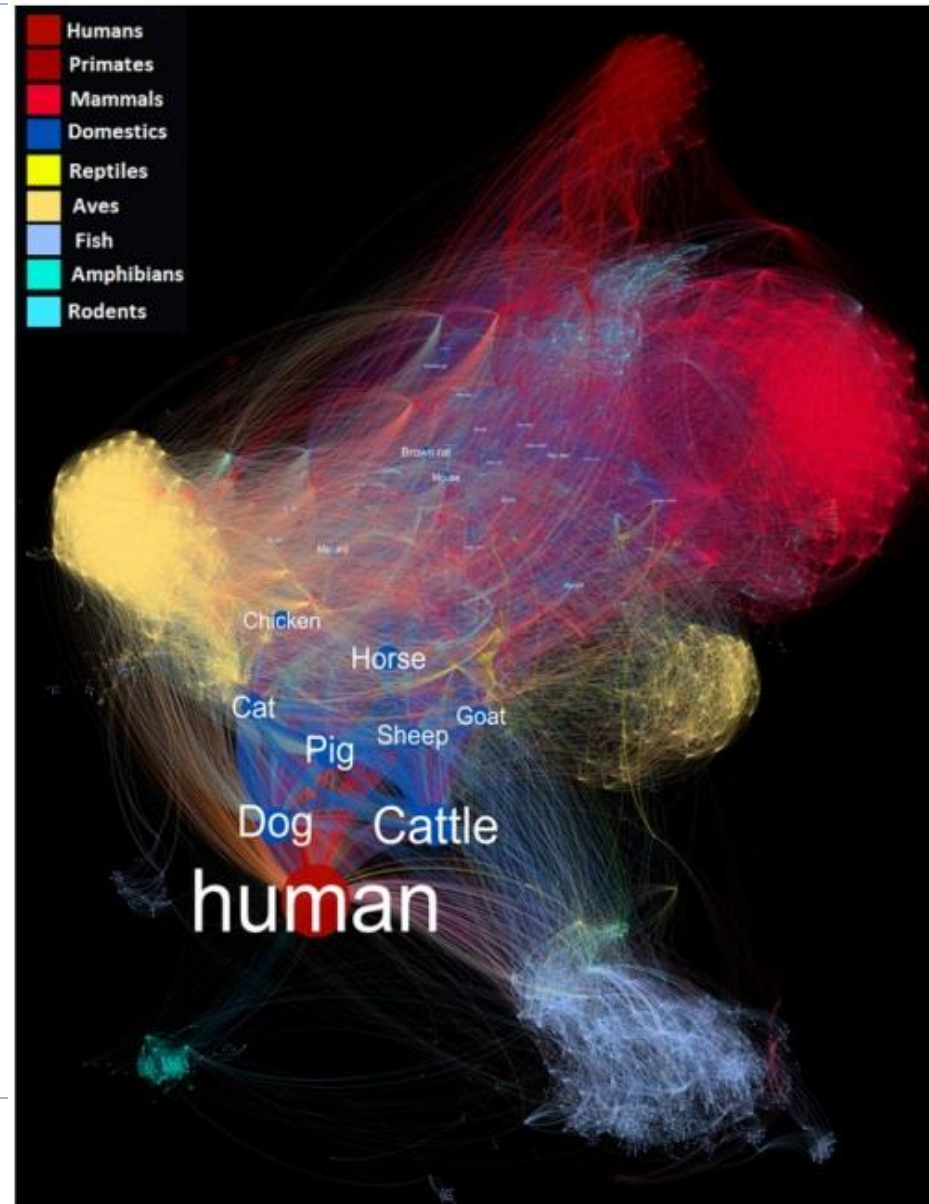
“Together, we are building a new reference to create value beyond animal health”

1. hatékony élelmiszertermelés biztosítása (pl. progeszteron, prostaglandin(analóg), gonadotropin stb.)
 2. idősödő fejlett társadalmak: társállatokkal történő együttélés segítése (feromonok: pl Feliway, anti parazita: pl.Vectra 3D)
 3. zoonotikus betegségek terjedésének megakadályozása
-



Fertőzések eloszlása és transzfere

- ▶ a nyílt hozzáférhető adatbázisok rendszerezése alapján készült felmérés
- ▶ minden pont egy gerinces faj
- ▶ a pont mérete ill. a felirat nagysága a leírt patogének számával arányos
- ▶ az összekötő vonalak vastagsága a közös patogének számával arányos



Tough lessons from Dutch Q fever outbreak

Mass cull of goats questioned as researchers race to find strain behind human cases.

Naomi Lubick

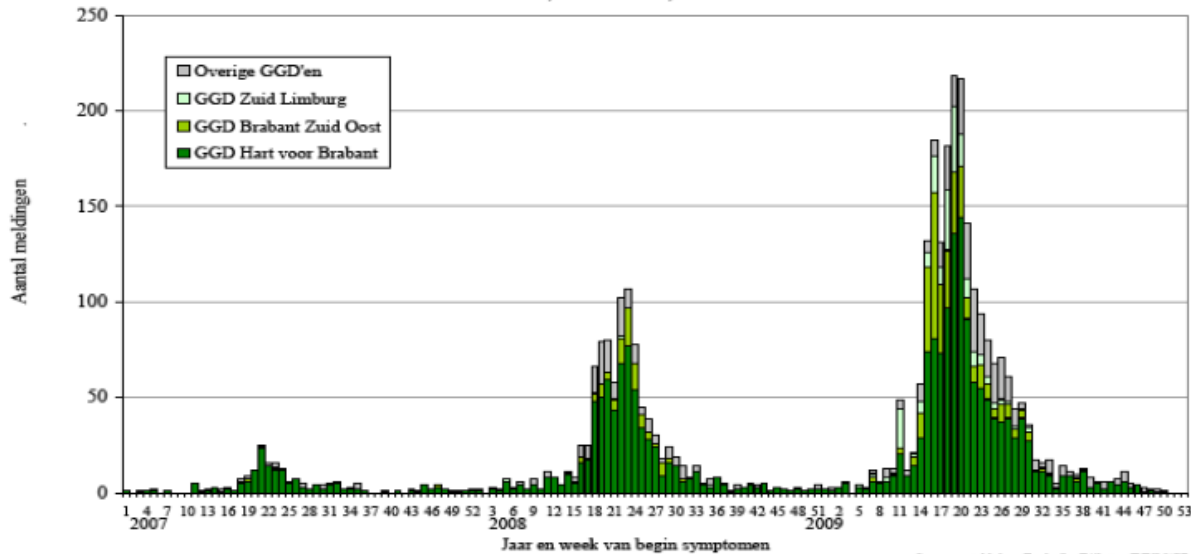
The chief veterinary officer of the Netherlands has defended the country's decision to cull thousands of goats in an effort to control an unprecedented outbreak of Q fever.



Q-fever

Példa zoonozisra

Aantal gemelde Q-koorts-patienten met bekende 1e ziektedag naar week van begin symptomen, periode 01-01-2007 t/m 23-12-2009.
2007: N=193, 2008: N=973, 2009: N=2180



Q-fever

Tough lessons from Dutch Q fever outbreak

Példa zoonozisra

Mass cull of goats questioned as researchers race to find strain behind human cases.

Naomi Lubick

The chief veterinary officer of the Netherlands has defended the country's decision to cull thousands of goats in an effort to control an unprecedented outbreak of Q fever.



Abstract

Recently, the number of human Q fever cases in the Netherlands increased dramatically. In response to this increase, dairy goats and dairy sheep were vaccinated against *Coxiella burnetii*. All pregnant dairy goats and dairy sheep in herds positive for Q fever were culled. We identified the effect of vaccination on bacterial shedding by small ruminants. On the day of culling, samples of uterine fluid, vaginal mucus, and milk were obtained from 957 pregnant animals in 13 herds. **Prevalence and bacterial load were reduced in vaccinated animals compared with unvaccinated animals. These effects were most pronounced in animals during their first pregnancy. Results indicate that vaccination may reduce bacterial load in the environment and human exposure to *C. burnetii*.**



Szabályozó hatóság

- ▶ Az engedélyezésre és gyártásra különböző nemzeti hatáskörben működő szervek léteznek

Termék engedélyező hatóság	Termék /fejlesztés követelmények	Gyártási engedély/felügyelet
European Medicines Agency (EMA)	European Pharmacopoeia	Good Manufacturing Practice =GMP (EMA felügyelet)
Food and Drug Administration (FDA)/ US Department of Agriculture	CFR (Code for Federal Regulations) (21 CFR-biologics/9CFR-animal health)	FDA/USDA
Japán Gyógyszerhatóság	Japán Gyógyszerkönyv	Japán GMP
Stb.		



GMP + FDA követelmények összehangolása: International Committee of Harmonization = ICH
Az ICH javaslatokat (guideline) készíti, amik mindkét rendszernek megfelelnek.

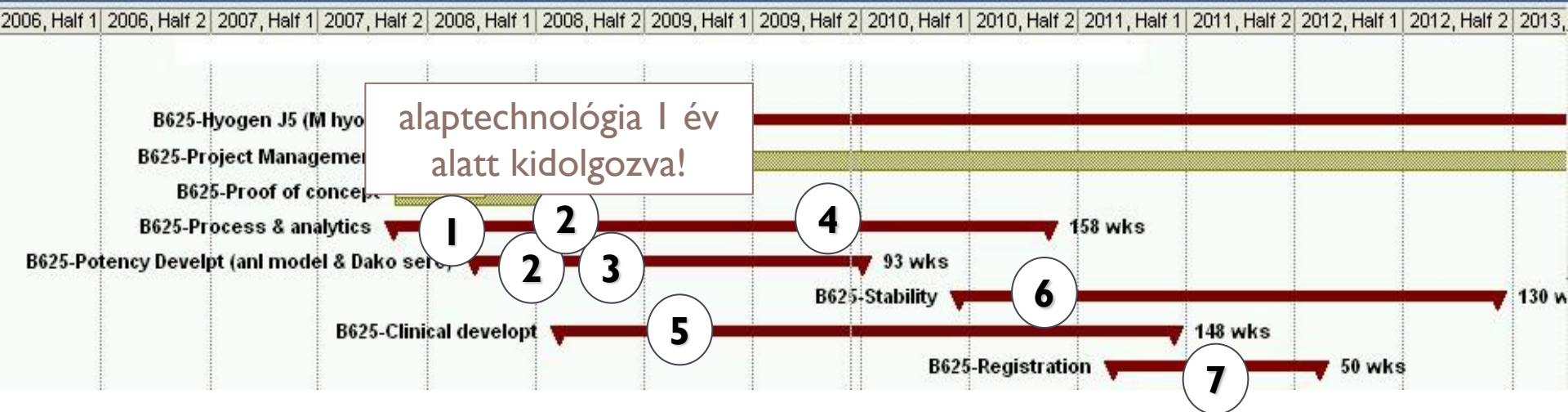
Oltóanyag

- ▶ **Biztonság (Safety):** nem okoz-e problémát
 - ▶ toxicitás, mellékhatások
 - ▶ nem megfelelő inaktiváltság /reverzió virulens törzssé
 - ▶ regisztrációs célú klinikai vizsgálat + rutin mérés sarzsonként
- ▶ **Hatékonyság (Efficacy):** mennyire véd adott betegség ellen:
 - ▶ állatoknál: oltás, ráfertőzés: pl. ha 70%-ban véd, akkor rendben (ország és patogénfüggő szabályozás)
- ▶ **Aktivitás = Hatóanyag felszabadítási teszt (Potency):** olyan, minden sarzson elvégzett mérés, mely megfelelésbe hozható a hatékonysággal
 - ▶ pl. laborállat oltás + ELISA, vagy in vitro módszerek
- ▶ **Stabilitás (Stability):** garantálja, hogy X idő elteltével is megfelelő a **Biztonságosság, Hatékonyság és Hatásosság**

Oltóanyag fejlesztés

- ▶ koncepció, szabadalom és piackutatás
- ▶ törzsek/toxinok kiválasztása, begyűjtése, ellenőrzése
- ▶ technológia fejlesztés, validálás kis léptékben
- ▶ analitika fejlesztés, validálás
- ▶ formulázás kidolgozása
- ▶ méretnövelés: pilot oltóanyagok elkészítése
- ▶ klinikai vizsgálatok
- ▶ stabilitás vizsgálat
- ▶ regisztráció
- ▶ piaci bevezetés, field kísérletek
- ▶ alkalmazás támogató vizsgálatok

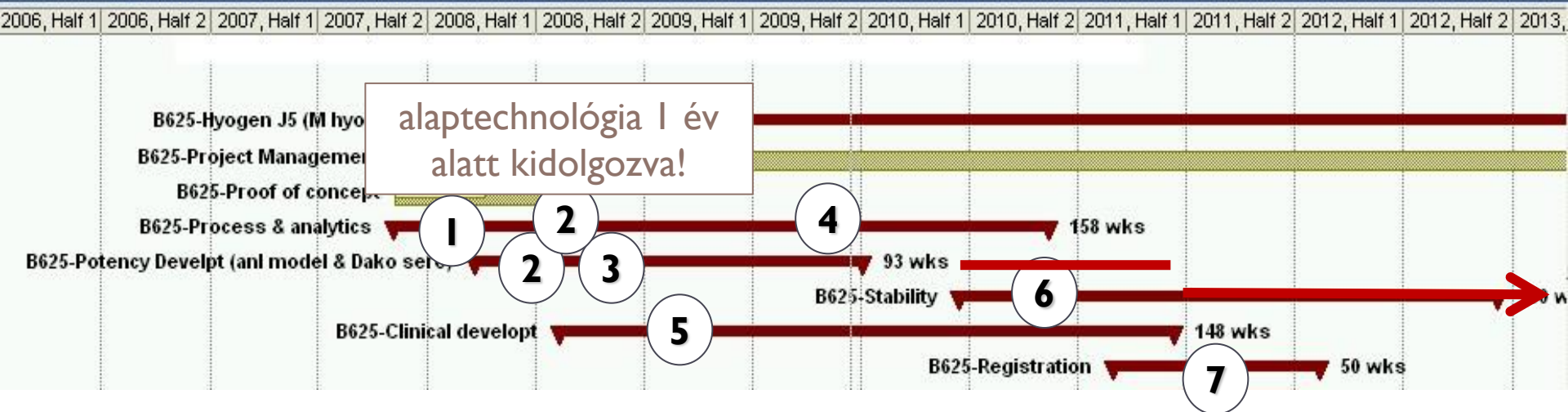
monovalens oltóanyag: min. 4 év a regisztrációig



1. technológia fejlesztés, validálás kis léptékben
2. analitika fejlesztés, validálás
3. formulázás kidolgozása
4. méretnövelés: pilot oltóanyagok elkészítése
5. klinikai vizsgálatok
6. stabilitás vizsgálat
7. regisztráció

időigényük
adott

monovalens oltóanyag: min. 4 év a regisztrációig



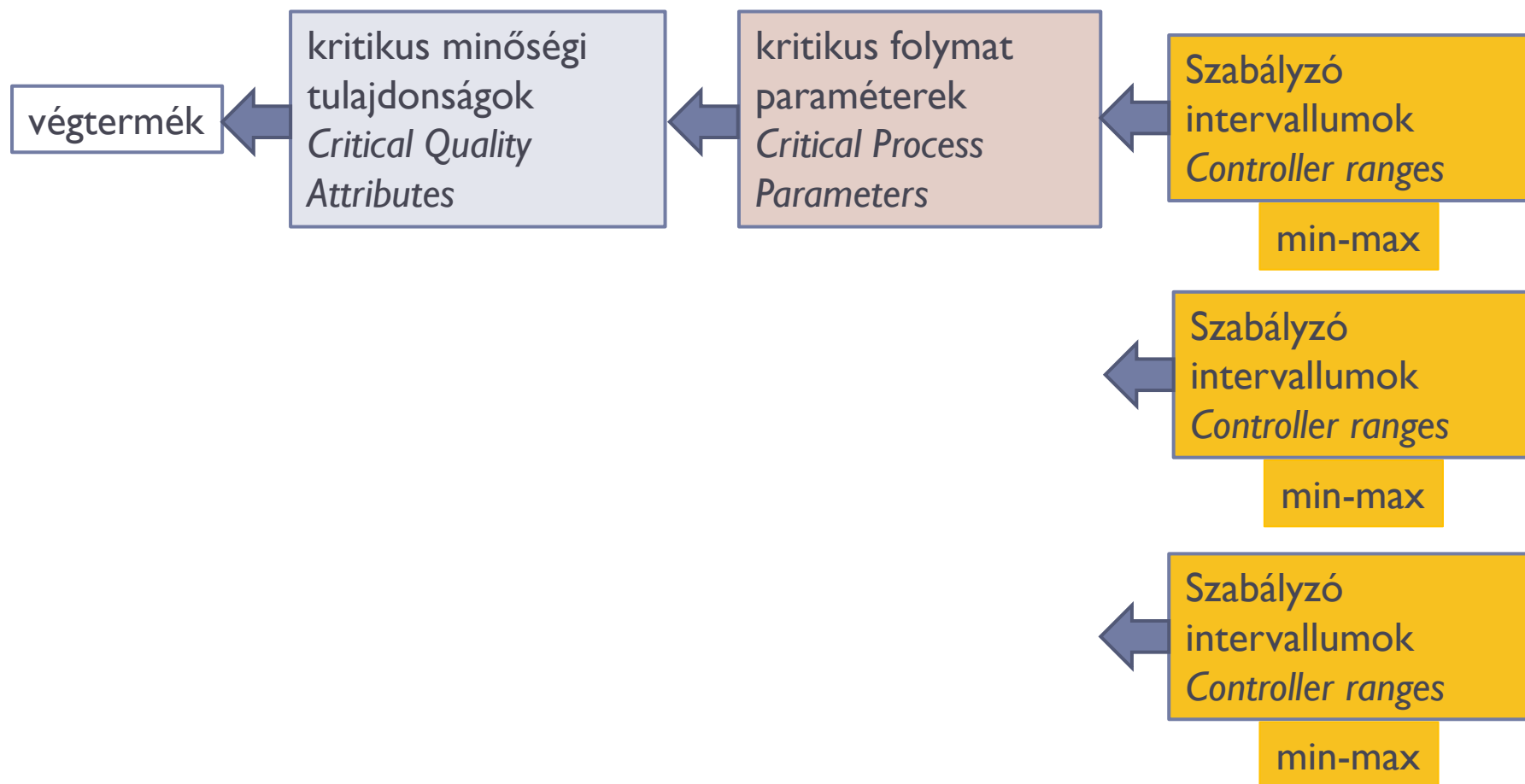
1. technológia fejlesztés, validálás kis léptékben
2. analitika fejlesztés, validálás
3. formulázás kidolgozása
4. méretnövelés: pilot oltóanyagok elkészítése
5. klinikai vizsgálatok
6. stabilitás vizsgálat
7. regisztráció

időigényük
adott



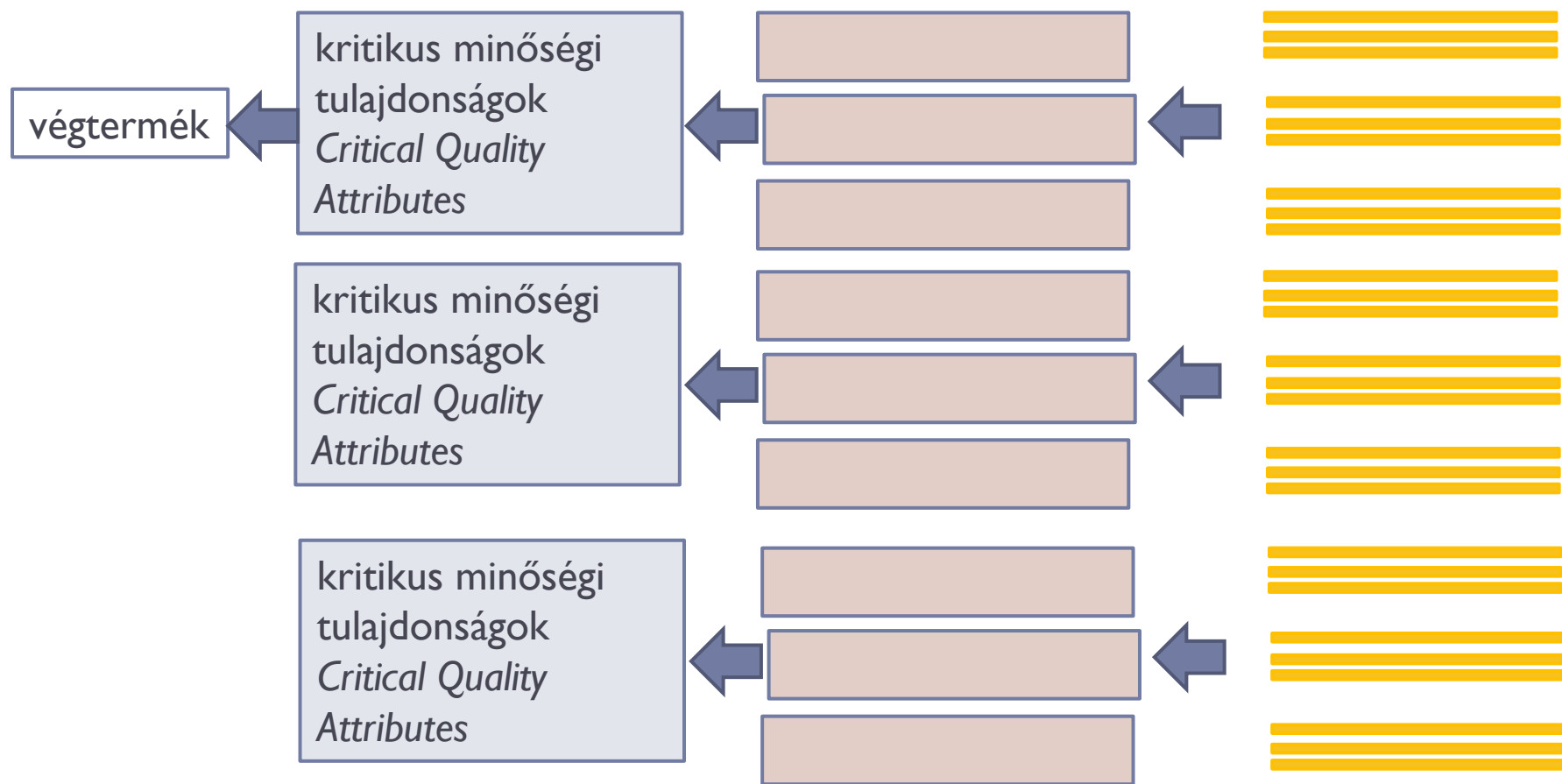
ICH guideline Q11 on development and manufacture of drug substances (chemical entities and biotechnological/biological entities)

- ▶ A végtermék minőségét a folyamat kontrollálásával kell garantálni.



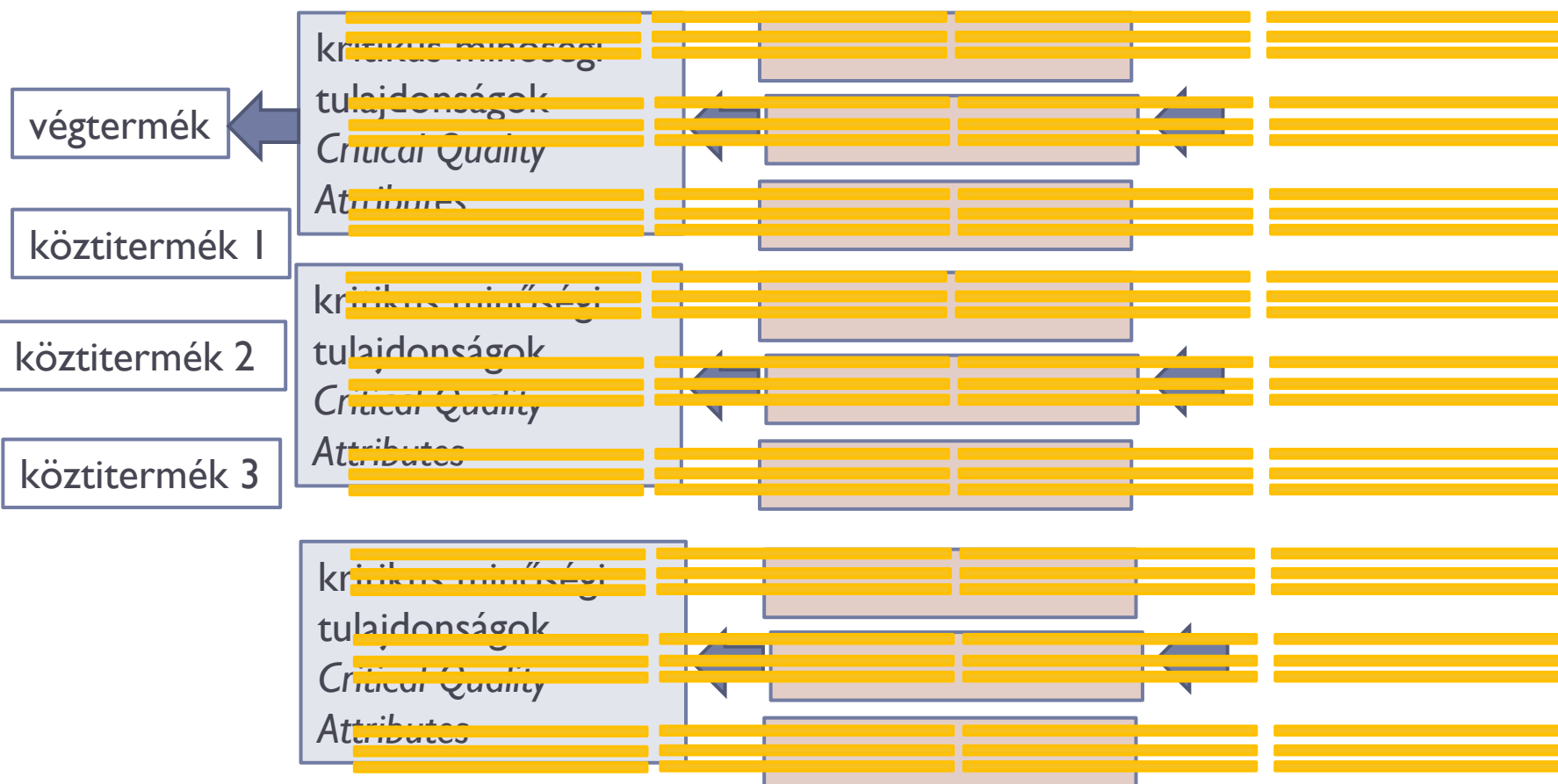
ICH guideline Q11 on development and manufacture of drug substances (chemical entities and biotechnological/biological entities)

- ▶ A végtermék minőségét a folyamat kontrollálásával kell garantálni.



ICH guideline Q11 on development and manufacture of drug substances (chemical entities and biotechnological/biological entities)

- ▶ A végtermék minőségét a folyamat kontrollálásával kell garantálni.



▶ Rengeteg információra van szükség

Omics vs. high throughput

- ▶ Omics: azonosítani a alapegységeket és a hozzájuk tartozó funkciókat
 - ▶ Genomics: megismerni a teljes genomot és ennek funkcióit
 - ▶ Proteomics: megismerni egy élő szervezetben fellelhető fehérjéket és azok funkcióit
 - ▶ Metabolomics: a sejtek metabolikus folyamatainak leírása

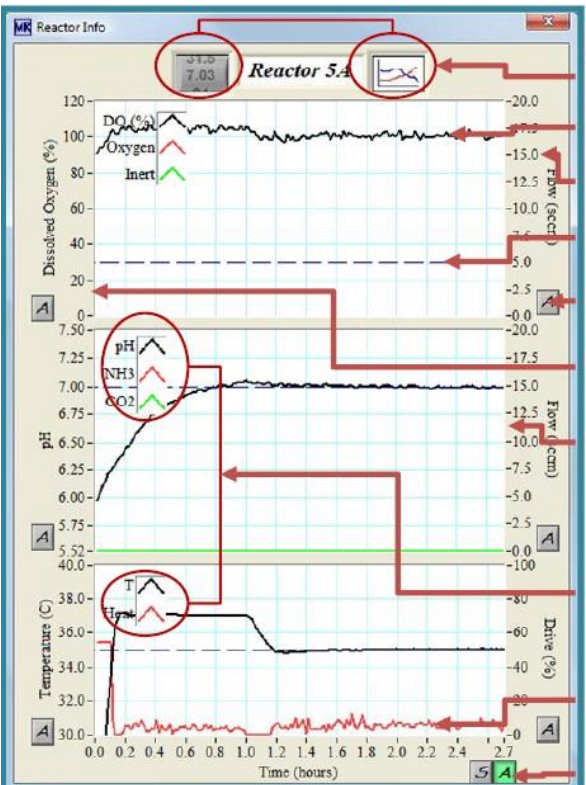
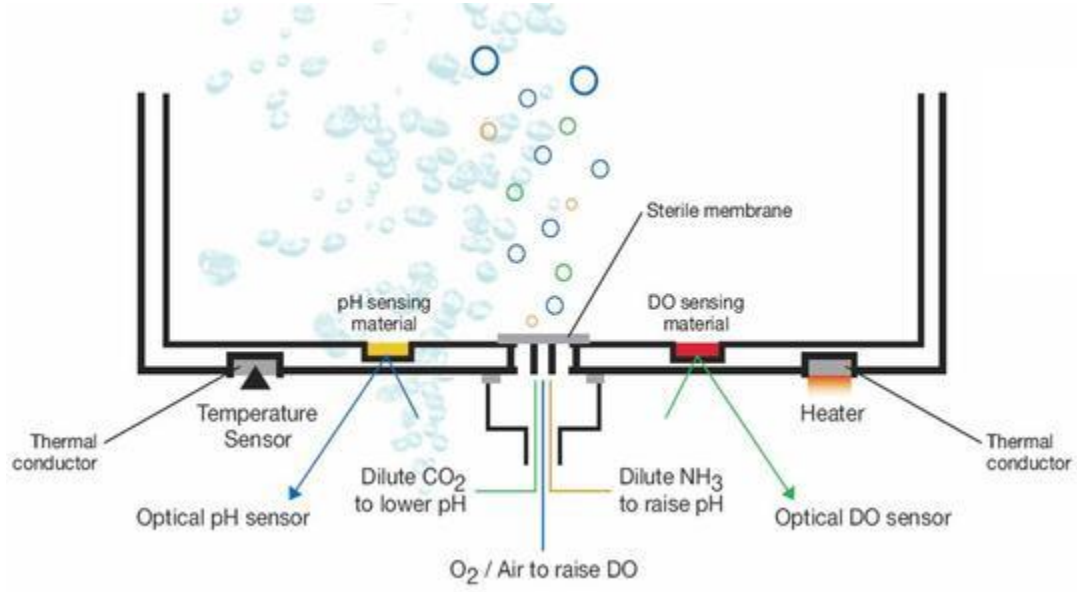
MEGÉRTENI

- ▶ HT: (statisztikai alapon) kiválasztani a legjobbat és azt használni:
 - ▶ Automatizált rendszerekben végzett nagyszámú vizsgálat

KIVÁLASZTANI

HT rendszerek - upstream

- ▶ Mikrobioreaktor
 - ▶ Klónszelekció
 - ▶ Tápoldat optimalizáció
 - ▶ Paraméter optimalizáció
 - ▶ Kisléptékű termelés



- Table or Graph View Selectors
- Process Value
- Output Scale
- Setpoint (Dashed line)
- Auto Scaling
- Process Value Axis
- Control Output Axis
- Process Value Legends
- Instrument Output
- TimeScaling



HT - microbioreaktorok

rátáplálás és mintavételezés is automatizálva, jobb $K_L a$

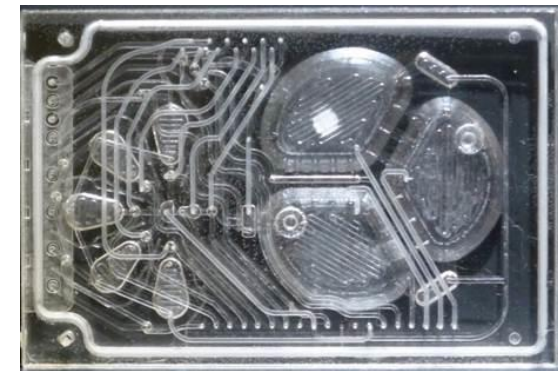
BioLector



ambr



Pharyx



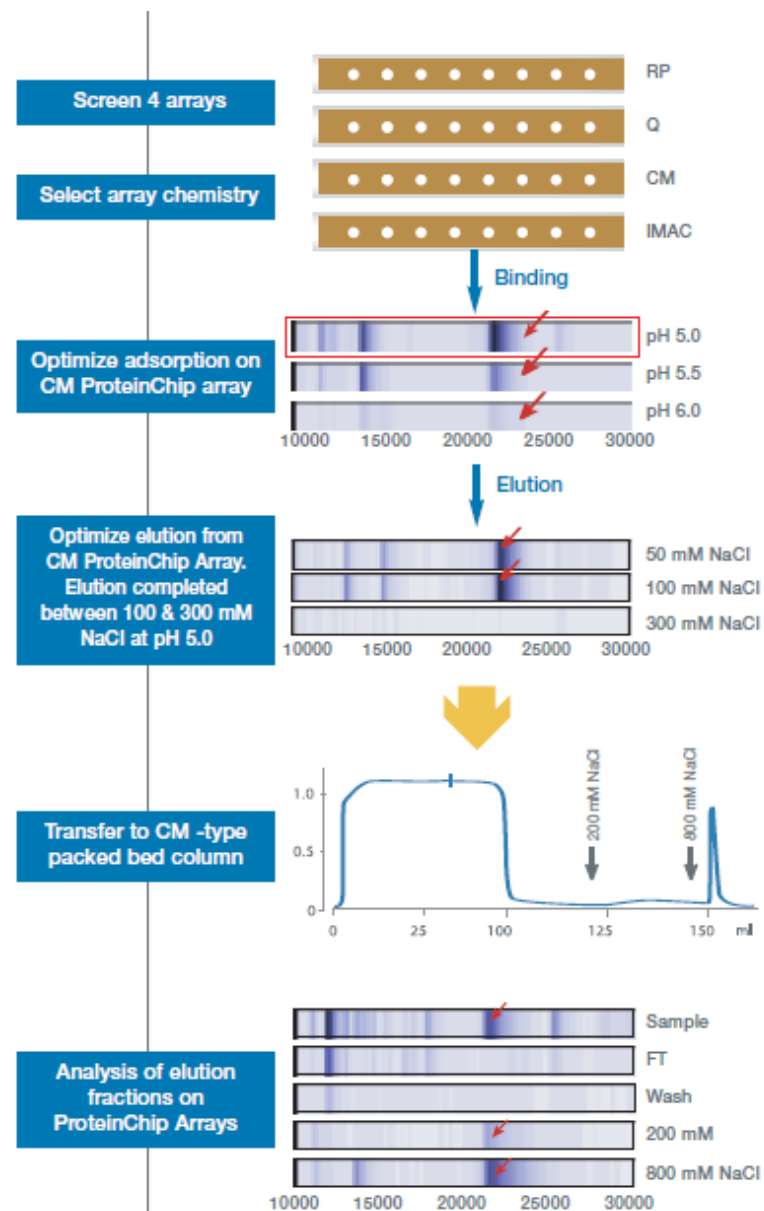
http://www.tapbiosystems.com/tap/cell_culture/IATour_bioreactor.htm

<http://www.m2p-labs.com/biolector-pro>

<http://pharyx.com/index.html>

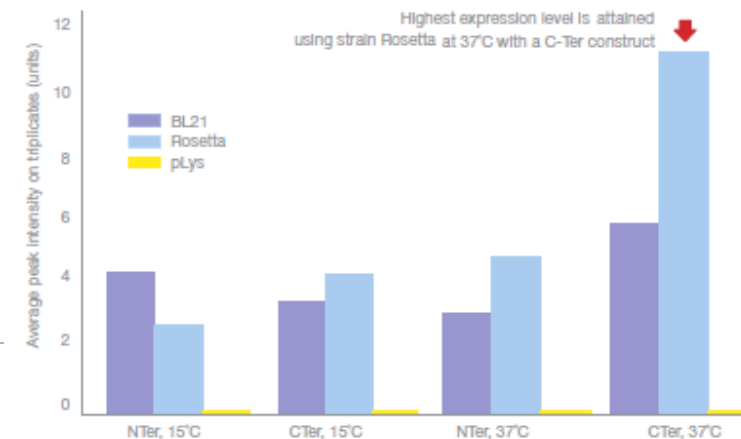
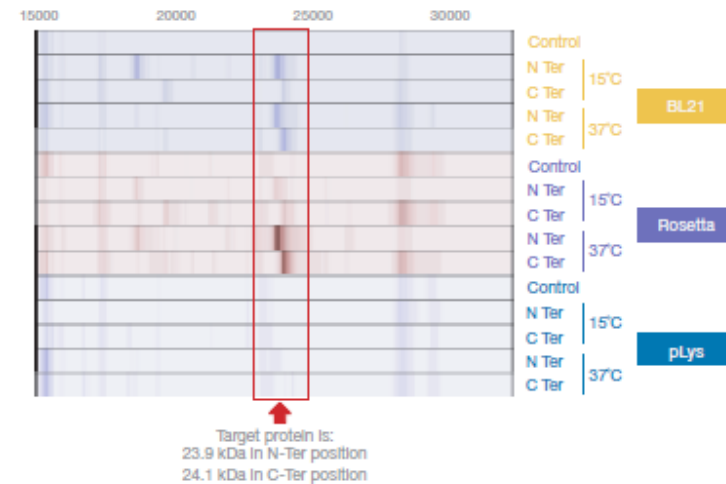
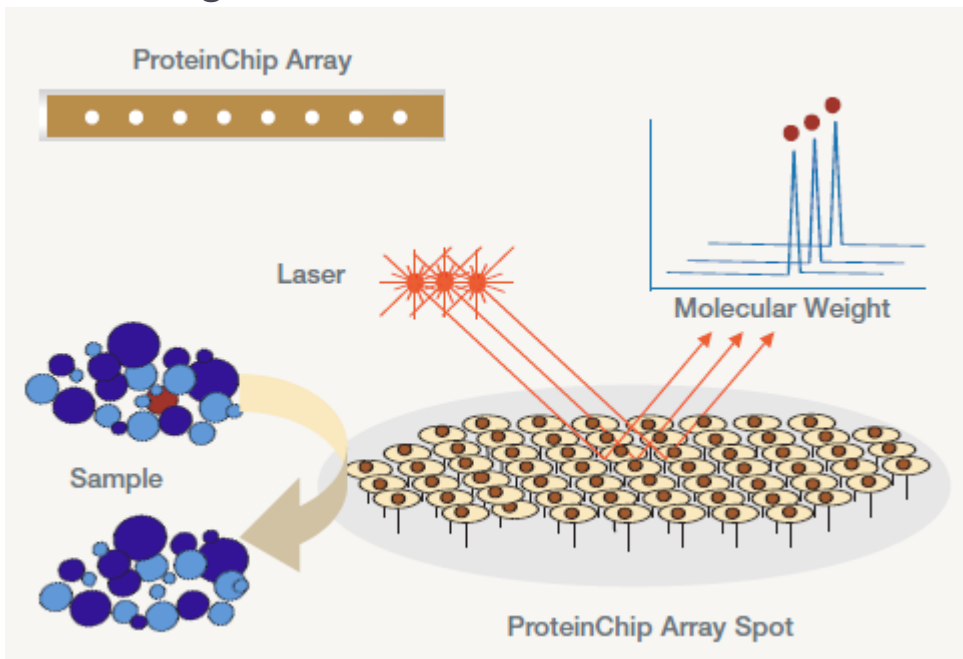
HT rendszerek - downstream

- ▶ HT kromatográfiás optimalizáló rendszerek



HT rendszerek – upstream+downstream

- ▶ Fehérje expressziós vizsgálat: mikrobiorektorok + robot +...
 - ▶ CE
 - ▶ Protein-chip: His-taggel kifejezve, + IMAC + lézeres molekulatömeg meghatározás:



PI.VTU heti 24 000 klónt képes tesztelni mikrobioreaktor + CE rendszerrel

Genomics

- ▶ Human genome project: 3,4 milliárd bp
 - ▶ Cél: megismerni az emberi genomot (haploid referencia genom)
 - ▶ Elindulás: 1990, 15 évre és 3 milliárd dollárra becsülve
 - ▶ Első teljes genom javaslat: 2000, végső (?) verzió 2003 (kb. 8% heterokromatin állomány nélkül)
 - ▶ Mindenki számára elérhető
 - ▶ Jelen cél: single-nukleotid polimorfizmus > az egyéni különbségek felmérése
 - ▶ Gén annotáció (genome annotation) > meghatározni a funkcionális szekvenciákat. Eredetileg „manuálisan” ment, ma már adatbázisokon alapuló statisztikai softwarekkel (HT!)
- ▶ HapMap project: a közös genom genetikai változatait próbája leírni
 - ▶ 2002-2009
 - ▶ 2 nem rokon DNS szekvenciája 99.5%-ban közös
 - ▶ 30 nigériai, 30 európai eredetű amerikai, 44 japán, 45 kínai



Genomics

▶ Illumina HiSeq 2500



HiSeq 2500

HiSeq 1500

	High Output	Rapid Run*	High Output	Rapid Run*
Futtatási mód	High Output	Rapid Run*	High Output	Rapid Run*
Szekvenált bp (2 × 100 bp)	600 Gb	120 Gb	300 Gb	60 Gb
Futtatási idő (2 × 100 bp)	~11 days	~27 hours	~8.5 days	~27 hours
Maximum Read Length**	2 × 100 bp	2 × 150 bp	2 × 100 bp	2 × 150 bp

**6 EMBERI GENOM 1 NAP
ALATT!!!**

Információ robbanás a biológiában

- ▶ Genome analízis:
 - ▶ Shotgun sequencing > a genom teljes szekvenciája
 - ▶ Genome annotation: a funkcionális elemek megtalálása és megértése
 - ▶ Kódoló régiók
 - ▶ Kontrol elemek
 - ▶ Szekvencia motívumok és megfelelések megtalálása
Identification of sequence motifs and sequence alignment
 - ▶ A proteome elkészítése (becslése)
 - ▶ A fehérje szerkezetek modellezése (becslése)
 - ▶ A molekuláris kölcsönhatások becslése
 - ▶ Mutáció analízis
 - ▶ Összehasonlító genomika
 - ▶ Evolúciós biológia: filogenetika

Eljött a matematikusok kora?

Modellezés

- ▶ **Metabolikus modellek**
 - ▶ A genome, proteome és matabolome diinamikus matematikai leírása
 - ▶ Nyitott adatbázisok és számítási programok
- ▶ Magas szintű matematizáltságot igényel:
 - ▶ Extreme pathways
 - ▶ Elementary mode analysis
 - ▶ Minimal metabolic behaviors
 - ▶ Flux balance analysis
- ▶ Felhasználás:
 - ▶ Jelátviteli rendszerek
 - ▶ Metabolikus zavar analízisek
 - ▶ Expresszió optimalizálás stb.

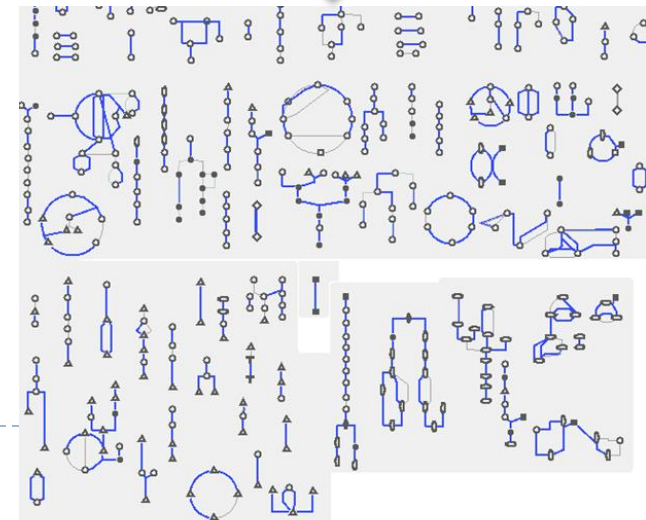
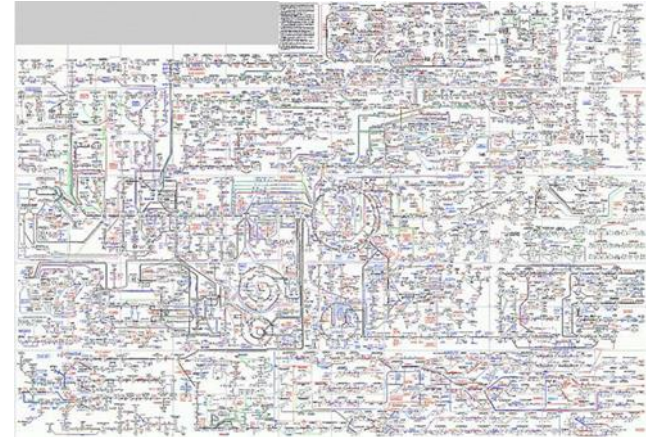
Modellezés



és ma
szám
záltsá
analysis
behavi



**Ön hogyan méri a
fajlagos növekedési
sebességet?**

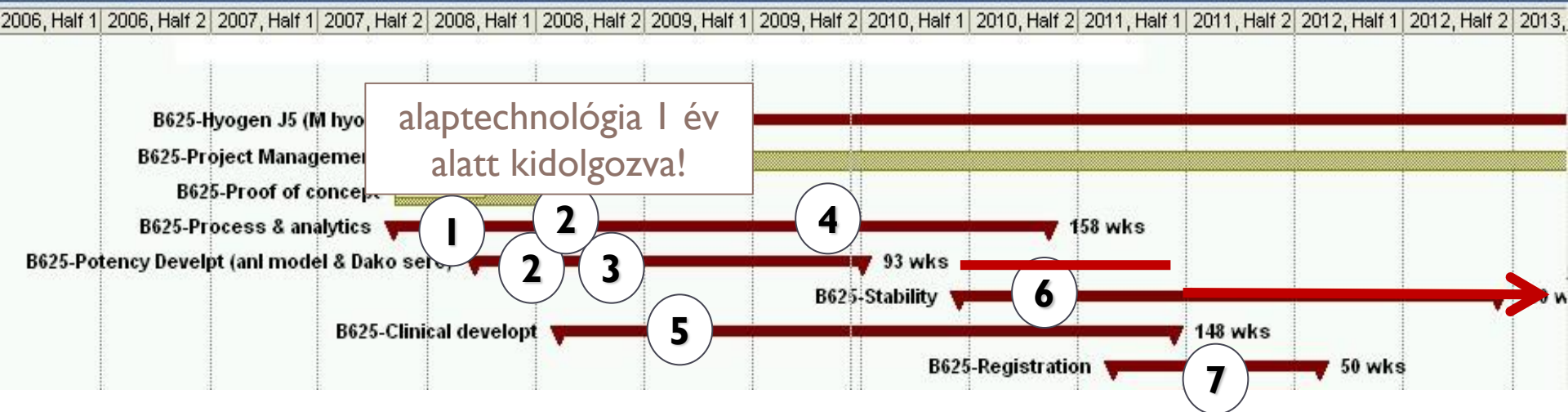


▶ Flux balance analysis



sek
stb.

monovalens oltóanyag: min. 4 év a regisztrációig



1. technológia fejlesztés, validálás kis léptékben
2. analitika fejlesztés, validálás
3. formulázás kidolgozása
4. méretnövelés: pilot oltóanyagok elkészítése
5. klinikai vizsgálatok
6. stabilitás vizsgálat
7. regisztráció

időigényük
adott



Bioinformációs szakadék

Bioanalitikai módszerek:
Részletes ok-okozati összefüggések

High Throughput Methods (nagy
hatékonyságú módszerek):
Statisztikai összefüggések

Információ

**Tényleg hatalmas
probléma?**

Termék/Folyamat Fejlesztés

Biológiai termelés

Folyamat közbeni ellenőrzés



Példa - *Mannheimia haemolytica*

▶Mannheimiózis

- ▶A *Mannheimia haemolytica* által okozott tüdőgyulladás a kérődzők elhullásának egyik gazdaságilag is igen jelentős oka.
- ▶Az elhullások 30%-ához járul hozzá
- ▶Gazdasági kár becsült értéke 1 Mrd USD csak Észak-Amerikában.

▶Hatásmechanizmus

- ▶A *Mannheimia* által szekretált leukotoxin a leukociták $\beta 2$ integrin receptorához kötve pórusokat hoz létre a membránon, ezáltal elpusztítva azokat és segítve a baktériumok megtelepedését.

▶Klasszikus statisztikai alapú optimalizálás

Példa - *Mannheimia haemolytica*

előkísérletek

2^{7-4} kísérleti terv I

léptéknövelés

2^{7-4} kísérleti terv 2

Méretnövelés 2^{7-4} alapján

Faktoriális terv I

Méretnövelés faktoriális terv I alapján

Faktoriális terv 2

Pepton koncentráció meghatározása

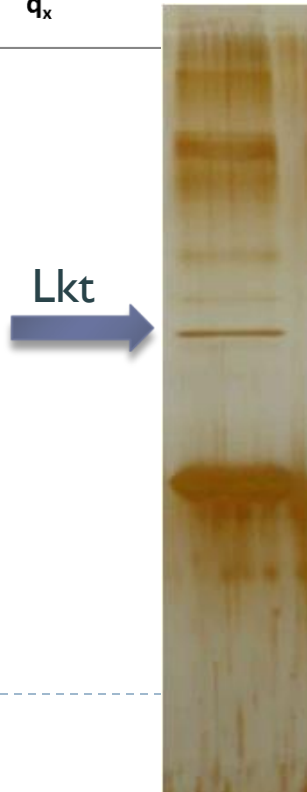
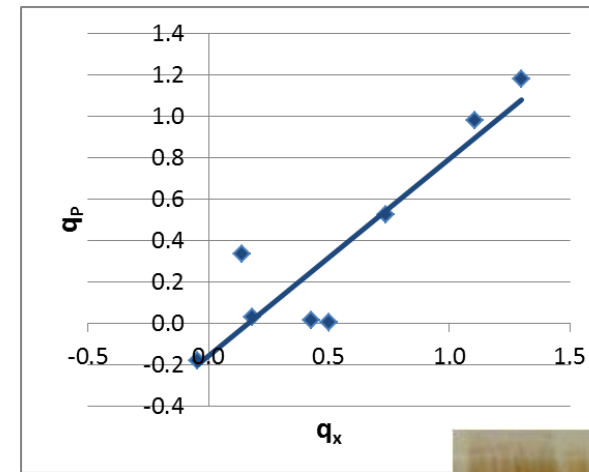
Méretnövelés faktoriális terv 2 alapján

A kritikus faktorok kiválasztása

Mikrobioreaktoros
optimalizálás

Példa - *Mannheimia haemolytica*

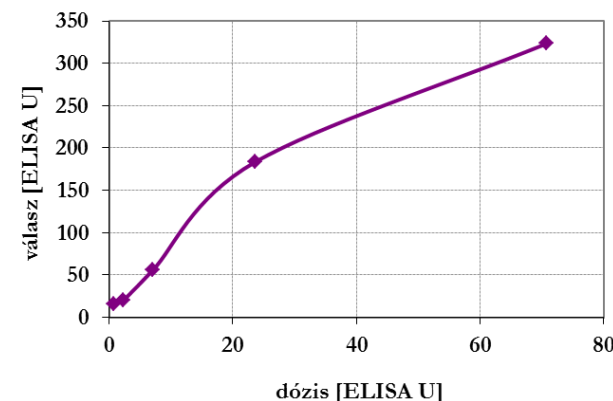
- ▶ A Lkt képződés alapvetően **növekedéshez kapcsolt**
- ▶ **T és pH** hatása q_p -re: 37°C és pH 7,3
- ▶ Redukáló cukor általi **limitáció** vagy inhibíció batch és fed-batch fermentációkban. Koncentráció optimált.
- ▶ Fermentáció leállt adott OD-nál, de sem cukor sem tápoldat komponensek adása nem tudta növelni
- ▶ **Metabolitok inhibíciós hatása** vizsgált: korlátozott.
- ▶ **Inokulum növekedési fázisa** hatott a fajlagos termékképzési sebességre.
- ▶ Termelési passzázatok modellezése TSB-n és alternatív I tápoldaton.
- ▶ Alternatív tápoldatok tesztje: eredmények alapján Plackett-Burman (2^{7-4}) screening rázatott lombikban, de az eredmények nem igazolódtak fermentoros tesztekben.
- ▶ Maximum titer: 3,5 EU/mL (~ 50 fermentoros kísérlet eredménye)



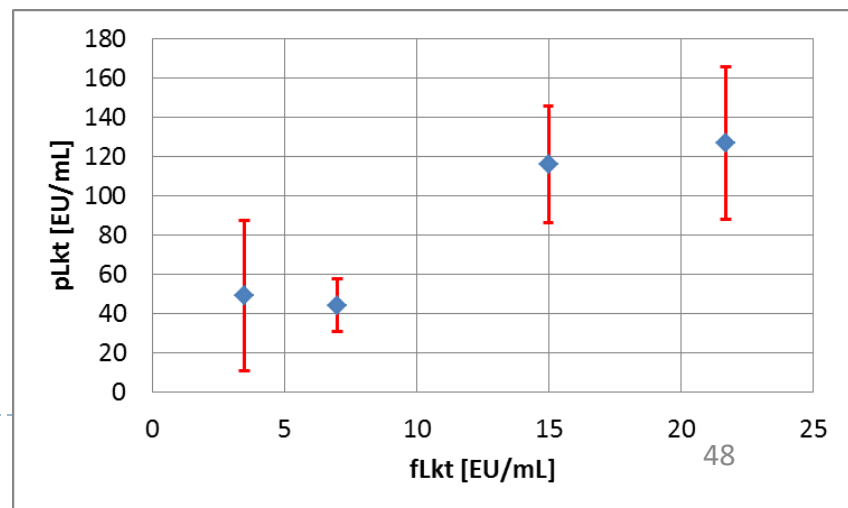
Példa - Mannheimia haemolytica

- ▶ Állat szerológia vizsgálatok labor és célállatban, monovalens és polivalens oltóanyagokkal megtörténtek, jó dózis-választ eredményezve.
- ▶ A challenge vizsgálatok 50 EU/ml kibocsátási potency értéket igazoltak vissza. Ez biztosan **15 EU/mL formulációval érhető el. 3,5 EU/ml titer nem volt tartható.**
- ▶ Tápoldat további optimalálása szükséges

Leukotoxin dózis-válasz nyúlban



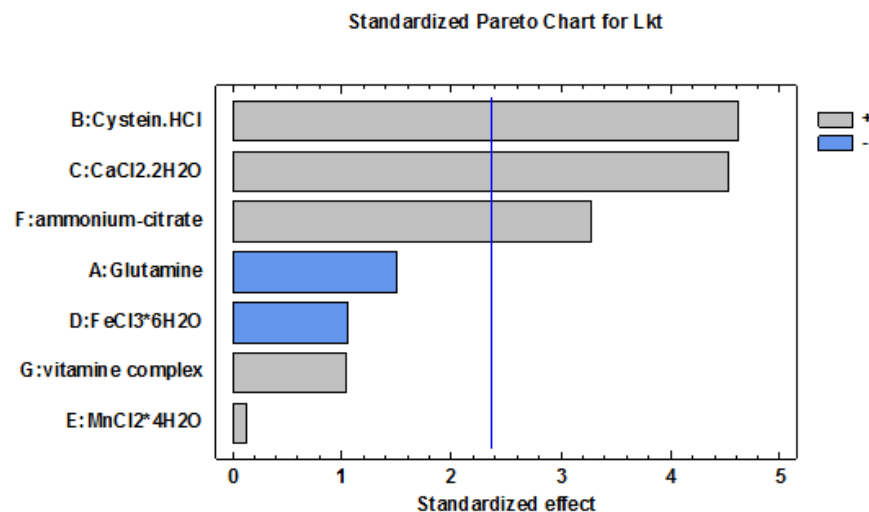
0508T/K vakcina	8 hetes bárányok	
	Kontroll	Oltott
Tüdő érintettség (felület)	18,6 %	0,6%
Tüdő károsodás súlyossága	125	23



Példa - *Mannheimia haemolytica*

- ▶ 2^{7-4} típusú kísérleti terv mikro 24-ben, duplikálva, 7 ml-ben

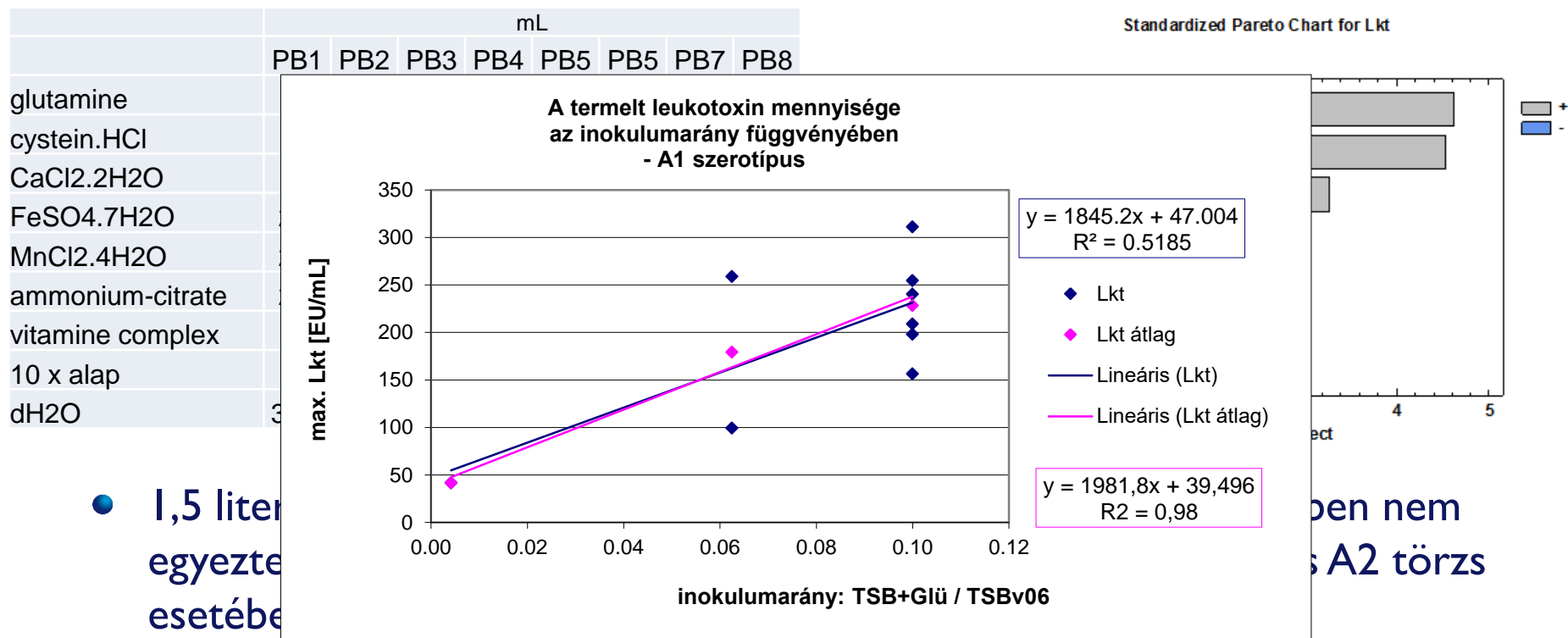
	mL							
	PB1	PB2	PB3	PB4	PB5	PB5	PB7	PB8
glutamine	0	5	0	5	0	5	0	5
cystein.HCl	0	0	5	5	0	0	5	5
CaCl ₂ .2H ₂ O	0	0	0	0	5	5	5	5
FeSO ₄ .7H ₂ O	2.5	0	0	2.5	2.5	2.5	0	2.5
MnCl ₂ .4H ₂ O	2.5	0	2.5	0	0	2.5	0	2.5
ammonium-citrate	2.5	2.5	0	0	0	0	2.5	2.5
vitamine complex	0	0.5	0.5	0	0.5	0	0	0.5
10 x alap	5	5	5	5	5	5	5	5
dH ₂ O	37.5	37	37	32.5	37	30	32.5	22



- 1,5 literes fermentorra méretnövelve az értékek abszolút értékben nem egyeztek, de **259 EU/ml max titert** sikerült elérni, és mind A1 és A2 törzs esetében 200 EU/ml fölött tartani.

Példa - Mannheimia haemolytica

- ▶ 2^{7-4} típusú kísérleti terv mikro 24-ben, duplikálva, 7 ml-ben



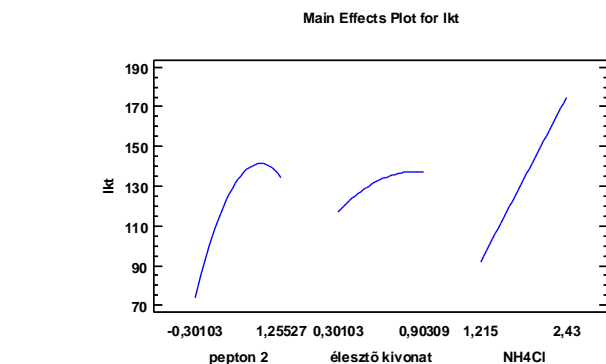
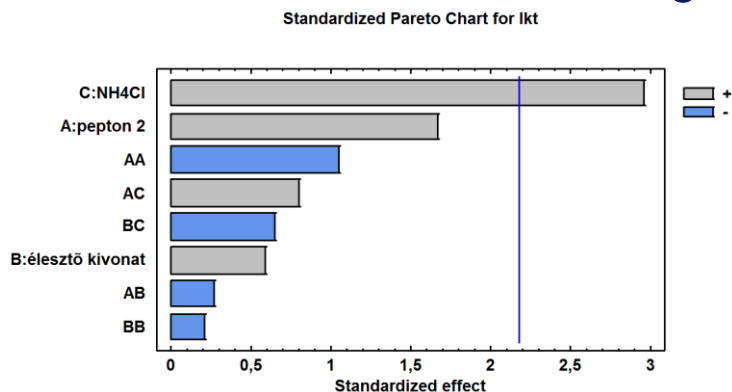
- 1,5 liter egyeztetés esetében

- Probléma: 60 L-re növelve a titer jelentősen csökkent. (2,58; 7,83; 9,17 EU/mL) – összefügg-e az inokulum aránnyal?

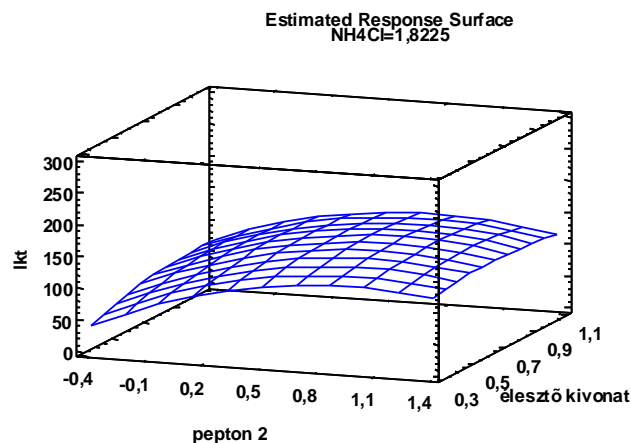
Példa - *Mannheimia haemolytica*

Faktoriális tervek

- A kevert típusú faktoriális tervvel kiválasztott három kritikus faktor optimális értékét többszintű faktoriális kísérleti terv alapján készült modellel határoztuk meg.



faktorok	1.	2.	3.	egyéb összetevők	mért értékek	
szintek	3 (log)	3 (log)	2		OD	Lkt (ELISA)
Tápanyag	Pepton 2	Élesztő kivonat	NH4Cl	CaCl2, MgCl2, NaCl, glükóz, cisztein-HCl	5,5	27,5



1	alacsony	alacsony	alacsony	konstans	5,5	27,5
2	alacsony	alacsony	magas	konstans	25	45,8
3	alacsony	magas	alacsony	konstans	79,8	196,4
4	alacsony	magas	magas	konstans	91,2	56,9
5	közepes	alacsony	alacsony	konstans	58,5	122,6
6	közepes	alacsony	magas	konstans	43,9	296,8
7	közepes	magas	alacsony	konstans	184,5	64,1
8	közepes	magas	magas	konstans	135,5	148,1
9	magas	alacsony	alacsony	konstans	145,3	182,6
10	magas	alacsony	magas	konstans	21,6	190,8
11	magas	magas	alacsony	konstans	5,8	27,7
12	magas	magas	magas	konstans	9,3	57
13	nincs	alacsony	alacsony	konstans	15,3	143,2
14	nincs	alacsony	magas	konstans	8,6	58,3
15	nincs	magas	alacsony	konstans		
16	nincs	magas	magas	konstans		
médium 6	nincs	közepes	magas	konstans	8,6	58,3

Példa - *Mannheimia haemolytica*

előkísérletek	0,5>3,5 EU/mL	 <p>1000-szeres leukotoxin titer</p>
2 ⁷ -4 kísérleti terv I	259 EU/mL	
léptéknövelés	9,17 EU/mL	
2 ⁷ -4 kísérleti terv 2	91,2 EU/mL	
Méretnövelés 2 ⁷ -4 alapján	232 EU/mL	
Faktoriális terv I	296,8 EU/mL	
Méretnövelés faktoriális terv I alapján	225/307 EU/mL	
Faktoriális terv 2	385,5 EU/mL	
Pepton koncentráció meghatározása	519,6 EU/mL	
Méretnövelés faktoriális terv 2 alapján	410/512 EU/mL	

A Doehlert mátrix

Figure 1: Three-level full factorial design for two factors (N = 9).

Experiment	Factors	
	A	B
1	-1	-1
2	-1	1
3	-1	0
4	1	-1
5	1	1
6	1	0
7	0	-1
8	0	1
9 etc.	0	0

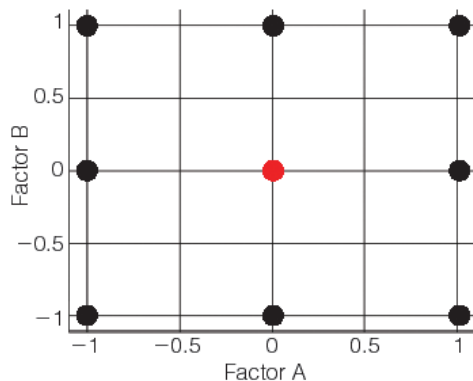


Figure 3: Central composite design for two factors (N = 9).

Experiment	Factors	
	A	B
1	-1	-1
2	-1	1
3	1	-1
4	1	1
5	$-\alpha = -1.41$	0
6	$+\alpha = 1.41$	0
7	0	$-\alpha = -1.41$
8	0	$+\alpha = 1.41$
9 etc.	0	0

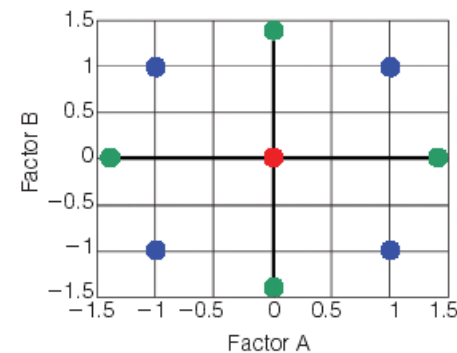
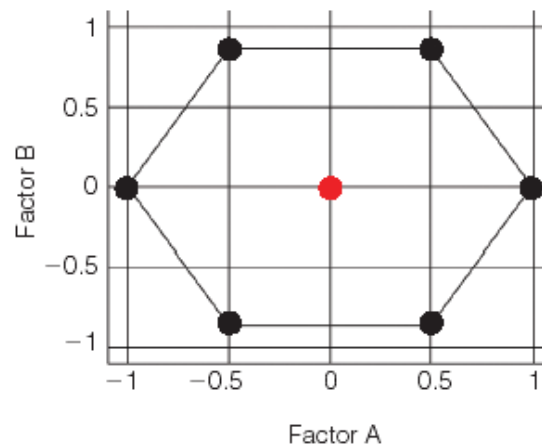


Figure 5: Doehlert design for two factors (N = 7).

Experiment	Factors	
	A	B
1	1	0
2	-1	0
3	0.5	0.866
4	-0.5	0.866
5	0.5	-0.866
6	-0.5	-0.866
7 etc.	0	0



A Doehlert mátrix

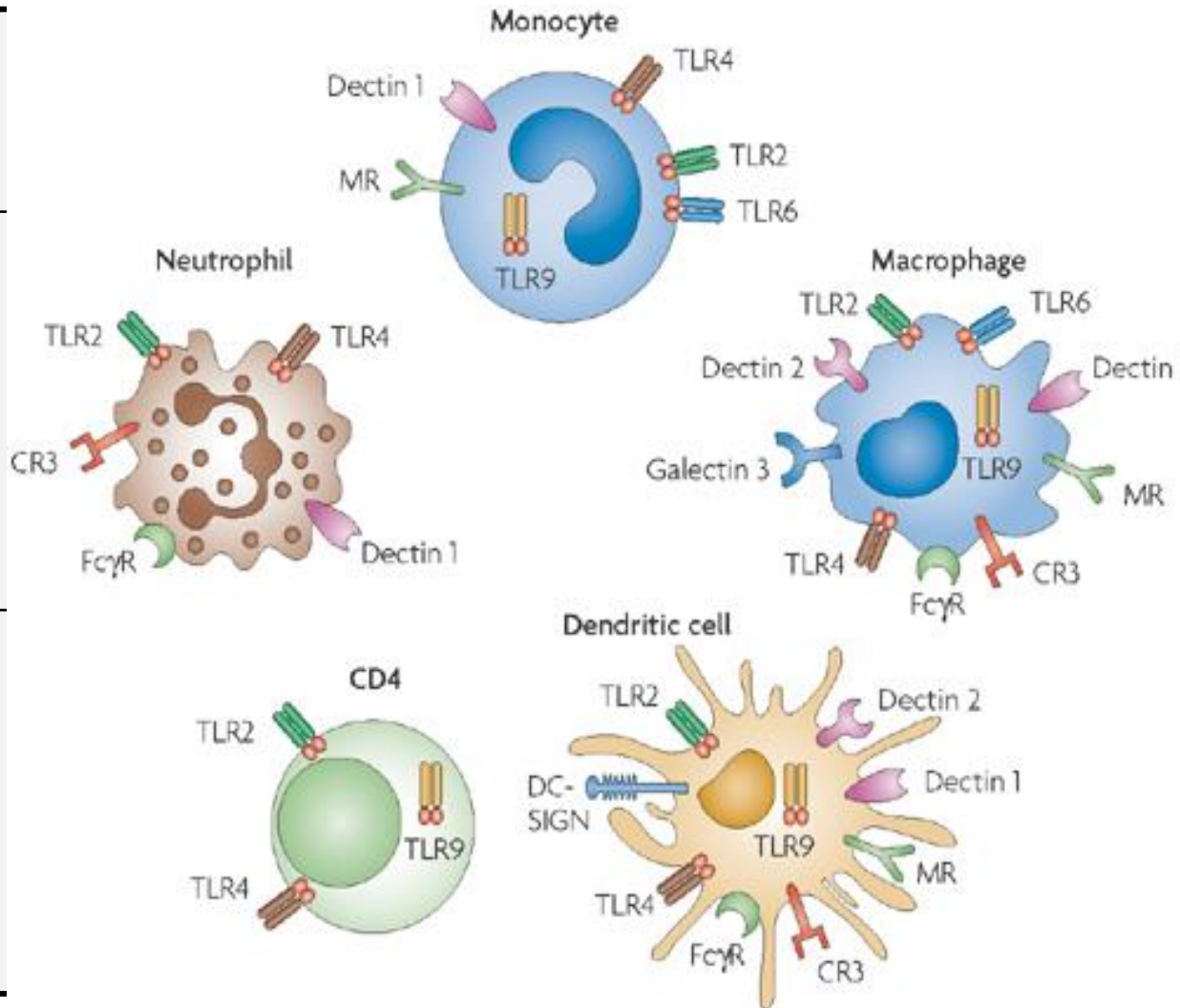
- ▶ Hatékonyabb. Csak software kell hozzá.

Comparison of efficiency of central composite design (CCD), Box–Behnken design (BBD) and Doehlert design (DM)

Variables (K)	Number of coefficients (p)	Number of experiments (f)			Efficiency (p/f)		
		CCD	DM	BBD	CCD	DM	BBD
2	6	9	7	–	0.67	0.86	–
3	10	15	13	13	0.67	0.77	0.77
4	15	25	21	25	0.60	0.71	0.60
5	21	43	31	41	0.49	0.68	0.61
6	28	77	43	61	0.36	0.65	0.46
7	36	143	57	85	0.25	0.63	0.42
8	45	273	73	113	0.16	0.62	0.40

A veleszületett és az adaptív immun rendszer

Funkció
evolúciós háttér
Ag specifitás
előzetes
aktiválás
reakció
memória

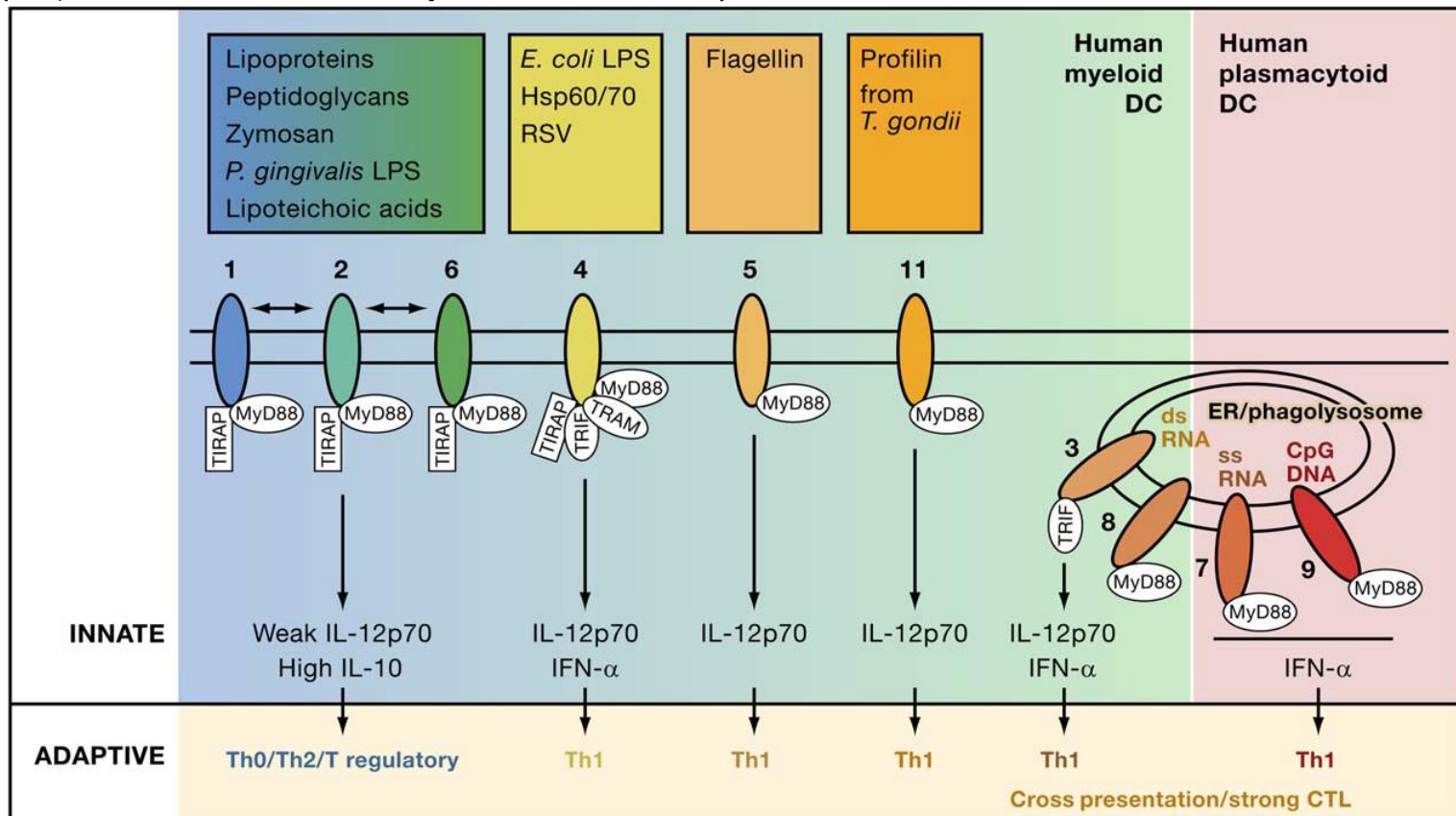


ajred zett)
rala
(fő funkció)
született
ett



A veleszületett és az adaptív immun rendszer

- ▶ Az egyes antigének hatása elvben jól ismert
- ▶ Az oltóanyagok elvben tervezhetőek, illetve az immunválasz modulálható (adjuvánsok, immunopotenciátorok)



baktérium

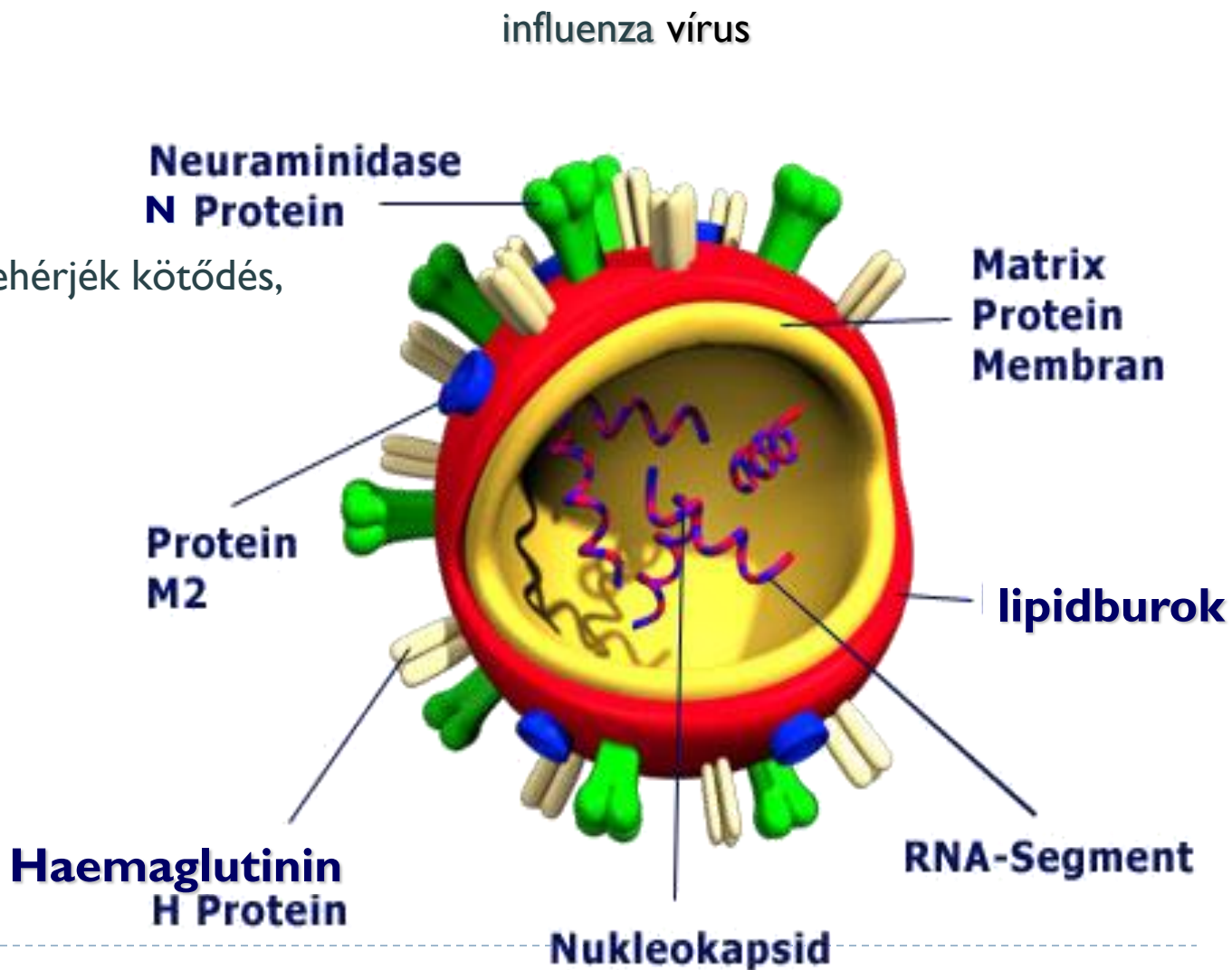
vírus

Kötelező védőoltások Magyarországon

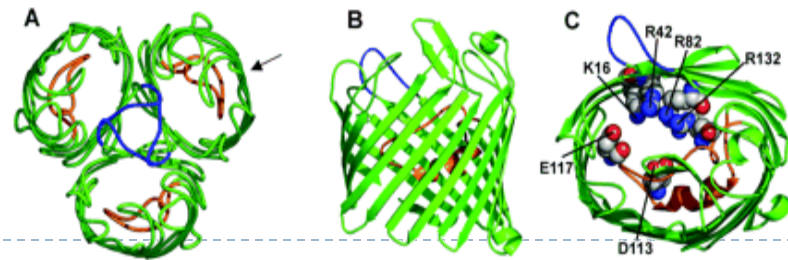
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	T - gümőkór (tuberculosis), BCG Bacillus Calmette-Guérin/tuberculosis elleni oltóanyag
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	D -torokgyík (diphtheria),
<i>Bordetella pertussis</i>	P - szamárköhögés (pertussis),
<i>Clostridium tetani</i>	T - merevgörcs (tetanus),
polio vírus (Enterovirus)	IPV (inaktivált polio vírus) - gyermekbénulás (poliomyelitis anterior acuta),
Morbilli vírus (Paramyxovirus)	M - kanyaró (morbilli),
Morbilli vírus (Paramyxovirus)	R - rózsahimlő (rubeola),
Mumpsz vírus	M - mumpsz (parotitis epidemica),
<i>Haemophilus influenzae</i>	Hib - b típusú Haemophilus influenzae
haepatitis B vírus (<i>Orthohepadnavirus</i>)	hepatitis B
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Középfül-, arcüreg, agyhártya- és tüdőgyulladás
Human papilloma virus 6, 11, 16, 18	Nemi szerv daganatok, szemölcsök

Vírus antigének

- ▶ Külső funkcionális fehérjék (kötődés, pórusképzés)
- ▶ Szerkezeti fehérjék
- ▶ Örökítő anyag

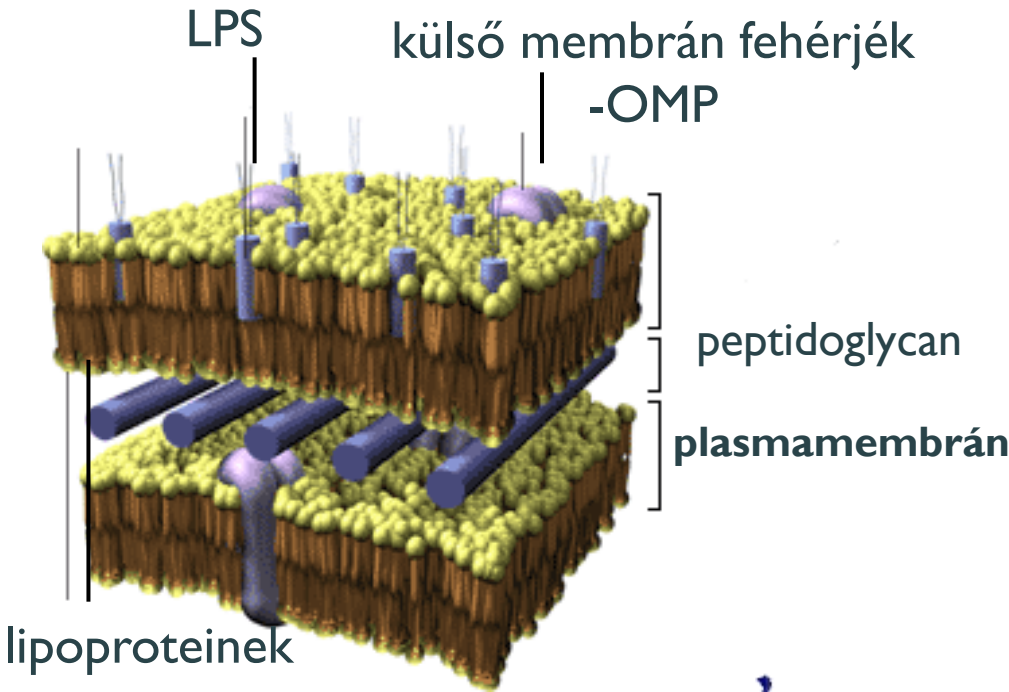
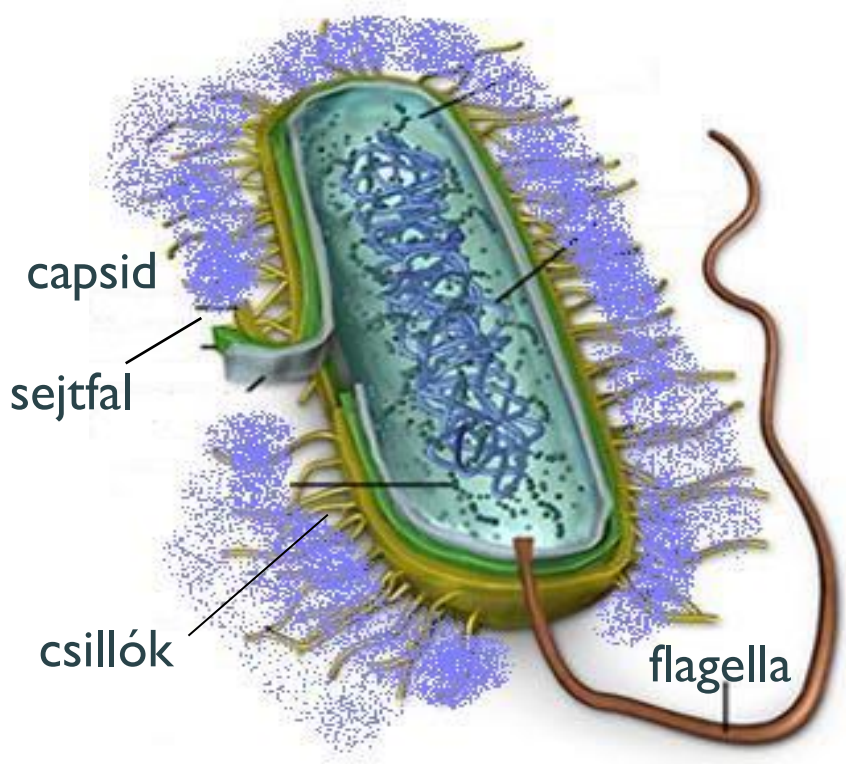


Bakteriális antigének

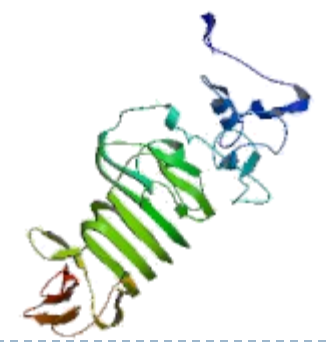


lipopoliszacharidok

extracelluláris polimer - EPS



extracelluláris toxinok



Oltóanyagok

- ▶ Klasszikus holt anyag
 - ▶ Elölt sejt/vírus
 - ▶ Inaktivált toxin
 - ▶ Transzgenikusan előállított anyag (subunit/konjugált oltóanyagok)
 - ▶ Szintetikusan előállított anyag (cukorszármazék vagy peptid)
- ▶ Élő (attenuált):
 - ▶ sokszor passzált vírusok/baktériumok
 - ▶ genetikailag deletált virulencia faktorok
- ▶ Immunkomplex:
 - ▶ CEVA-Phylaxia Transmune: Ab védi a maternális ellenanyagtól és akadályozza a gyors kolonizációt
- ▶ Élő vektoros: élő hordozó szaporodik a szervezetben és antigént termel
 - ▶ vírus vektor
 - ▶ bakteriális/protozoális vektor (Salmonella, Bordetella etc.)

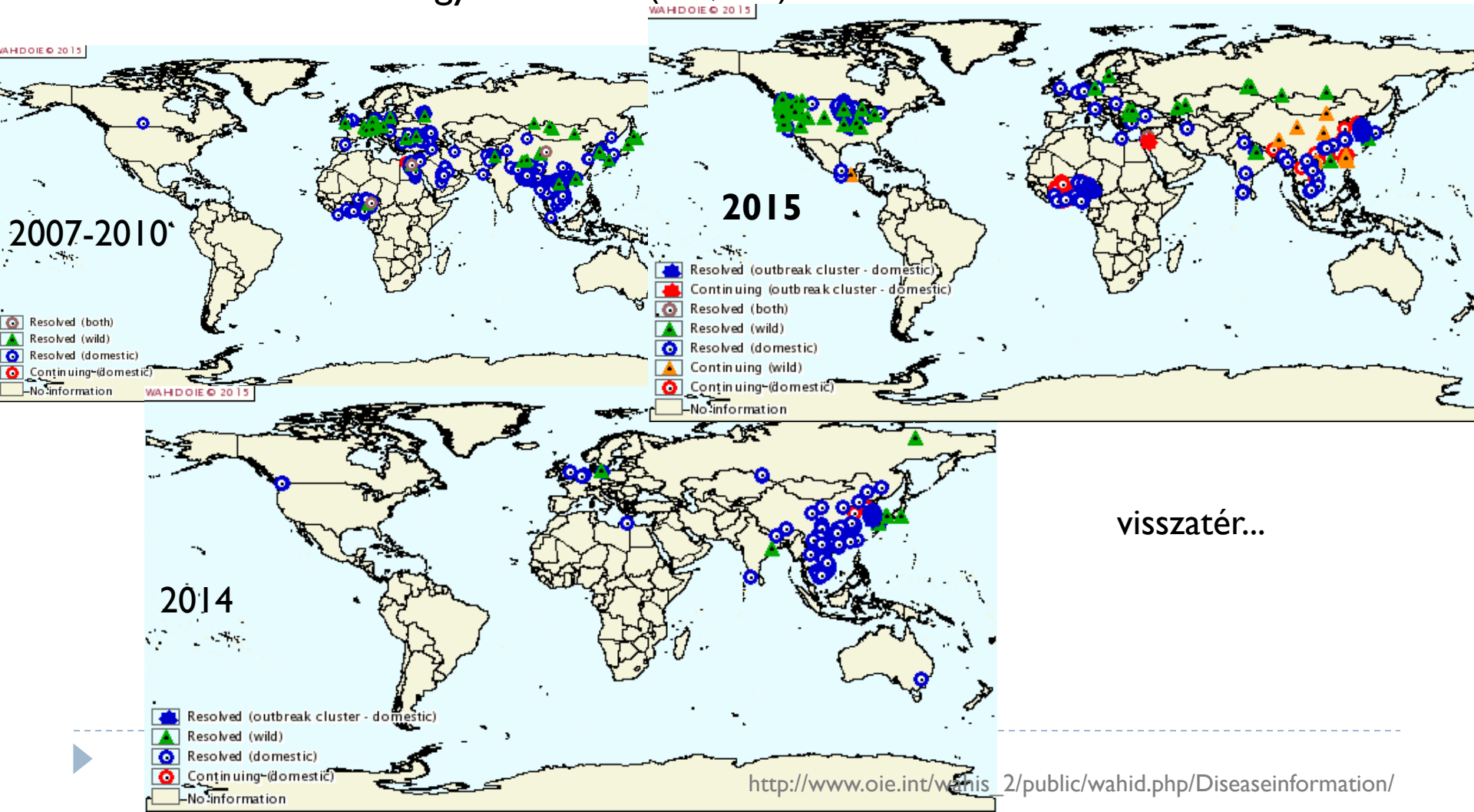
Kötelező védőoltások Magyarországon

03

T - gümőkór (tuberculosis), BCG Bacillus Calmette-Guérin/tuberculosis elleni oltóanyag	Attenuált élő marha eredetű baktérium
D - torokgyík (diphtheria),	toxoid
P - szamárköhögés (pertussis),	toxoid
T - merevgörccs (tetanus),	toxoid
IPV (inaktivált polio vírus) - gyermekbénulás (poliomyelitis anterior acuta),	3 féle inaktivált vírus
M - kanyaró (morbilli),	Élő, attenuált vírus
R - rózsahimlő (rubeola),	Élő, attenuált vírus
M - mumpsz (parotitis epidemica),	Élő, attenuált vírus
Pneumococcus	13 féle poliszaccharid fehérjéhez konjugálva (D vagy T alegység)
Hib - b típusú Haemophilus influenzae	Poliszaccharid, tetanus alegységhez konjugálva
hepatitis B	Élesztőben termelt vírus burokfehérje
HPV	Rovarsejtben vagy S. cerevisiae-ben előállított 2 vagy 4 féle virus like particle

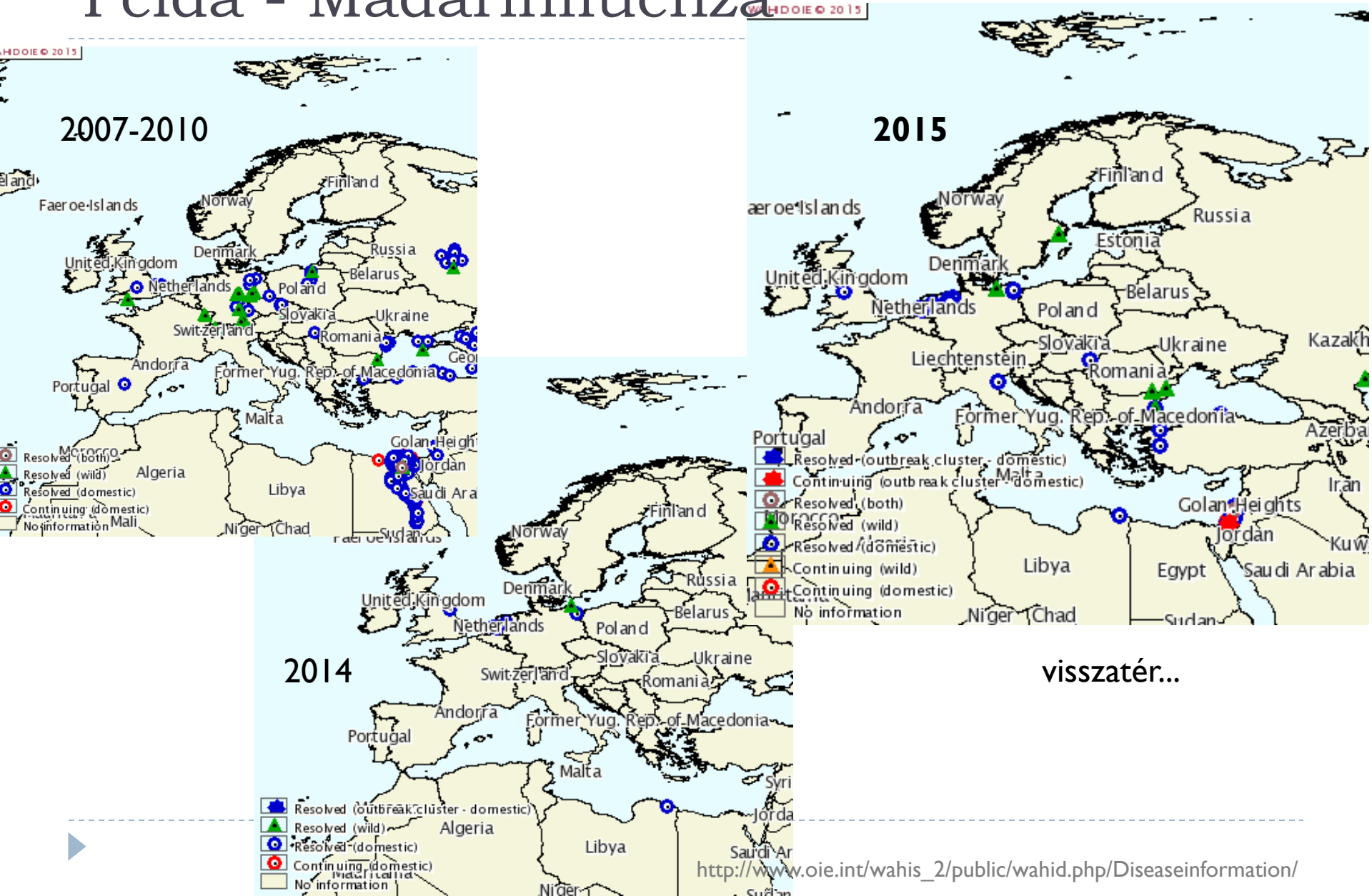
Példa - Madárinfluenza

- ▶ Alapvetően nem fertőz embert
- ▶ Madarak esetében nagy a letalitás (H5, H7)

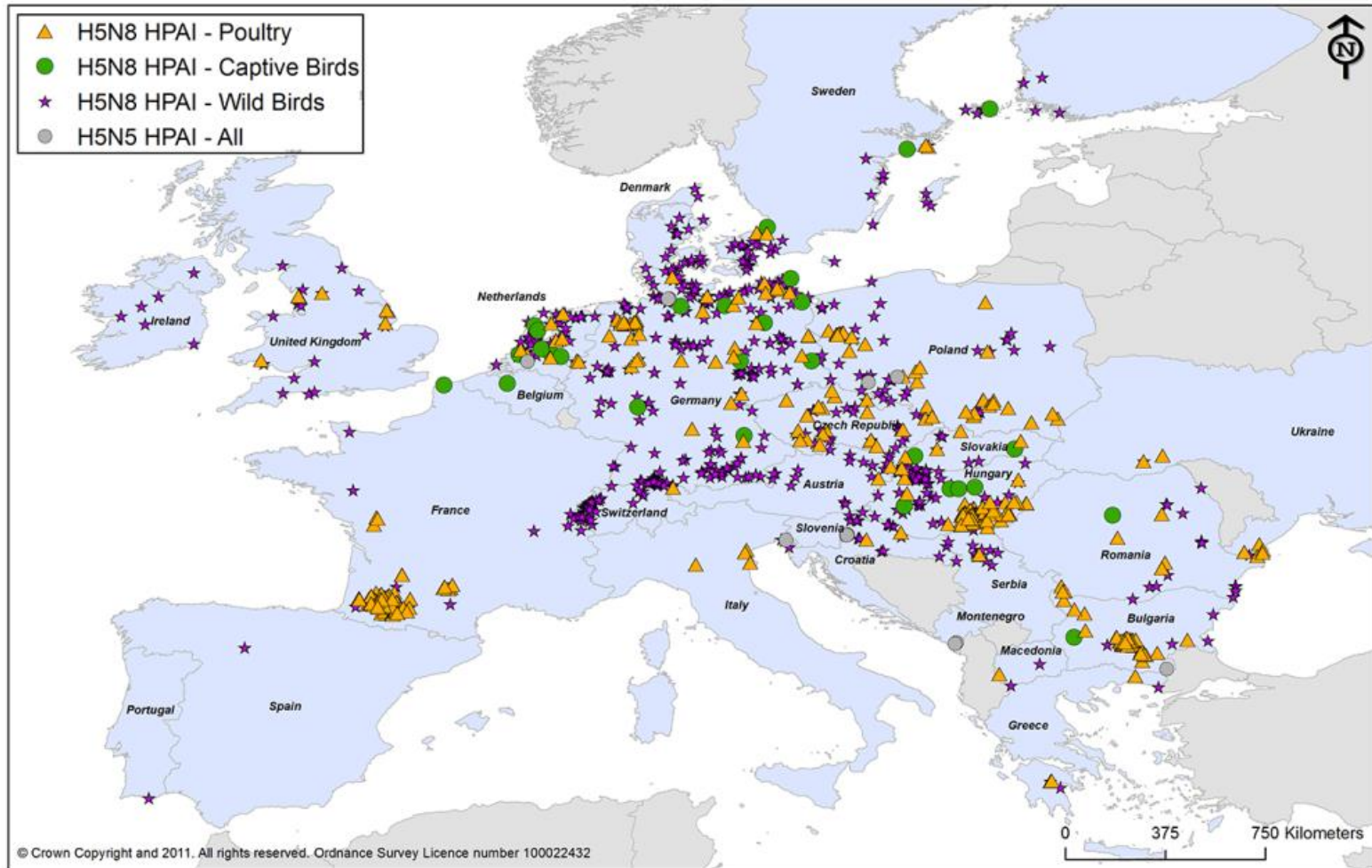


visszatér...

Példa - Madárinfluenza



Példa – Madárinfluenza 2016-2017



CREATOR:
EU Reference Laboratory
DATE: 08/02/2017

Highly Pathogenic Avian Influenza outbreaks between October 2016 and February 2017

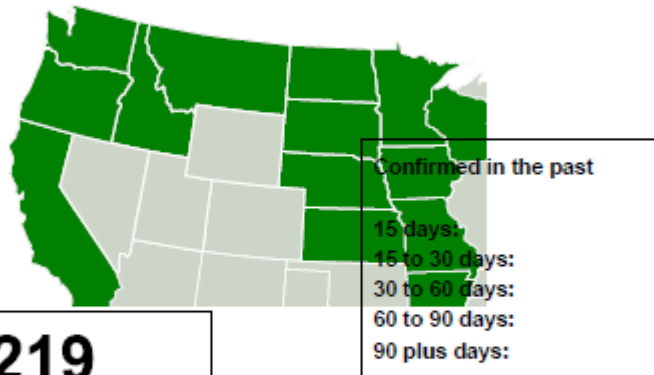

Animal &
Plant Health
Agency

Példa oltóanyag típusokra - Madárinfluenza

- ▶ megoldás: oltás
- ▶ hagyományos elölt vakcina pl. A/kacsa/2817/2006/H7N3
 - ▶ Cevac Flu H7K (USA), Cevac NewFlu (Phylaxia, H9+ND)
- ▶ Subunit/Virus Like Protein antigén
- ▶ vírusvektoros vakcina pl. Vectormune AI
- ▶ RNS/DNS vektor



Update on Avian Influenza Findings
Poultry Findings Confirmed by USDA's National
Veterinary Services Laboratories



219

Detections Reported

48,082,293

Birds Affected

H5N2 & H5N8

okra - Madárinfluenza

sa/2817/2006/H7N3

(Phylaxia, H9+ND)

re AI

Friday October 16 2015

Ceva receives contract to produce Vectormune AI for the U.S. Government vaccine stockpile

The United States Department of Agriculture's Animal and Plant Health Inspection Service (USDA/APHIS) announced yesterday Ceva Animal Health has been awarded a contract to manufacture doses of avian

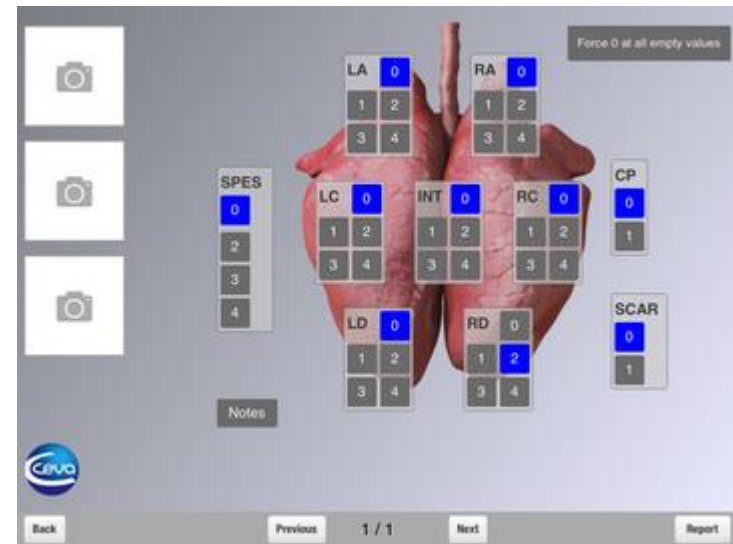


influenza vaccine.

This action is being taken to develop the Agency's National Veterinary Stockpile, and does not signal a decision to vaccinate for highly pathogenic avian influenza (HPAI).

Példa immunopotenciátorra - Hyogen

- ▶ Mycoplasma peluropneumoniae előlt bakteriális vakcina + nem toxikus E. coli lipopoliszaccharid + olaj a vízben adjuváns (Imunvant)
- ▶ EU bevezetés: 2015 szeptembertől
- ▶ Ceva Lung Program: mobil applikáció a sertések tüdejének értékelésére

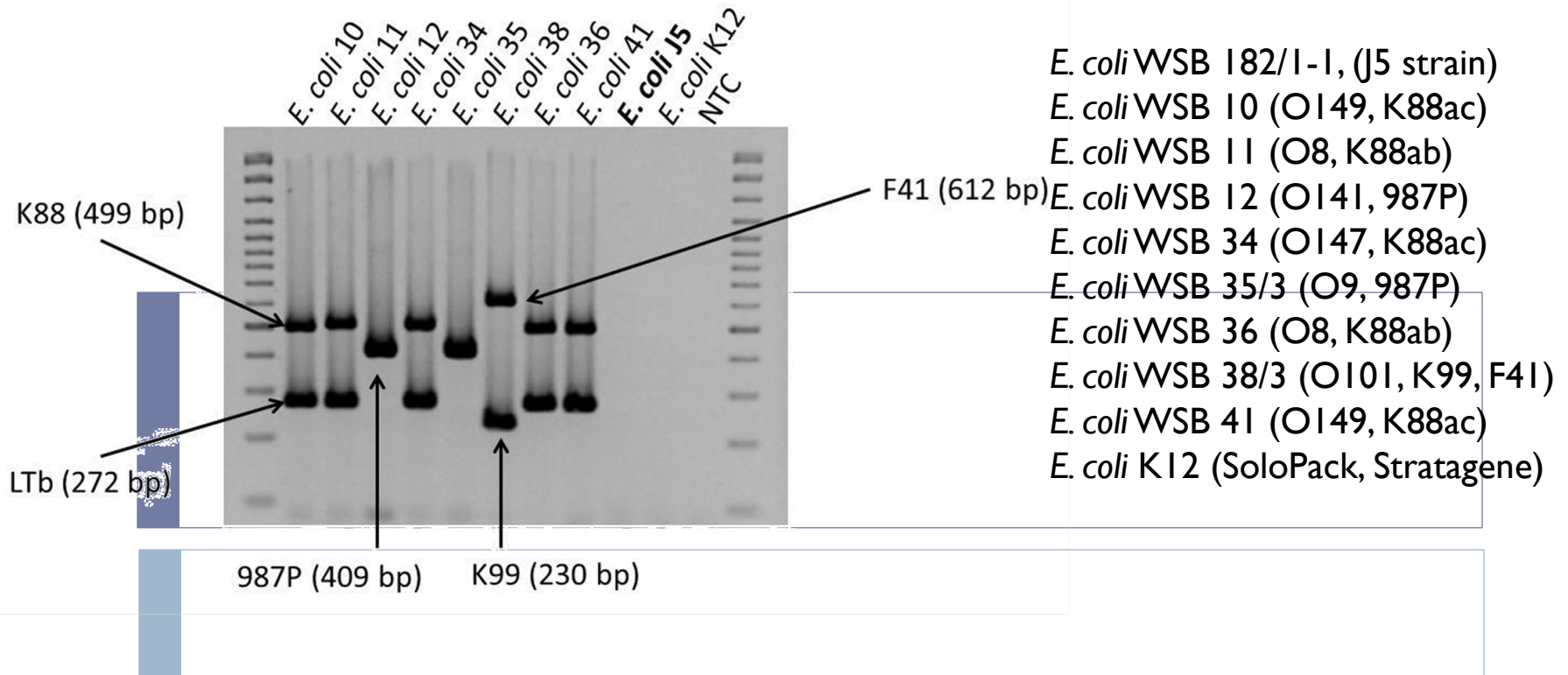


- ▶ <https://itunes.apple.com/app/ceva-lung-program/id804018933?l=fr&ls=1&mt=8>
<https://play.google.com/store/apps/details?id=com.ceva.lung>

Imuvant

Olaj a vízben emulzió, *E. coli* J5 immunpotenciátorral:

- Stabil emulzió, alacsony viszkozitással (jól oltható)
- *E. coli* J5 nem fejez ki patogénitáshoz szükséges fimbriákat: nem patogén

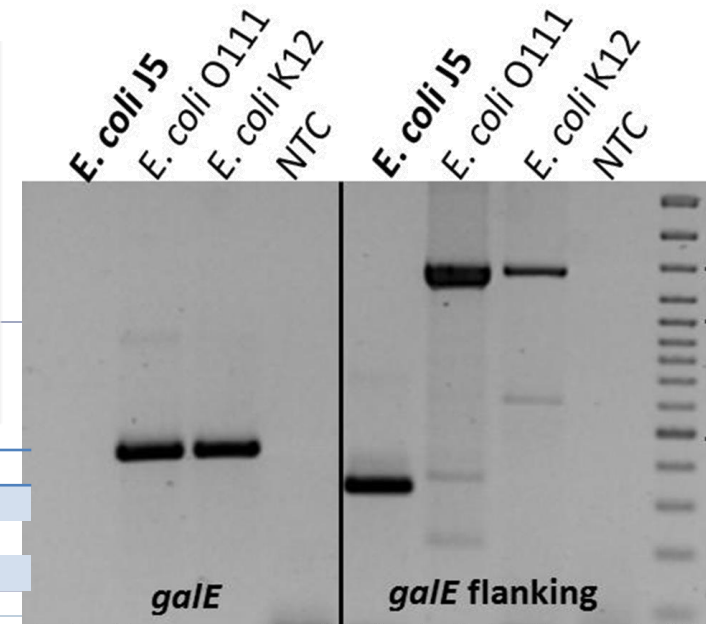
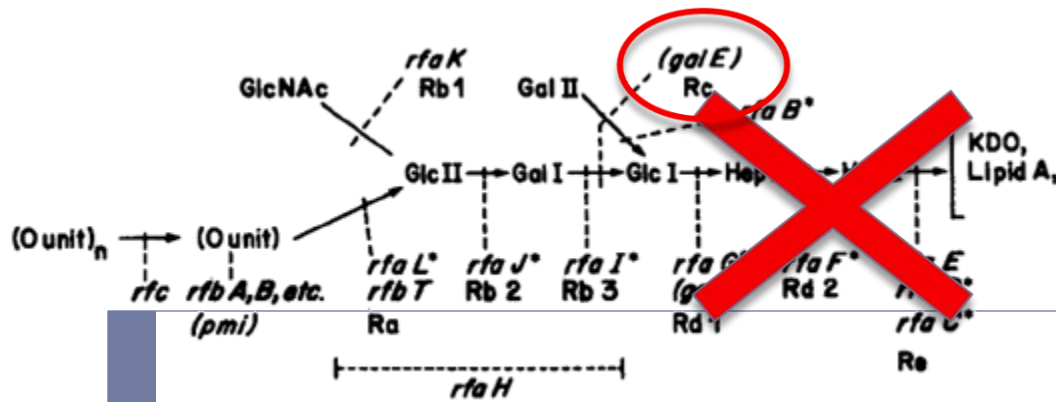


Ceva saját eredmények: Multiplex PCR *E. coli* malac specifikus virulencia faktorokra. 10-41 reprezentatív pozitív kontroll törzsek. *E. coli* K12 a negatív kontroll törzs, NTC: nincs minta kontroll.

Imuvant

Olaj a vízben emulzió, *E. coli* J5 immunpotenciátorral:

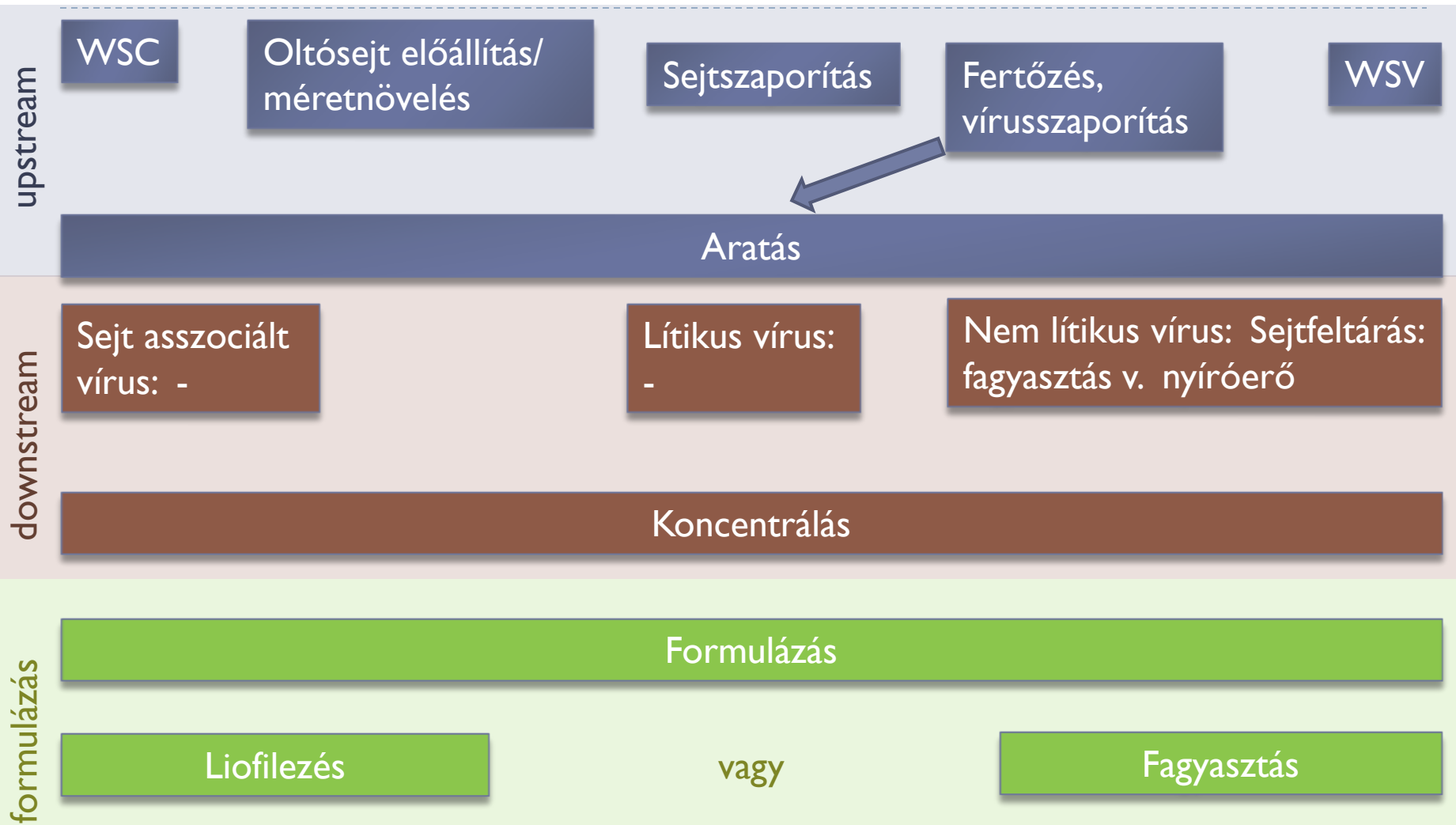
- *E. coli* J5 mutáns UDP-glucose 4-epimerase génnel rendelkezik, ami Lipid A mentes lipopoliszaccharid szintézist eredményez: nem toxikus



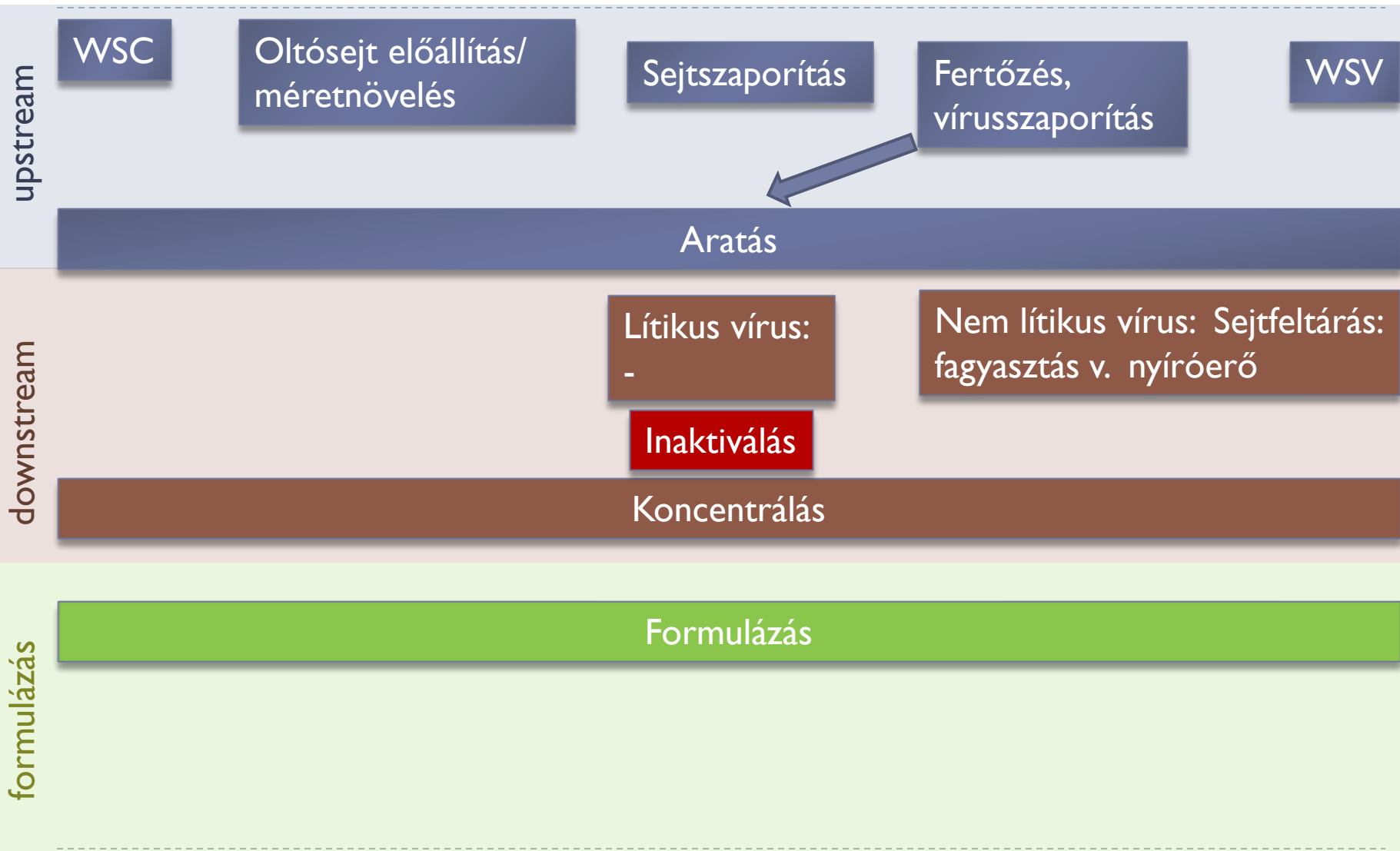
Name	Gene	Sequence	Position	Size	Refseq
galEF1	galE	CCAGTACCATCTTCGGTCCGG	332-351	422 bp	AP010960.1
galER1	galE	TCGGTACAAAAACCGCTGGA	734-753	422 bp	AP010960.1
galEF2	galE flank	AGAATCCATTGCCCGGTGAG	58-77	1430 bp	AP010960.1
galER2	galE flank	TGCCTGTATTACCCATCGCC	1468-1487	1430 bp	AP010960.1

Ceva saját eredmények: *galE* és *galE* kapcsolódó régió PCR a mutáns gén kimutatására *Escherichia coli* J5. Nincs termék a *galE* kódoló régió primerekkel, csak egy 0.3 kb termék a kapcsolódó régiókra specifikus primerekkel. Minták *E. coli* ATCC 25922, (O111 anyatorzse a J5-nek) és *E. coli* K12 (SoloPack, Stratagene) a pozitív kontrollok, NTC a minta nélküli negatív kontroll.

Élő állati vírusvakcina előállítása

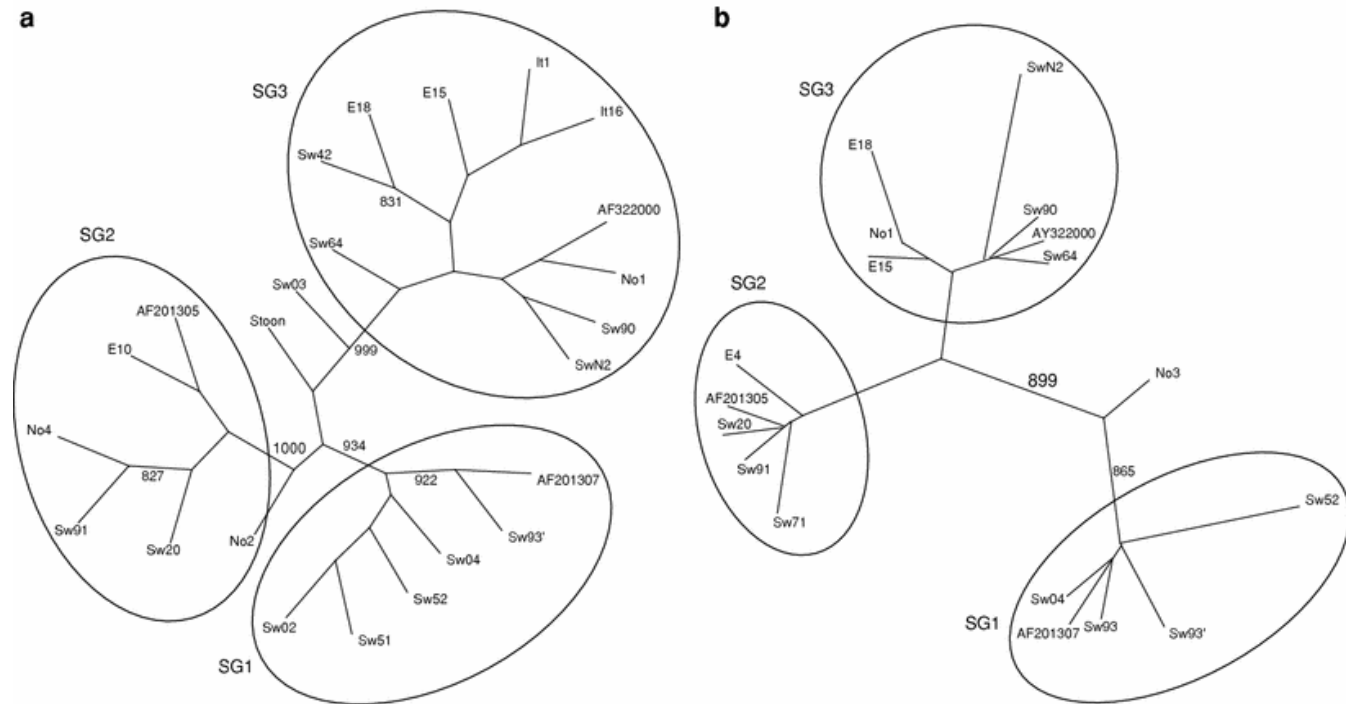


Elölt állati vírusvakcina előállítás



Példa – Vírus upstream technológia optimalizálása

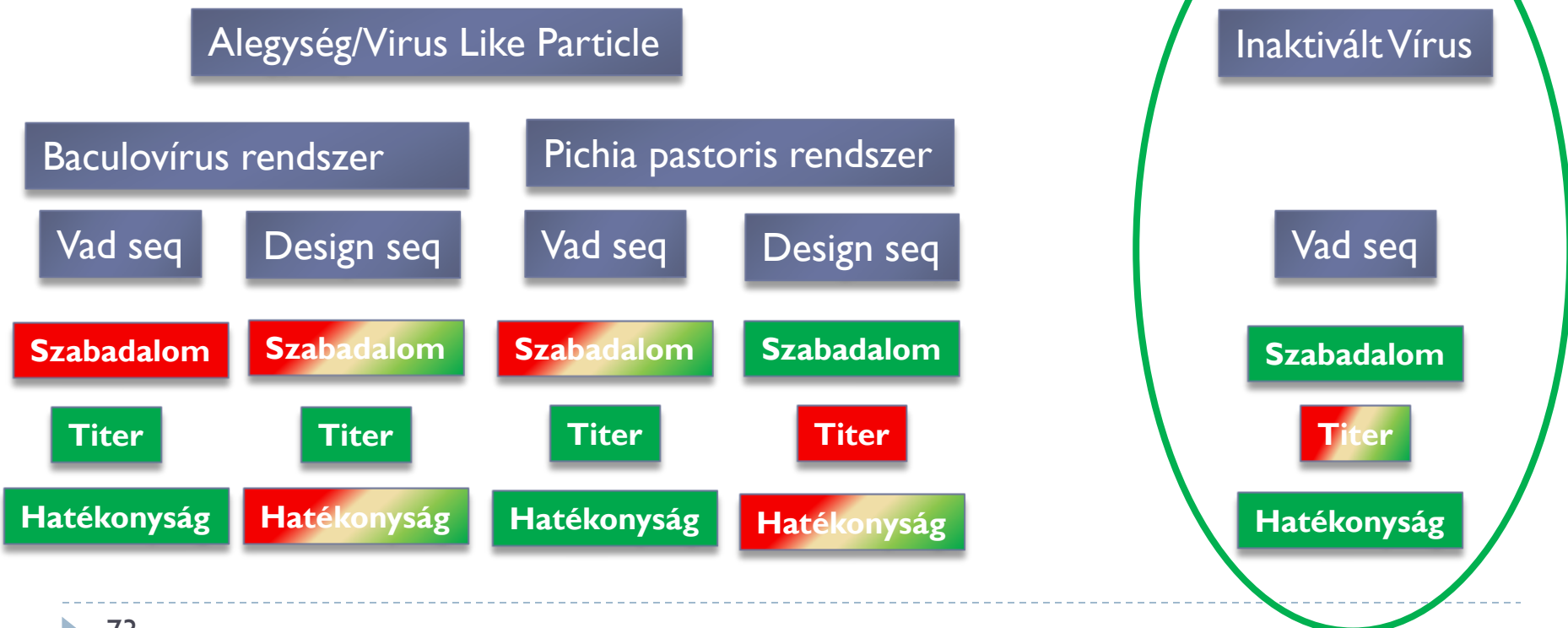
- ▶ Nem lítikus emlős vírus oltóanyag regisztráció előtt
- ▶ Kifejlesztett analitikai eszközök:
 - ▶ Vírus titrálás, ELISA, RT-PCR, IFA, sejtszámlálás stb
- ▶ Kiértékelt faktorok:
 - ▶ Vírus törzs (geográfailag különböző izolátumok szekvencia analízisén és filogenetikusan kapcsolatokon alapul)



Példa – Vírus upstream technológia optimalizálása

▶ Kiértékelt faktorok:

- ▶ Vírus törzs (geográfiaailag különböző izolátumok szekvencia analízisén és filogenetikus kapcsolatokon alapul)
- ▶ Termelő rendszer kiválasztása:



Példa – Vírus upstream technológia optimalizálása

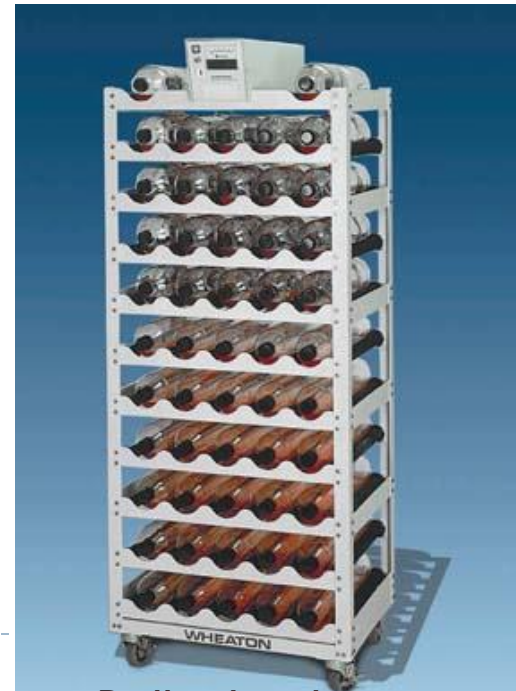
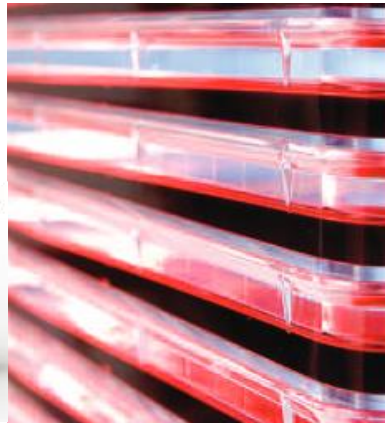
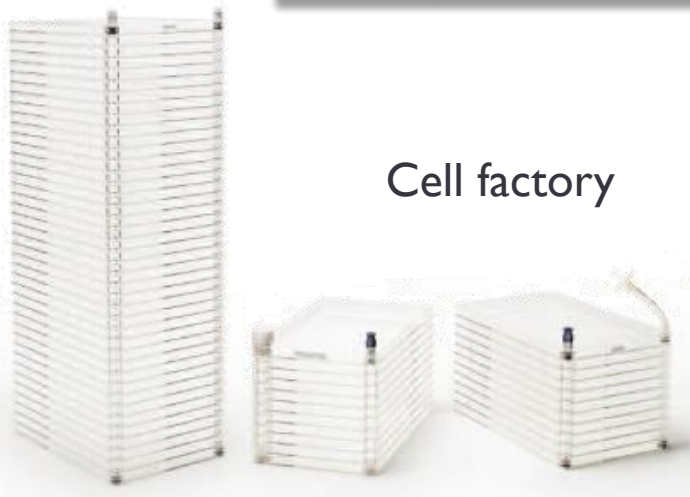
▶ Kiértékelt faktorok:

- ▶ Vírus törzs (geográfiaileg különböző izolátumok szekvencia analízisén és filogenetikus kapcsolatokon alapul)
- ▶ Termelő rendszer kiválasztása: szöveten termelt inaktivált vírus
- ▶ Sejtvonal kiválasztása (szabadalommal nem védett, könnyen fenntartható, jó titerrel termelő)
- ▶ Termelő eszközök:

WSC

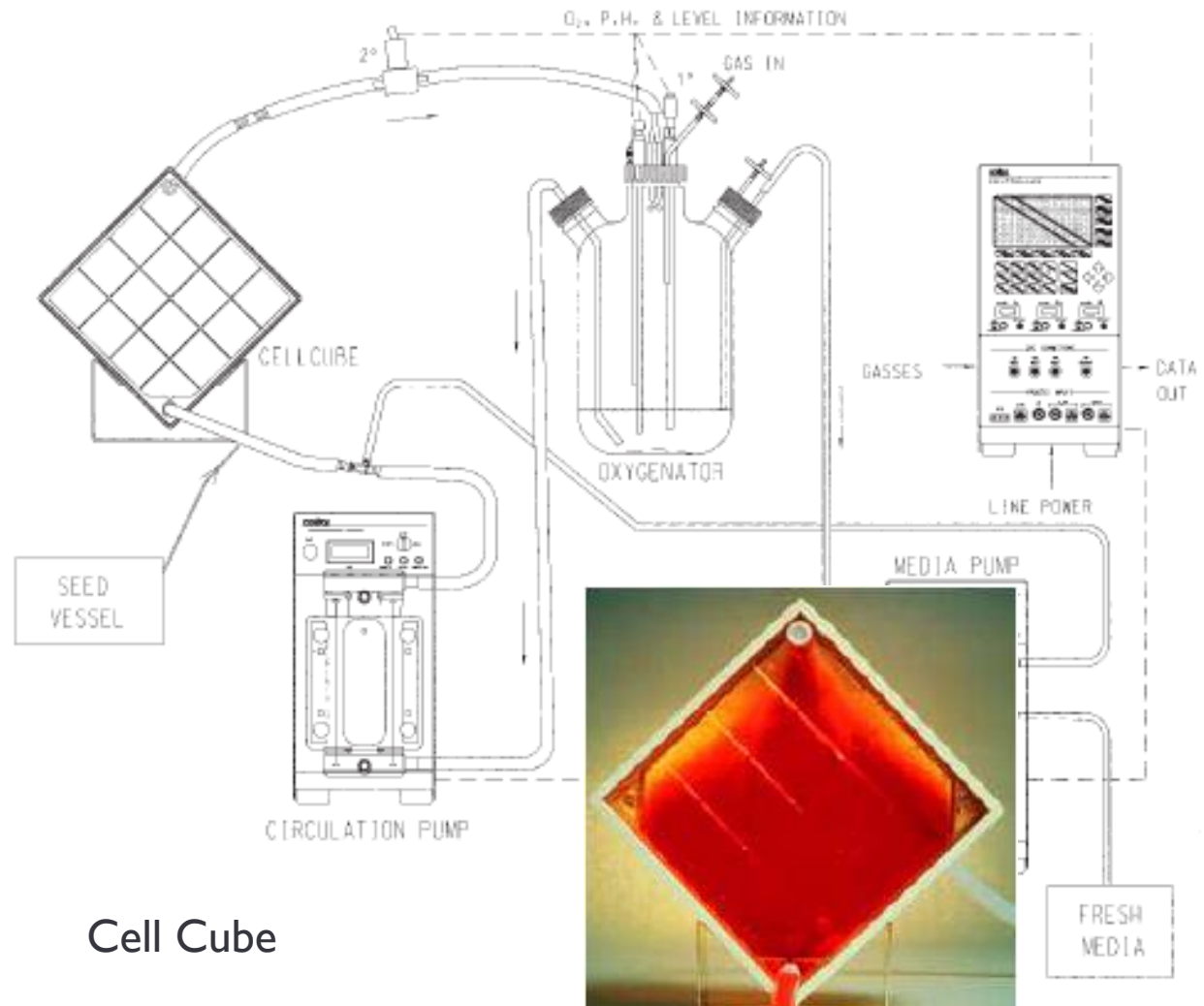
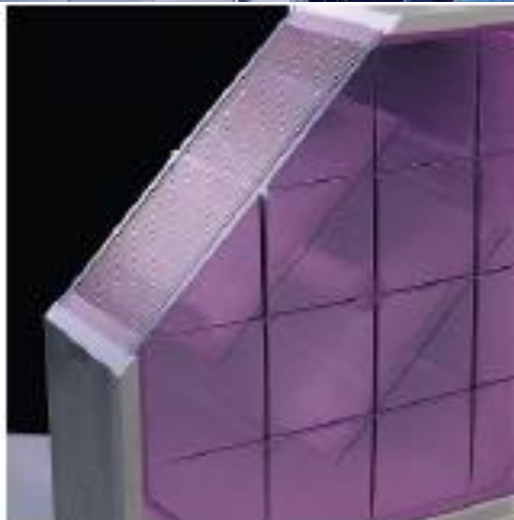
Oltósejt előállítás: roller bottle/cell factory/cell cube

Cell factory



Roller bottles

Példa – Vírus upstream technológia optimalizálása



Cell Cube

1. Példa – Vírus upstream technológia optimalizálása

- ▶ Nem lítikus emlős vírus a fejlesztés korai fázisában

WSC

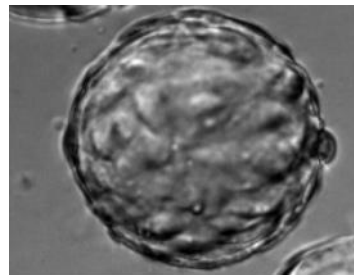
Oltósejt előállítás: roller bottle/cell factory/cell cube

Sejt leoltása hordozóra: fixed bed/microcarrier

iCellis Nano



Cytodex 3 microcarriers



Példa – Vírus upstream technológia optimalizálása – Kolmogorov modell



Process Detail	Check those that apply	Comments
Titrant		
Acid		
Antifoam		
Maximum VCD		
Final Viability (%)		
Titer (mg/mL)		
k _{La} (1/hr)		
P/V (W/M ³)		
OUR		
Process Sensitivity	Limits	Comments
dCO ₂ (mmHg)		
Interfacial/Foam		
Tip speed		
Kolmogorov		
Shear		
P/V		

Keverés számolás - Kolmogorov:

- ▶ 1) A keverés hatására a lében kis turbulens örvények keletkeznek.
- ▶ 2) Minél jobban keverjük a levet annál kisebb lesz az örvények mérete.
- ▶ 3) Ha az örvények mérete kisebb, mint a hordozó gömb átmérőjének a 2/3-a akkor állítólag az örvények le tudják nyírni a sejteket a hordozó felületéről.
- ▶ 4) A Cytodex 3 átmérőjének, a keverők átmérőjének és a lé tulajdonságainak ismeretében ki lehet számolni a keverők max megengedett fordulatszámát.

1. Példa – Vírus upstream technológia optimalizálása – Kolmogorov modell

1. λ : örvény karakterisztikus mérete (=carrier átmérő * 2/3)

2. P_m : egységnyi tömegben disszipált teljesítmény (energia áram)

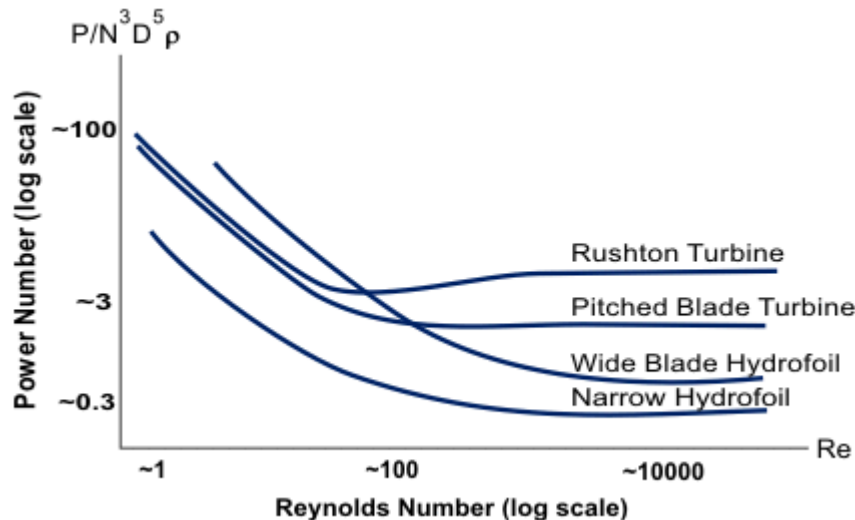
$$P_m = v^3 / \lambda^4 \quad (\text{Kolmogorov elméletből}) \quad v: \text{kinematikai viszkozitás} = \mu/\rho$$

3. Keverő teljesítmény: $P = P_m * \rho * D_i^3$ ρ : sűrűség; D_i : keverő elem átmérő

4. Az Euler számból (N_p) számítható a keverő fordulatszám (N_i):

$$N_i^3 = P / (N_p * \rho * D_i^5)$$

$N_p=5$ pitched blade keverőre
Ez kísérleti adatokból jön ki.
(Euler-Reynolds összefüggés adott keverőre)



1. Példa – Vírus upstream technológia optimalizálása – Kolmogorov modell

	micrometer	in SI units	
Cytodex 3 bead diameter (D)	175	1.75E-04	m
Kolmogorov scale limit ($=2/3 \cdot D$)		1.17E-04	m
dynamic viscosity of broth		1.30E-03	Pas
density of broth		1010	kg/m ³
kinematic viscosity of broth		1.29E-06	m ² /s
ν		0.01151	m ² /s ³
impeller diameter		0.11	m
stirrer power		0.01547	W
N_p (turbine impeller, turbulent)		5	(-)
N_i^3		0.19024	s ⁻³
N_i		0.57514	1/s
Maximum mixer rpm		34.51	rpm
Reynold's number for mixing at max rpm		5.41E+03	(-)

	impeller diameter	max rpm	Re mix
1 L glass reactor	0.04	68	1400
5L glass reactor	0.11	35	5410
50L BIOSTAT STB SUB	0.143	29	7670
500L BIOSTAT STB SUB	0.225	22	14000

The calculation estimates the maximum allowable mixer rpm for the different PCV2 cell culture fermentors. As mixer rpm is increased, the size of the turbulent eddies decrease. If the size of the turbulent eddies go under the 2/3-rd of the carrier bead diameter then eddies become capable of shearing off the cells from the surface of the beads. Critical parameter for the calculation is the diameter of the mixer.

Új épület





New production building

