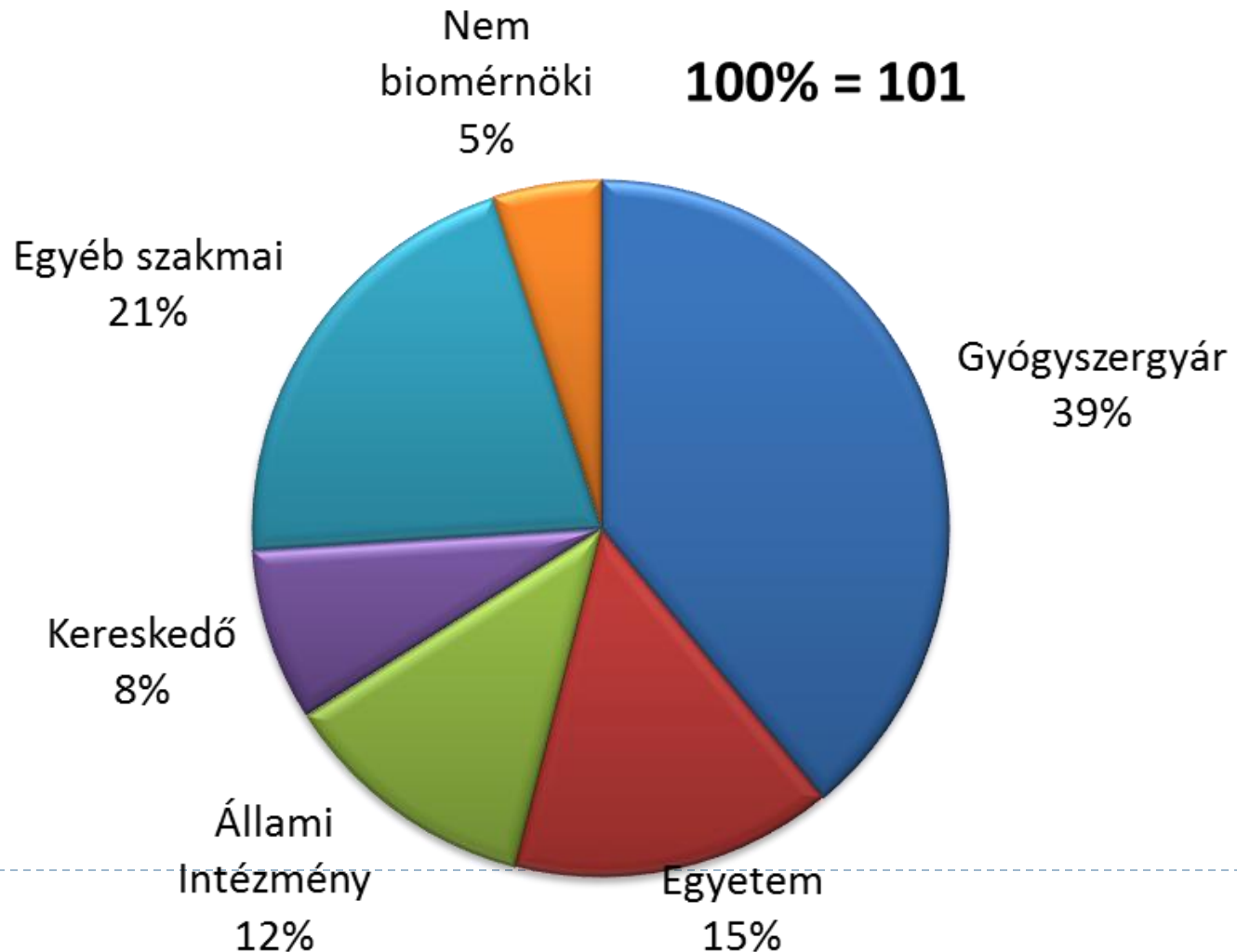


Oltóanyagok: Működés, követelmények, típusok, előállítási lehetőségek

Dr. Kupcsulik Bálint

Mit fog Ön csinálni, ha lediplomázott?

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



Tartalom

- ▶ Ceva
- ▶ Védőoltások
- ▶ Omics vs. Nagy hatékonyságú módszerek
 - ▶ 1. példa – *Actinobacillus* oltóanyag
 - ▶ 2. példa – Klasszikus statisztikai alapú fejlesztés - *Mannheimia haemolytica* leukotoxin
 - ▶ 3. példa – Vírus antigén előállítás





- ▶ A Ceva olyan állategészségügyi cég, ami maga fejleszt, gyártja és forgalmazza termékeit.
- ▶ A Ceva a menedzsment többségi tulajdonában van.
- ▶ 43 országban van jelen saját céggel, 110 országban ad el.
- ▶ A Cevának több, mint 3000 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

TO Animal Health in M€
 (+%) % Growth Y-1 TO Animal Health

A Ceva eladásai 3 év alatt ötszörösére nőttek.



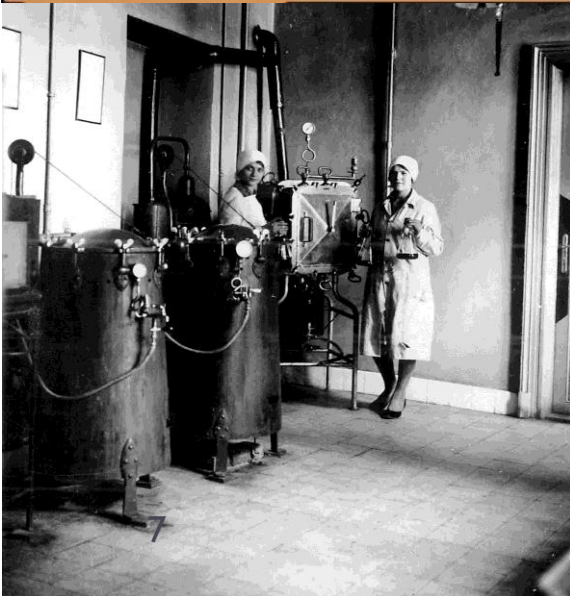
Ceva biológiai gyártás/fejlesztés



Global Biology network



Ceva-Phylaxia Zrt.

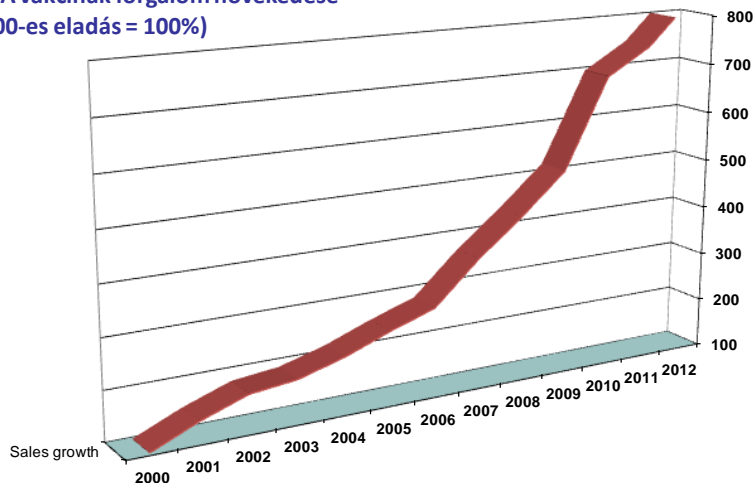


Ceva-Phylaxia Zrt.

CEVA-PHYLAXIA

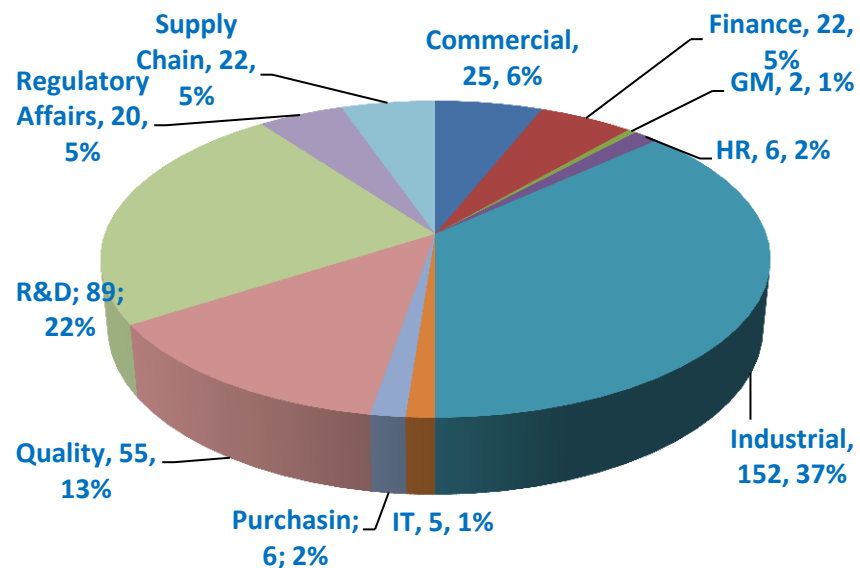
- ▶ Budapest, EU
- ▶ Európai GMP gyártás

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



Ceva csoport tagja:

- 1991 óta



Létszám: 414

Pl. Cevac Transmune vakcina: 5.9 milliárd dózis 2012-ben!

Kötelező védőoltások Magyarországon

0-6 hét	BCG
2 hónap	DTPa + Hib + IPV
3 hónap	DTPa + Hib + IPV
4 hónap	DTPa + Hib + IPV+Pneumococcus
6 hónap	Pneumococcus
15 hónap	MMR I.
18 hónap	DTPa + Hib + IPV
6 év	DTPa + IPV
11 év	DT
11 év	MMR revakcináció
14 év	Hepatitis B I; II

T - gümőkór (tuberculosis), BCG Bacillus Calmette- Guérin/tuberculosis elleni oltóanyag
D -torokgyík (diphtheria),
P - szamárköhögés (pertussis),
T - merevgörccs (tetanus),
IPV (inaktivált polio vírus) - gyermekbénulás (poliomyelitis anterior acuta),
M - kanyaró (morbilli),
R - rózsahimlő (rubeola),
M - mumpsz (parotitis epidemica),
Hib - b típusú Haemophilus influenzae
hepatitis B

WHO ajánlása szerint az élővírus tartalmú Sabin vakcina (OPV) alkalmazását 2010-ig minden országban fel kell váltani az inaktivált poliovírus tartalmú vakcinával (IPV), ugyanis a teljes polioeradikáció mindennemű poliovírus 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

▶ Állat:

- ▶ a fentiek de:
- ▶ gazdasági és szabályozásbeli kérdés: antibiotikum vs. oltás
- ▶ és zoonotikus betegségek (pl. Salmonella enteritidis csirkénél, Coxiella burnettii, Chlamydia, Brucella kérődzőknél)

Q-fever

News

Tough lessons from Dutch Q fever outbreak

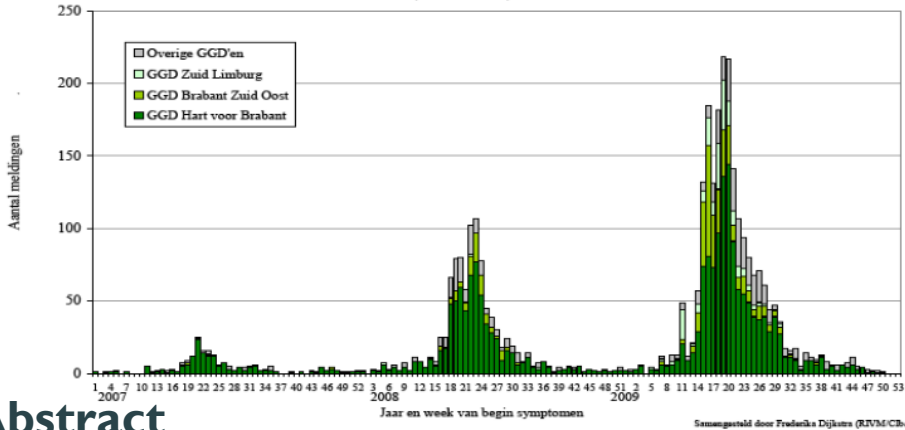
Mass cull of goats questioned as researchers race to find strain behind human cases.

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.



Aantal gemelde Q-koorts-patiënten 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



Samengesteld door Frederika Dijkstra (RIVM/CB:EF)

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*.



Kötelező védőoltások Magyarországon

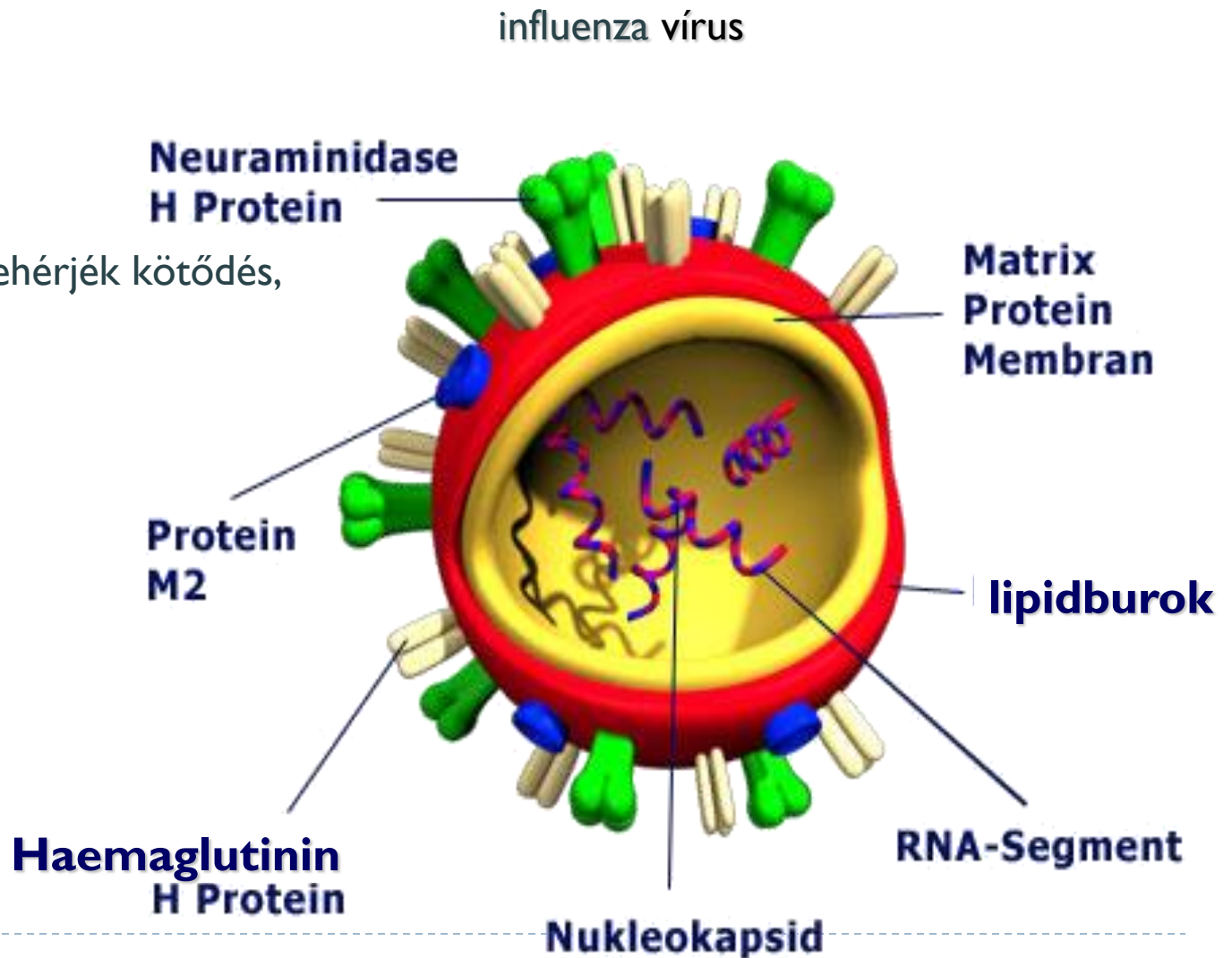
baktérium

vírus

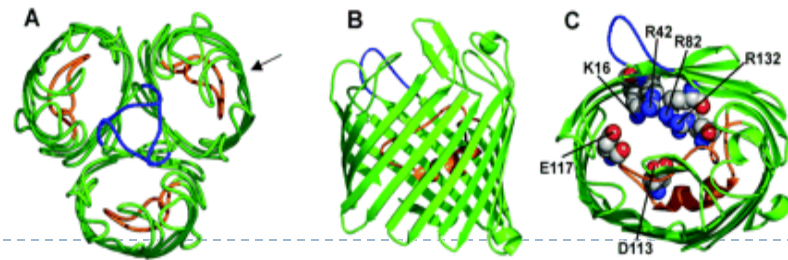
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	T - gümőkór (tuberculosis), BCG Bacillus Calmette-Guérin/tuberculosis elleni oltóanyag
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	D - torokgyík (diphtheria),
<i>Bordetella pertussis</i>	P - szamárköhögés (pertussis),
<i>Clostridium tetani</i>	T - merevgörccs (tetanus),
polio 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
hepatitis B vírus (<i>Orthohepadnavirus</i>)	hepatitis B

Vírus antigének

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

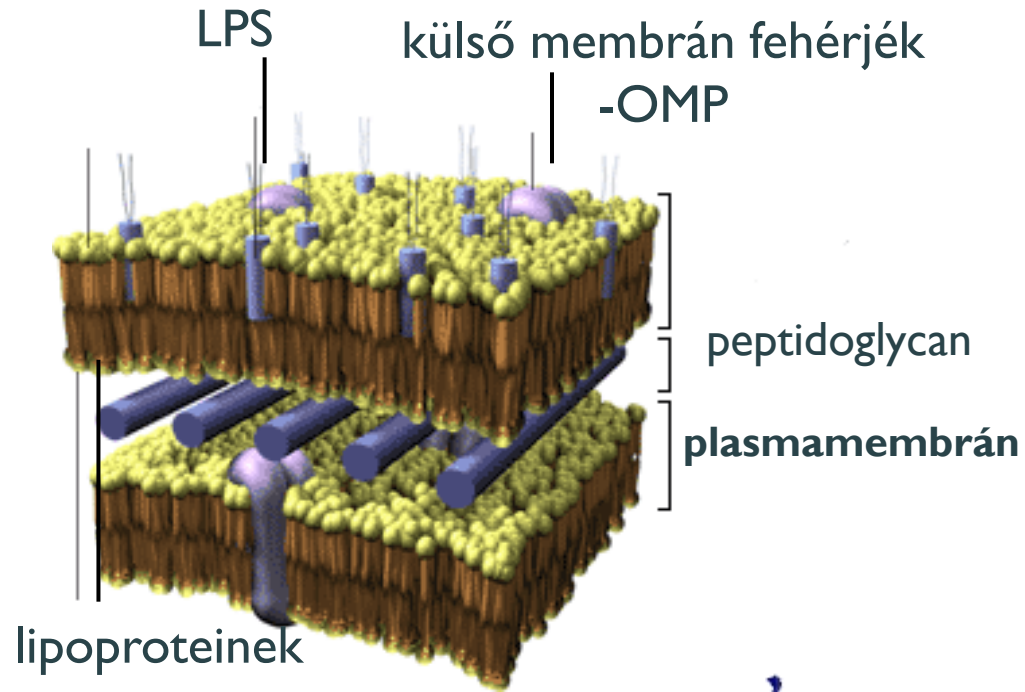
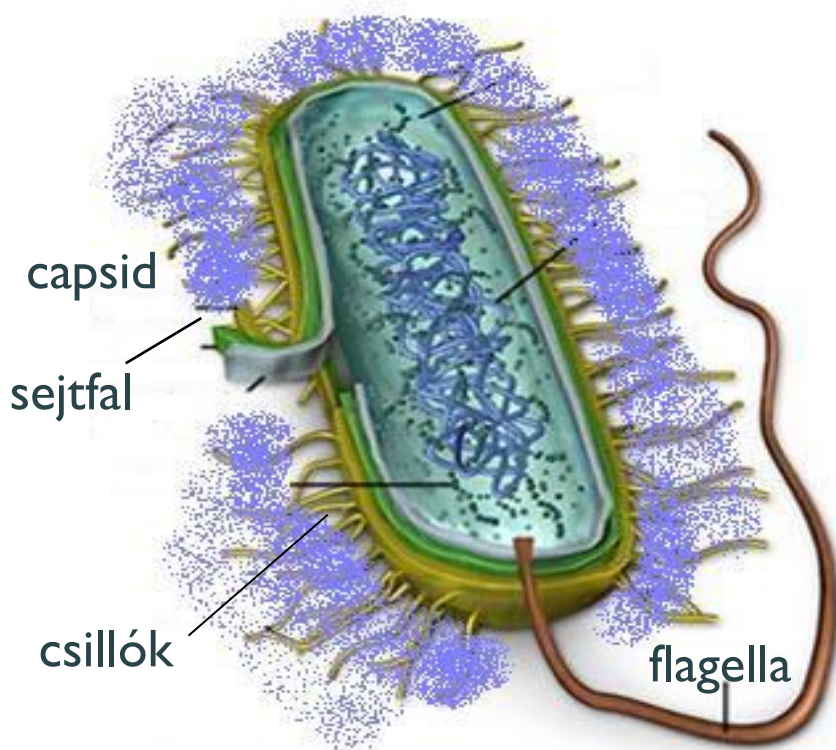


Bakteriális antigének

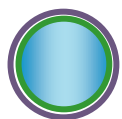
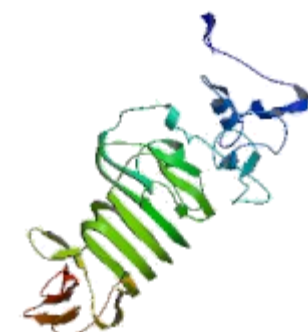


lipopoliszacharidok

extracelluláris polimer - EPS



extracelluláris toxinok



vesicles

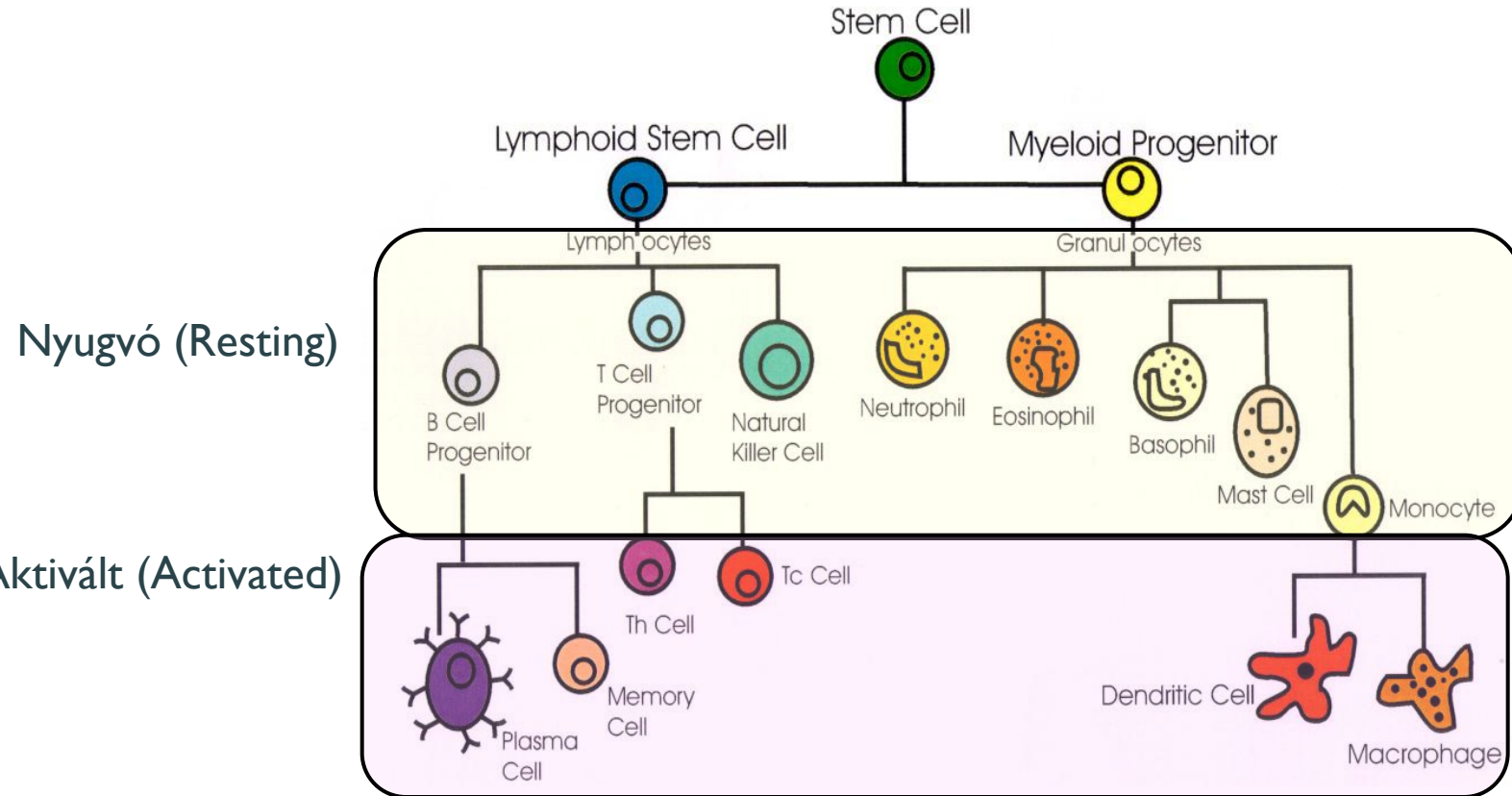
<http://www.tpsd.org/th/s/sciences/b2eukpro.htm>

<http://invsee.asu.edu/ImageGallery/Schematic/LifeSciences/gram-wall.html>

Microbiology and Molecular Biology Reviews (2003), 67. 4. p. 593-656.

Immunrendszer

Cells of the Immune System

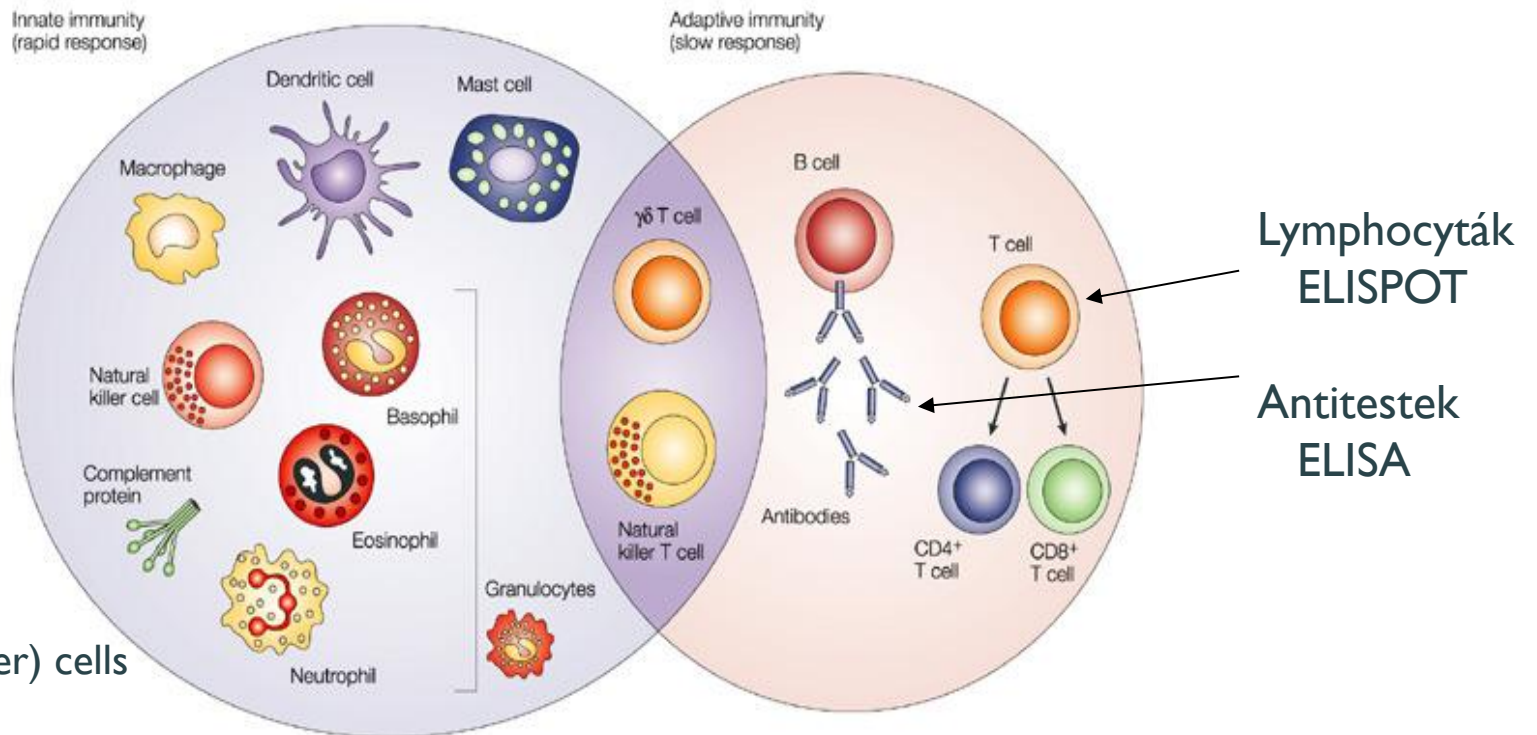


Immunrendszer

Oltóanyag

Innate (Veleszületett) immune system

Adaptive immune system



Lymphocyták
ELISPOT

Antitestek
ELISA

Myeloid sejtek
NK (natural killer) cells

Complement

A veleszületett és az adaptív immun rendszer

	Emlős immun rendszer	
	Innate (Veleszületett)	Adaptive / acquired (Adaptív/Szerzett)
Funkció	<p>A védelem első vonala patogén érzékelés (PRR) patogén eltávolítása – (kevésbé) Ag feldolgozása és prezentálása az adaptív immunválasz alakítása</p>	<p>A védelem második vonala patogén felismerés patogén eltávolítása – (fő funkció) Ag eltávolítása (a veleszületett rendszer segítségével) visszahat a veleszületett rendszerre</p>
<p>evolúciós háttér Ag specifitás előzetes aktiválás reakció memória</p>	<p>Ősi, konzervatív kevésbé specifikus nem szükséges</p> <p>azonnali nincs</p>	<p>fiatalabb nagyon specifikus szükséges</p> <p>késleltetett van</p>

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 a 70%-os védettség gyakran elfogadható

Lényeges különbség: állatoknál a hatékonyságot direkt módon, ráfertőzéssel (challenge vizsgálat) kell vizsgálni, míg embernél csak közvetett módon lehet

- ▶ **Aktivitás = Hatóanyag felszabadítási teszt (Potency):** olyan, minden sarzson elvégzett mérés, mely megfelelésbe hozható a hatékonysággal
 - ▶ pl. laborállat oltás + ELISA

- ▶ **Stabilitás (Stability):** garantálja, hogy X idő elteltével is megfelelő a Biztonságosság, Hatékonyság és Hatásosság
-

Oltóanyagok

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



Kötelező védőoltások Magyarországon

T - gümőkór (tuberculosis), BCG Bacillus Calmette-Guérin/tuberculosis elleni oltóanyag	Attenuált élő marha eredetű baktérium
D -torokgyík (diphtheria),	toxoid
P - szamárköhögés (pertussis),	toxoid
T - merevgörcs (tetanus),	toxoid
IPV (inaktivált polio vírus) - gyermekbénulás (poliomyelitis anterior acuta),	3 féle inaktivált vírus
M - kanyaró (morbilli),	Élő, attenuált vírus
R - rózsaahimlő (rubeola),	Élő, attenuált vírus
M - mumpsz (parotitis epidemica),	Élő, attenuált vírus
Pneumococcus	13 féle poliszaccharid fehérjéhez konjugálva
Hib - b típusú Haemophilus influenzae	Poliszaccharid, tetanus alegységhez konjugálva
hepatitis B	Élesztőben termelt vírus burokfehérje

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
2012, 09. 27.	X										
2012, 09. 28.		X	X	X	X	X	X	X			
2012 OKT 23.		X	X	X	X	X	X	X			
2012 NOV 30.		X	X	X	X	X	X	X			
2012 NOV 30.							X				
2013 FEBR 04.							X				

Date (nap) (mm / dd)	Rotavírus	Meningococcus C	Bárányhimlő / Varicella	Hepatitis A	Kullancs-encephalitis / Tick born encephalitis	Human Papilloma Vírus	Tetanusz toxid /(TT)	Influenza	Pneumococcus (poliszacharid) / PPV	Hastífusz / Typhoid fever	Sárgaláz / Yellow fever
2012, 09. 27.	X										
2012, 09. 28.		X									
2012 OKT 23.											
2012 NOV 30.											
2012 NOV 30.											
2013 FEBR 04.											

Egyéb védőoltások

Other immunizations

Infant's name: **741-1**

Oltóanyag neve, száma / Brand name and batch of vaccine	Oltóorvos aláírása Official stamp of
Lot: H2212-1 Exp: 11-2013 Lot: H2212-1 Exp: 11-2013	
Lot: J4086-1 Exp: 08-2014	
Lot: F95834 Exp: 09 2014 Lot: F95834 Exp: 09 2014	

Oltóanyag neve, száma / Brand name and batch of vaccine

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

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

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 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?**

Információ robbanás a biológiában

▶ Génexpresszió mérése (mRNS)

▶ arrays

- ▶ EST: expressed sequence tag: cDNA sequencing
- ▶ SAGE: serial analysis of gene expression
- ▶ MPSS: massive parallel signature sequencing (microbead based) RNA-Seq = WTSS: whole transcriptome shotgun sequencing

▶ Expresszió optimalizálás

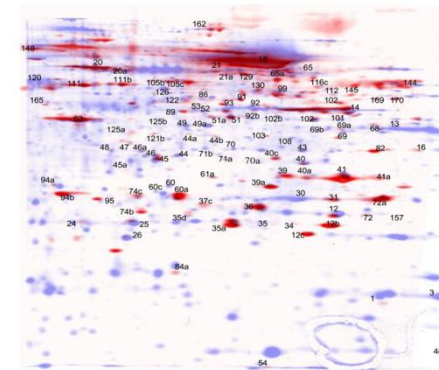
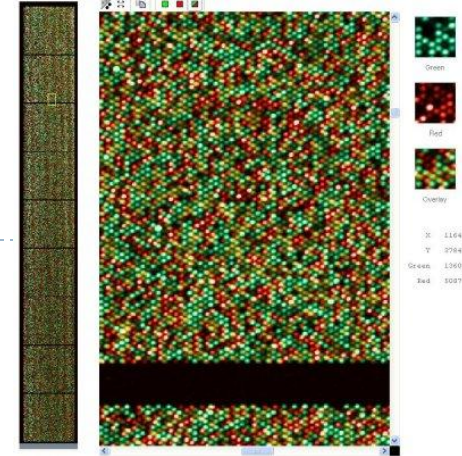
▶ Shock fehérje monitorozás > folyamat optimalizálás és kontroll

▶ Secretomics

- ▶ Fehérjék szekréciónak becslése a szignál szekvenciák analízisének alapján
- ▶ 2D ELFO + kép analízis + MS

▶ Metabolomics

- ▶ GC-, HPLC-, CE-MS; NMR
- ▶ Mélni lehessen egy szervezet metabolikus válaszát genetikai vagy külső tényezők változásának a hatására



Modellezés

- ▶ **Metabolikus modellek**
 - ▶ A genome, proteome és matabolome dinamikus 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

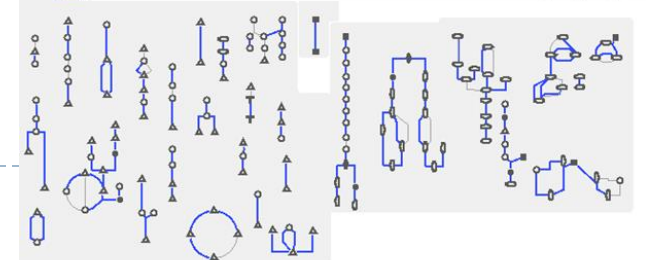
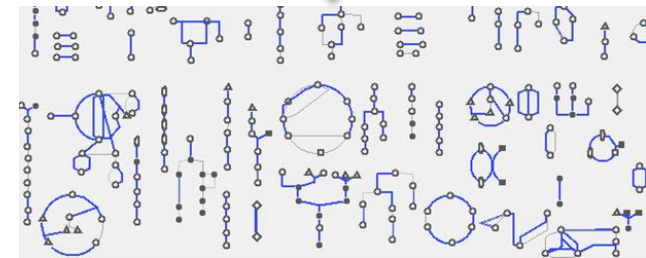
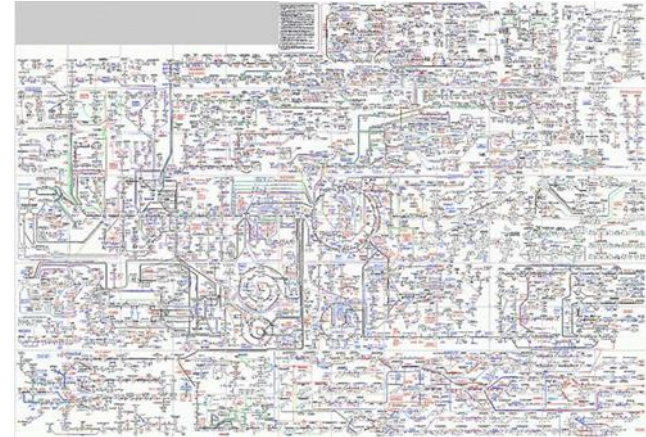
záltsá

analysis

behavi



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



▶ Flux balance analysis



sek

stb.

HT rendszerek - upstream

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

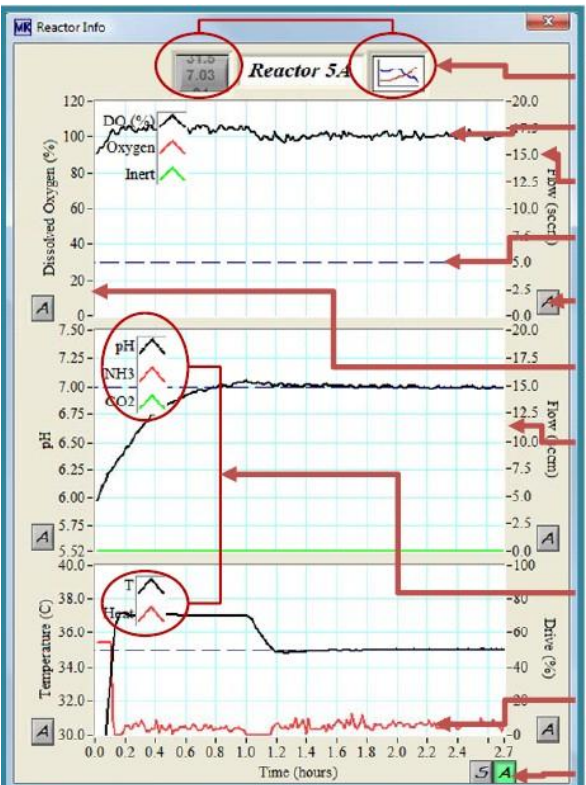
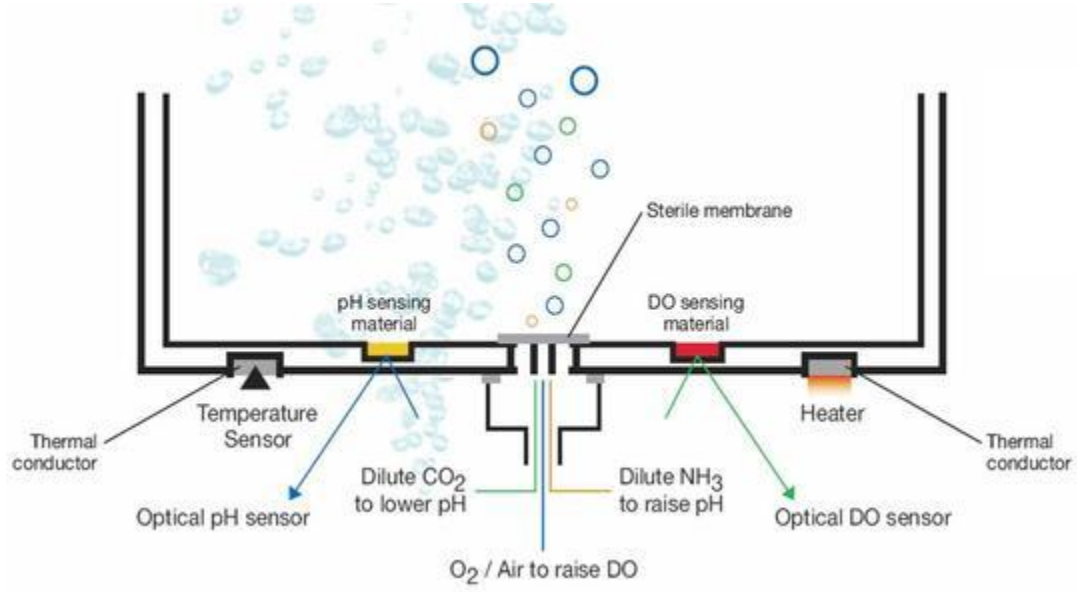
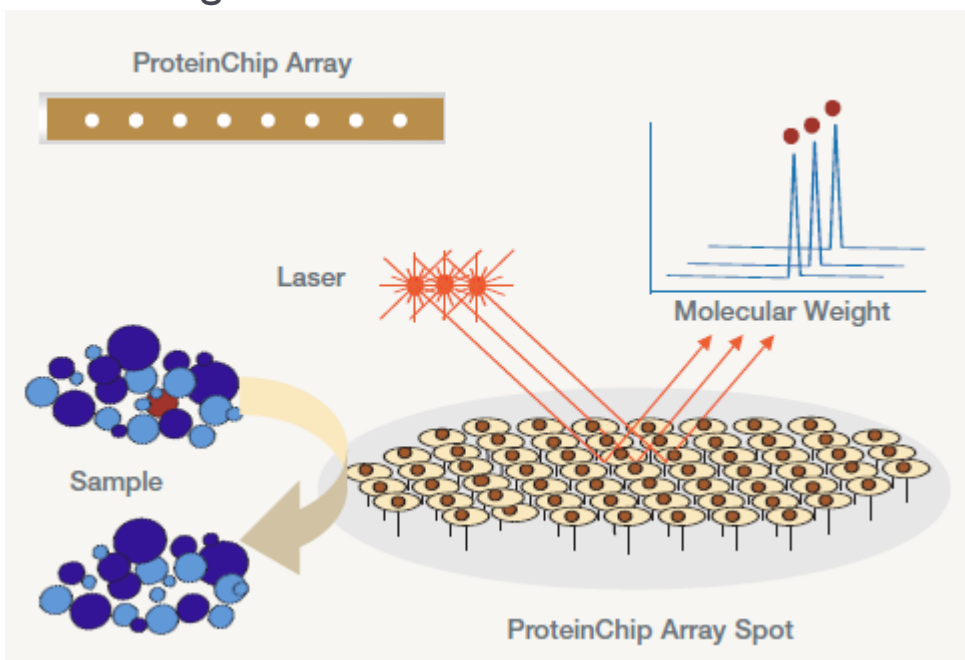


Table or Graph View Selectors
 Process Value
 Output Scale
 Setpoint (Dashed line)
 Auto Scaling
 Process Value Axis
 Control Output Axis
 Process Value Legends
 Instrument Output
 TimeScaling

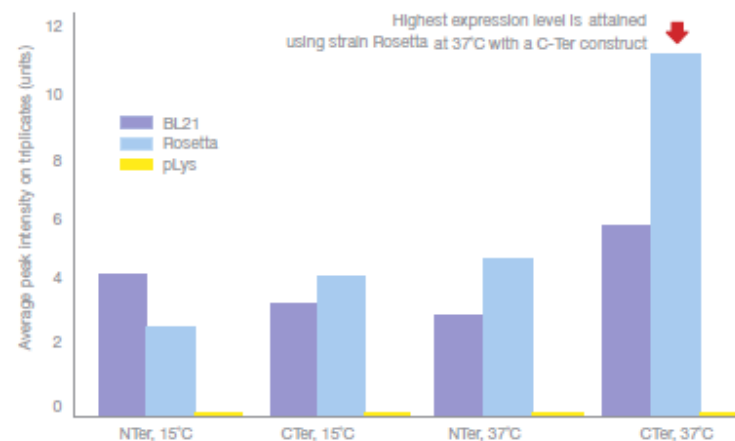


HT rendszerek - upstream

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

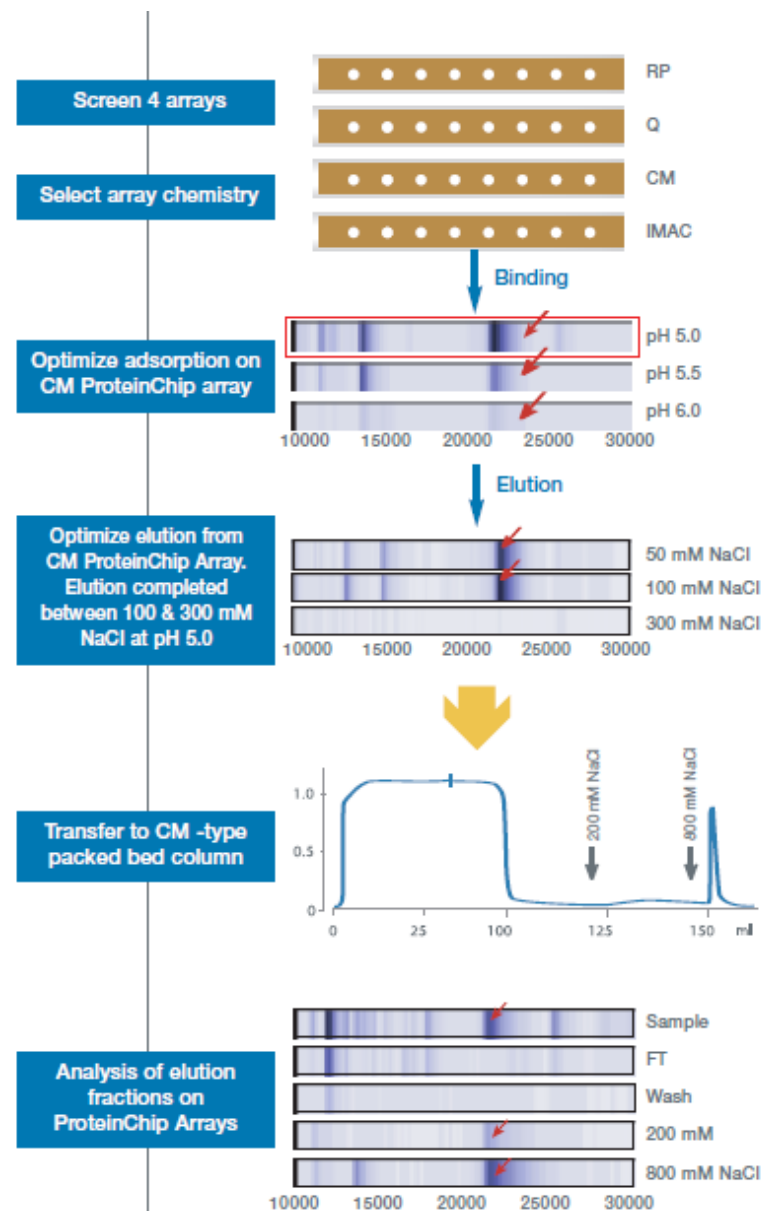


PI.VTU heti 24 000 klónt képes tesztelni mikrobioreaktor + CE rendszerrel



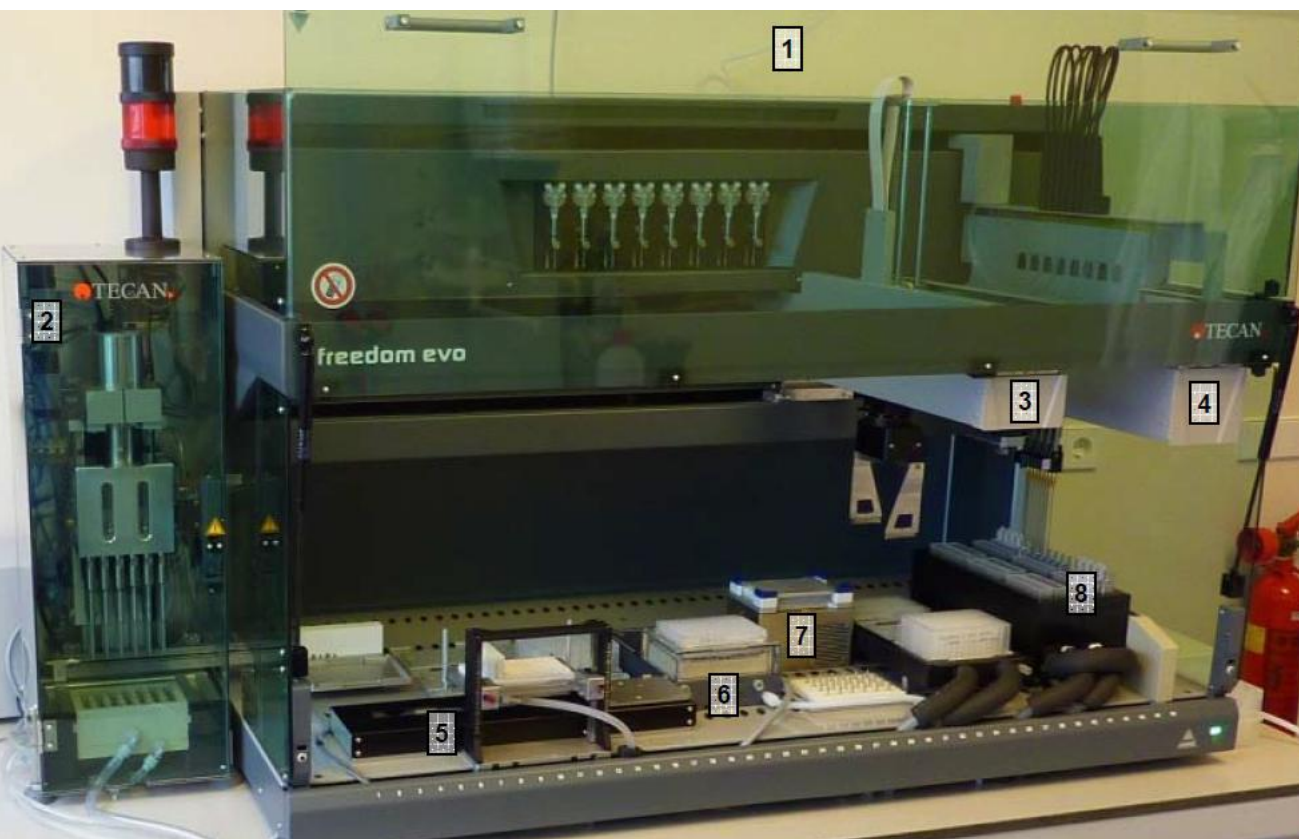
HT rendszerek - downstream

- ▶ HT kromatográfiás optimalizáló rendszerek



HT rendszerek - downstream

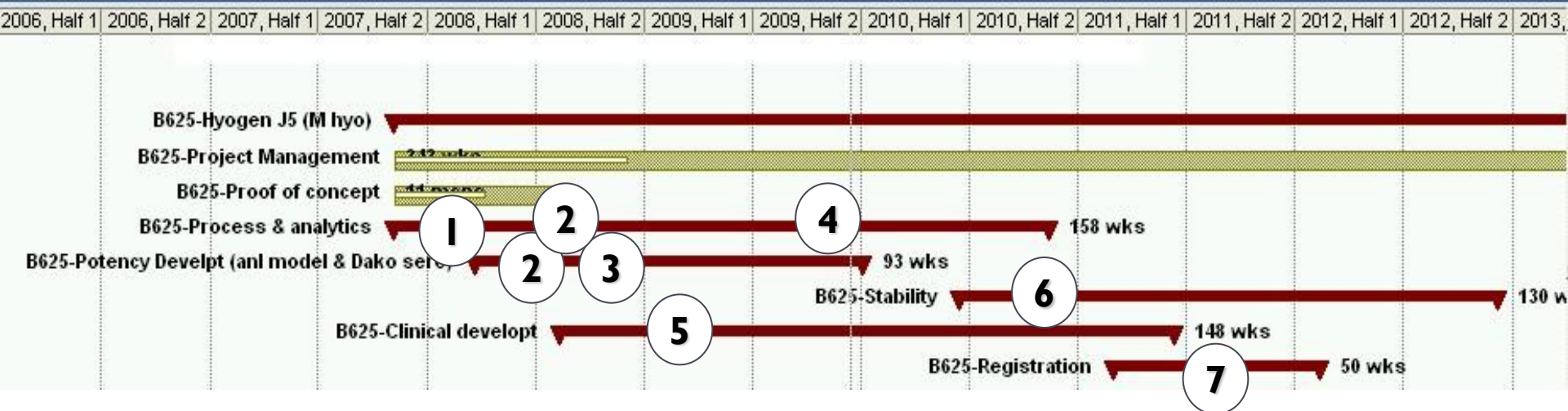
- ▶ HT kromatográfiás optimalizáló rendszerek (akár fehérje kristályosításra is van célrobot)



1. Tecan Freedom EVO® 150 with LIHA8/RoMa
2. 24 fejes ultrahangos dezintegrátor
3. robotkar
4. 8 csatornás folyadékkezelő
5. Kromatográfiás rendszer:
6. Vacuum szeparálás
7. Termosztált rázó
8. Hűtött tárolók
9. Hűtőegység



Monovalens oltóanyag: 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

Bioinformációs szakadék

Bioanalitikai módszerek:
Részletes ok-okozati összefüggések

High Throughput Methods (nagy
hatékonyságú módszerek):
Statisztikai összefüggések



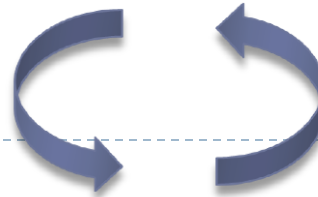
Információ

**Tényleg hatalmas
probléma?**

Termék/Folyamat Fejlesztés

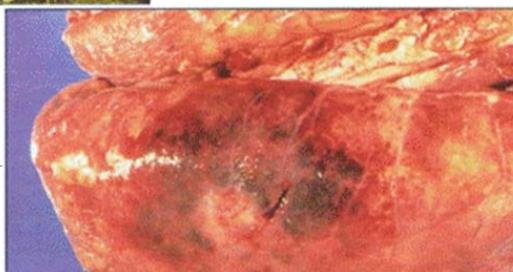
Biológiai termelés

Folyamat közbeni ellenőrzés



1. Példa – *Actinobacillus pleuropneumoniae* vakcina

- ▶ Az állatok halálához vezető tüdőléziókat okoz
- ▶ Eredetileg csak Magyarországon regisztrált termék, biztonsági (safety) és hatékonysági problémákkal
- ▶ 7-900 liter éves eladás
- ▶ Döntés: a regisztráció megújításával párhuzamos technológia javítás és nemzetközi piacra történő bevezetés
- ▶ Probléma: a technológia javítás ideje alatt a biológiai információs bomba telibe találta az *Actinobacillust*



1. Példa – *Actinobacillus pleuropneumoniae* vakcina

2 biovars, 15 szerotípus, 2 altípus

Serotype	1ab, 5ab, 9, 11	2, 4, 6, 7, 8, 12, 15	3
VIRULENCE	HIGH	MODERATE	LOW
Morbidity	severe lung lesions	strong lung lesions	moderate lung lesions
Mortality	high	low	(low epidemiological importance)
Secreted toxin	Apx I + Apx II	Apx II + Apx III or Apx II	Apx III

Szerotípus: szervezetek, mikroorganizmusok, sejtek olyan csoportja, amik a szerológiai teszttel a közös specifikus antigéneik alapján elkülöníthetők

1. Példa – *Actinobacillus pleuropneumoniae* vakcina

▶ Szerotípusok előfordulása

country	előforduló szerotípusok	domináns szerotípusok
Argentina	1, 2, 3, 5, 12	1
Australia	1, 2, 3, 7, 12	1
Belgium	2, 3, 6, 7, 8, 9, 11	3
Brazil	1, 3, 4, 5, 7, 9	5, 3
Canada	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 12	5, 7, 1
Chile	1, 5	1, 5
Croatia	2, 7, 8, 9	2, 9
Czech R.	1, 2, 7	2
Denmark	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12	2
France	2, 3, 7, 8, 9	9
Germany	2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10	9, 2, 7
Hungary	1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12	3, 2, 7
Italy	1, 2, 3, 4, 5, 7	5
Ireland	3	3
Japan	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 12	1, 2
Korea	2, 3, 5, 7	5, 2
Mexico	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9	1, 8
Netherlands	1, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 11	2, 9, 11
Norway	2	2
Poland	1, 2, 5, 9	1, 9
Spain	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12	4, 7, 2
Sweden	2, 3, 4	2
Switzerland	2, 3, 7, 9	2
Taiwan	1, 2, 3, 5	1, 5
UK	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10	2, 3, 8
USA	1, 3, 5, 7, 8, 9	1, 5
Venezuela	1, 2, 3, 4, 6, 7	1

mázli faktor:
a Ceva vakcinában 1 és 2
szerotípus volt

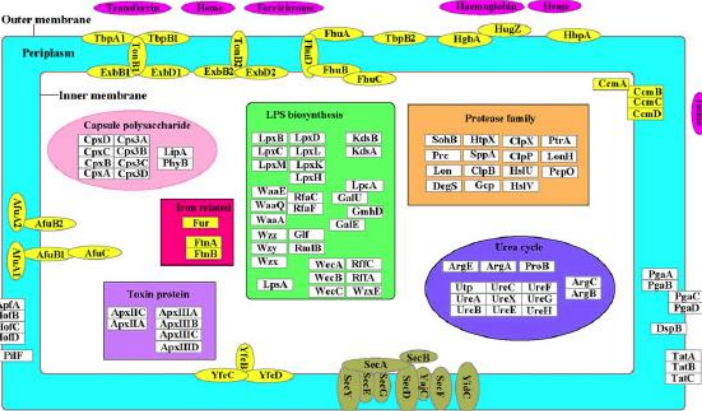
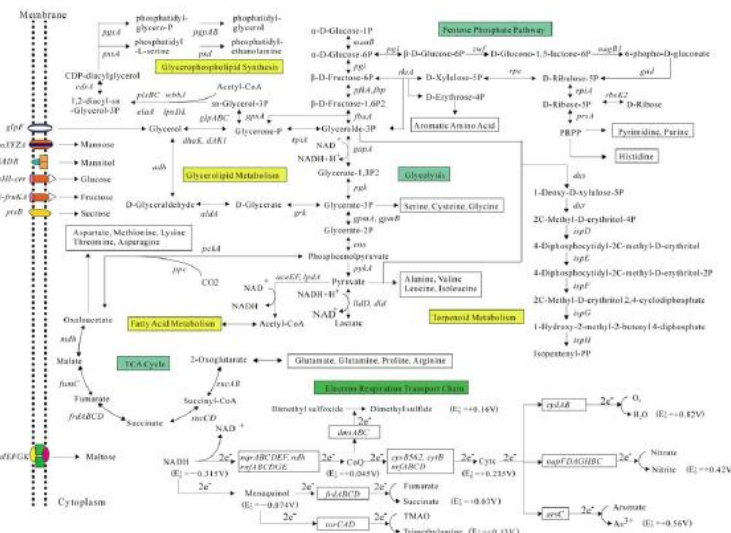
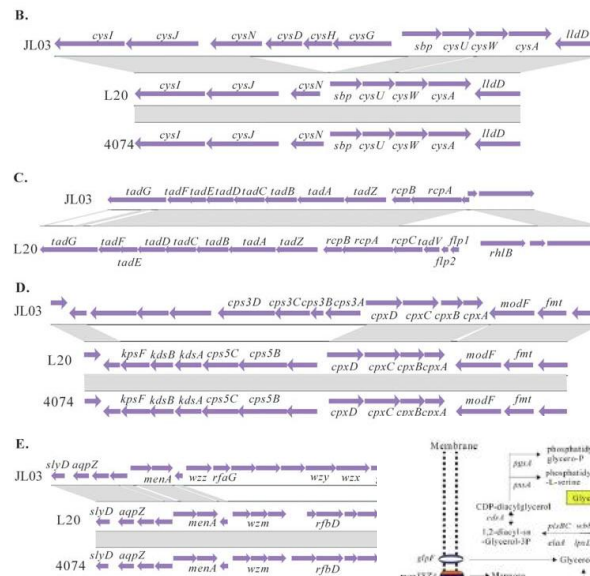
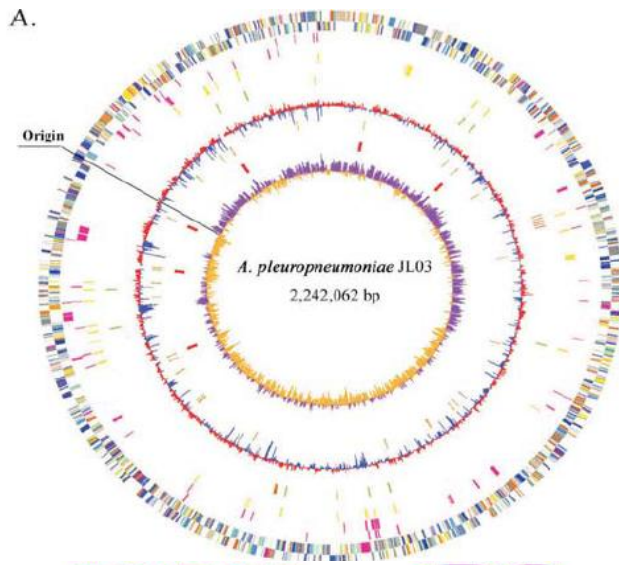
1. Példa – *Actinobacillus pleuropneumoniae* vakcina

- ▶ A védelmet nyújtó faktorokról eleve elég sok információ volt elérhető:

Antigén	Hatékonyság	Vakcina variációk
Apx I, II, III	100 %, de nem akadályozza meg a kolonizációt	detoxifikált; nem aktiválódó; aleggység
Capsular polysaccharide	70 %, szerotípus specifikus	Elölt bakterin, bakteriális ghost, attenuált/burok nélküli élő baktérium, oldatba vitt CS/LPS/OMP
Lipopolysaccharide	30 %, részben szerotípus specifikus	
Külső membránfehérjék	részleges	
+ adjuváns		aluminium-hidroxid, olaj

1. Példa – *Actinobacillus pleuropneumoniae* vakcina

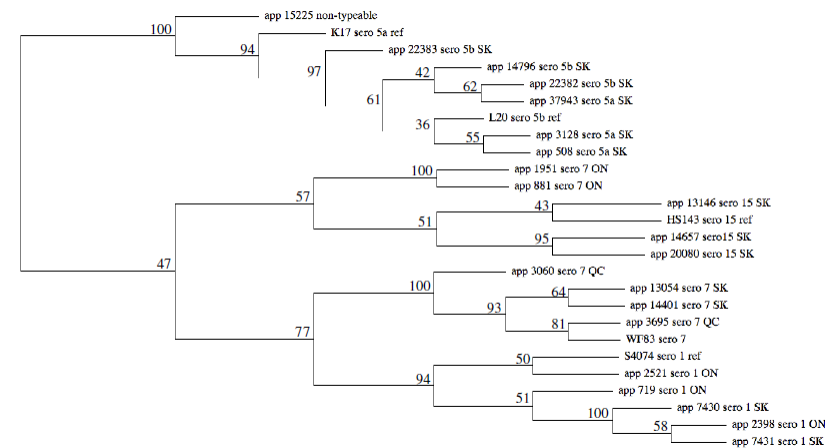
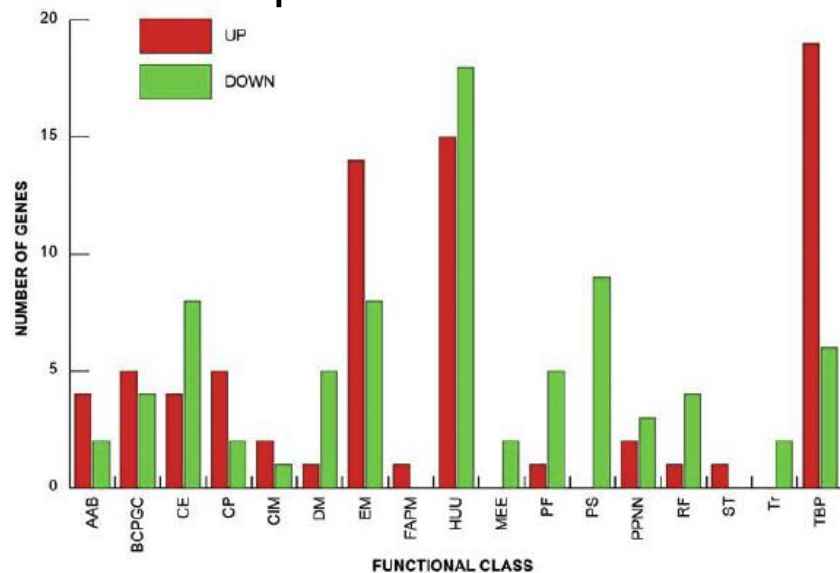
- És akkor a biológiai információs atombomba eltalálta a célt: elérhetővé vált az *Actinobacillus* teljes szekvenciája, transzkriptomja, metabolikus hálózatai



1. Példa – *Actinobacillus pleuropneumoniae* vakcina

Elérhetővé vált továbbá:

- ▶ LC-MS/MS-alapján a külső membrán fehérje készlet in silico becslése
- ▶ Az összes virulencia faktor genom alapján történő azonosítása és funkcionális elemzése
- ▶ Az izolátumok filogenetikai analízise
- ▶ Az A.p. természetes fertőzés közbeni transzkripciós profilja RNS chip alapján



1.Példa – *Actinobacillus pleuropneumoniae* vakcina

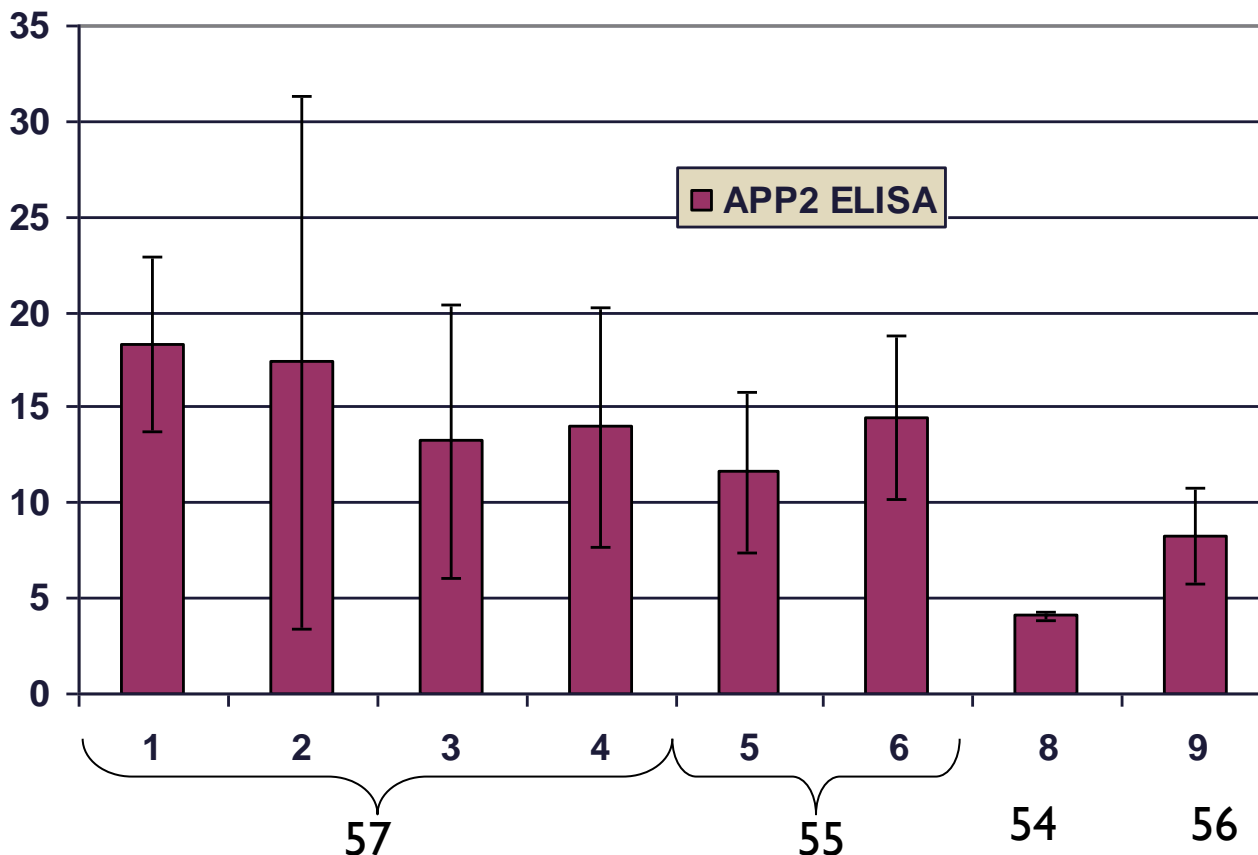
Miközben a hagyományos fejlesztés lassan a végéhez közeledett:

- ▶ Bakterin és toxin ELISA-k, toxin-specifikus citotoxicitási tesztek kerültek kifejlesztésre
- ▶ Törzs szelekció és a vakcinában történő arányuk megváltoztatása történt: produktivitás, minőség és hatékonyság alapján

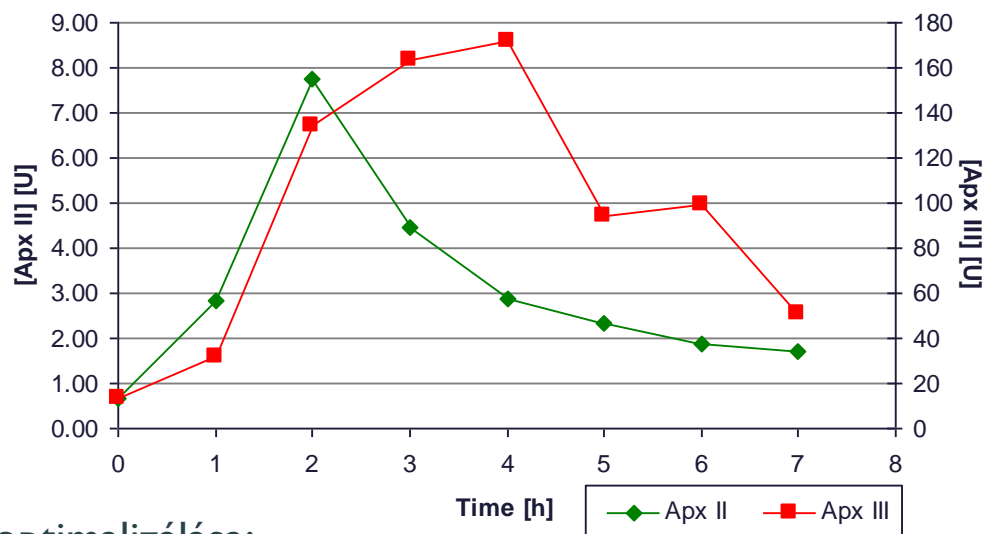
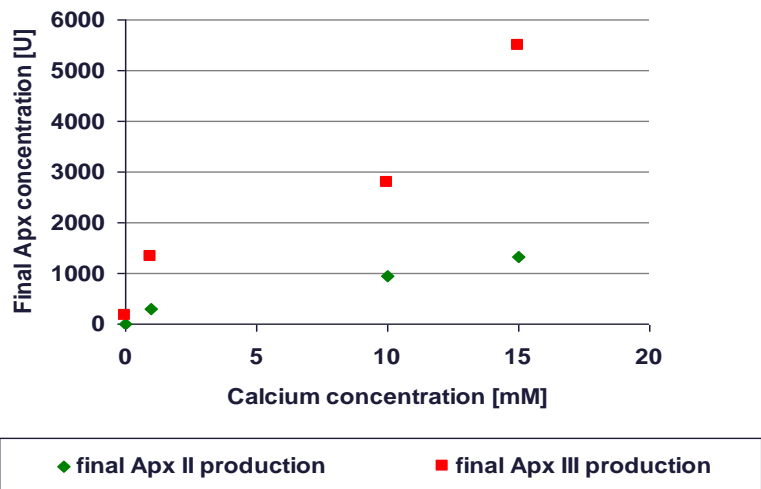
Törzs	54	55	56	57
OD	+	++	-	++
Produktivitás(sejt)	+	+	-	+
Ballaszt fehérjék	1	3	4	2
Szűrhetőség	+	-	~	-
Endotoxin R&D	1	2	5	3
ipari	3	4	2	1
Apx II	4	2	3	1
Apx III	3	1	2	3

1. Példa – *Actinobacillus pleuropneumoniae* vakcina

- ▶ Törzs kiválasztás a bakterin specifikus immunválasz alapján, ELISA-val mérve



1. Példa – *Actinobacillus pleuropneumoniae* vakcina

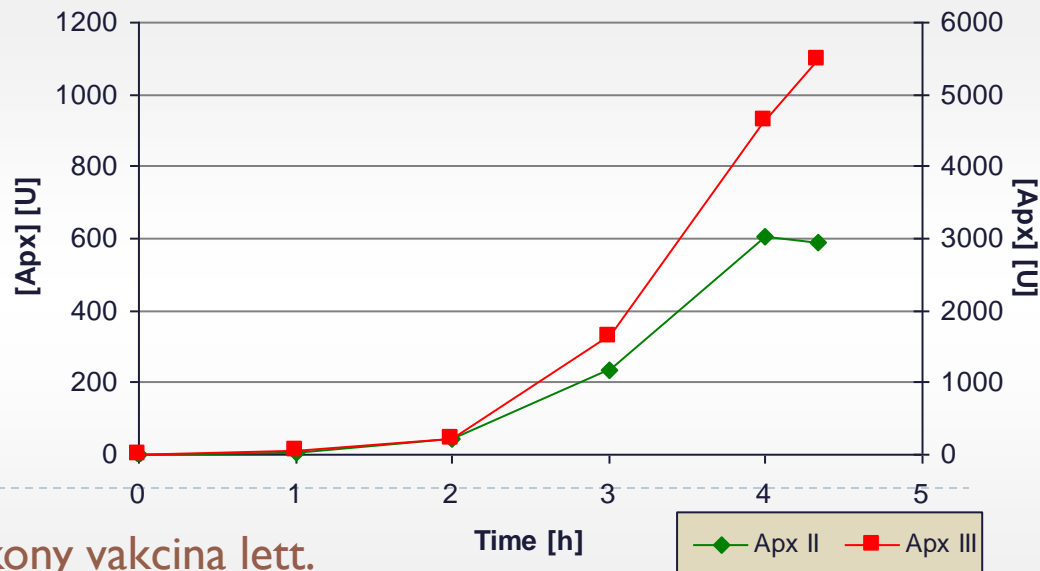


Az Apx termelésre ható faktorok kiválasztása, optimalizálása:

- ▶ Levegőztetés
- ▶ Kalcium koncentráció
- ▶ Szénforrás
- ▶ Foszfát tartalom

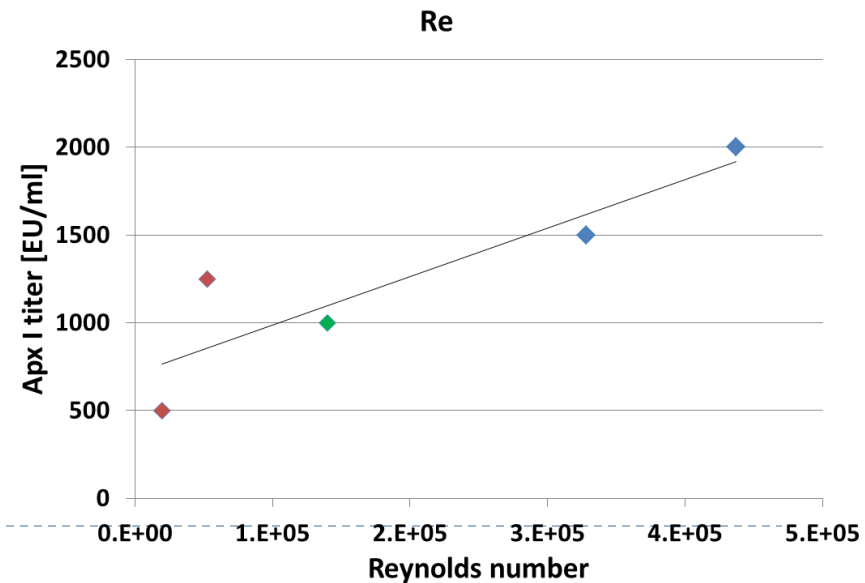
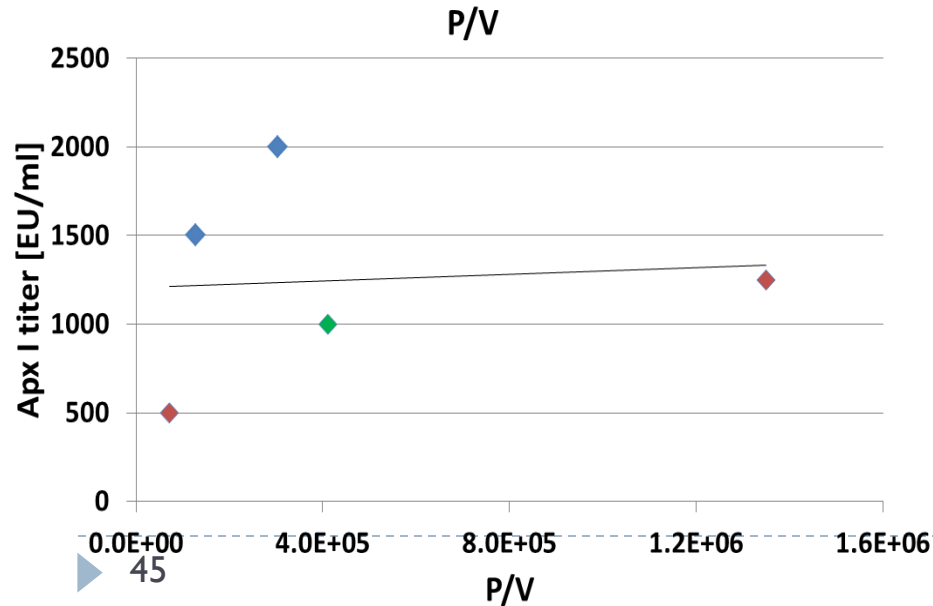
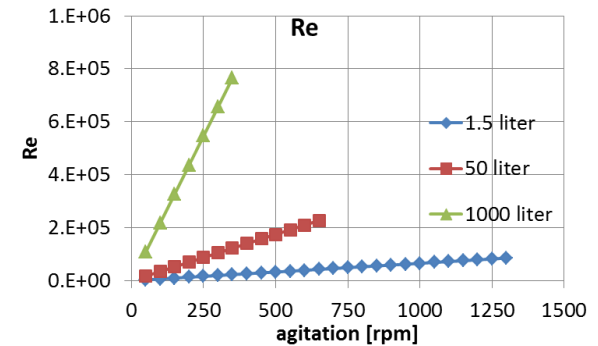
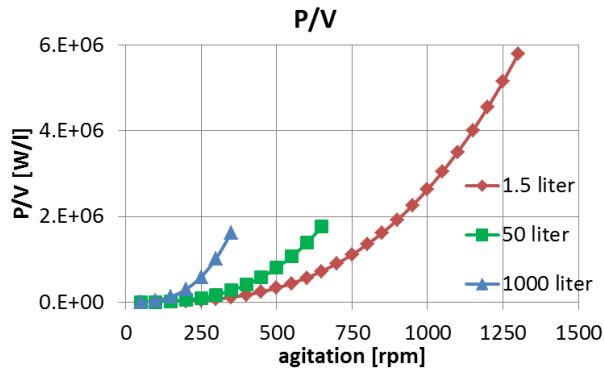
Ami a következőket eredményezte:

- ▶ Apx II: 2-ről 590 EU/ml-re nőtt
- ▶ Apx III: 5 l-ről 5480 EU/ml-re nőtt
- ▶ Stabil titerek, stabil antigének
- ▶ Szabályozott endotoxin szint



1. Példa – *Actinobacillus pleuropneumoniae* vakcina

- ▶ Méretnövelés: 1.5 > 50 > 1000 liter – A keverés volt a kulcs a stabil Apx termeléshez: a keverési Reynolds szám befolyásolja az elérhető Apx koncentrációt

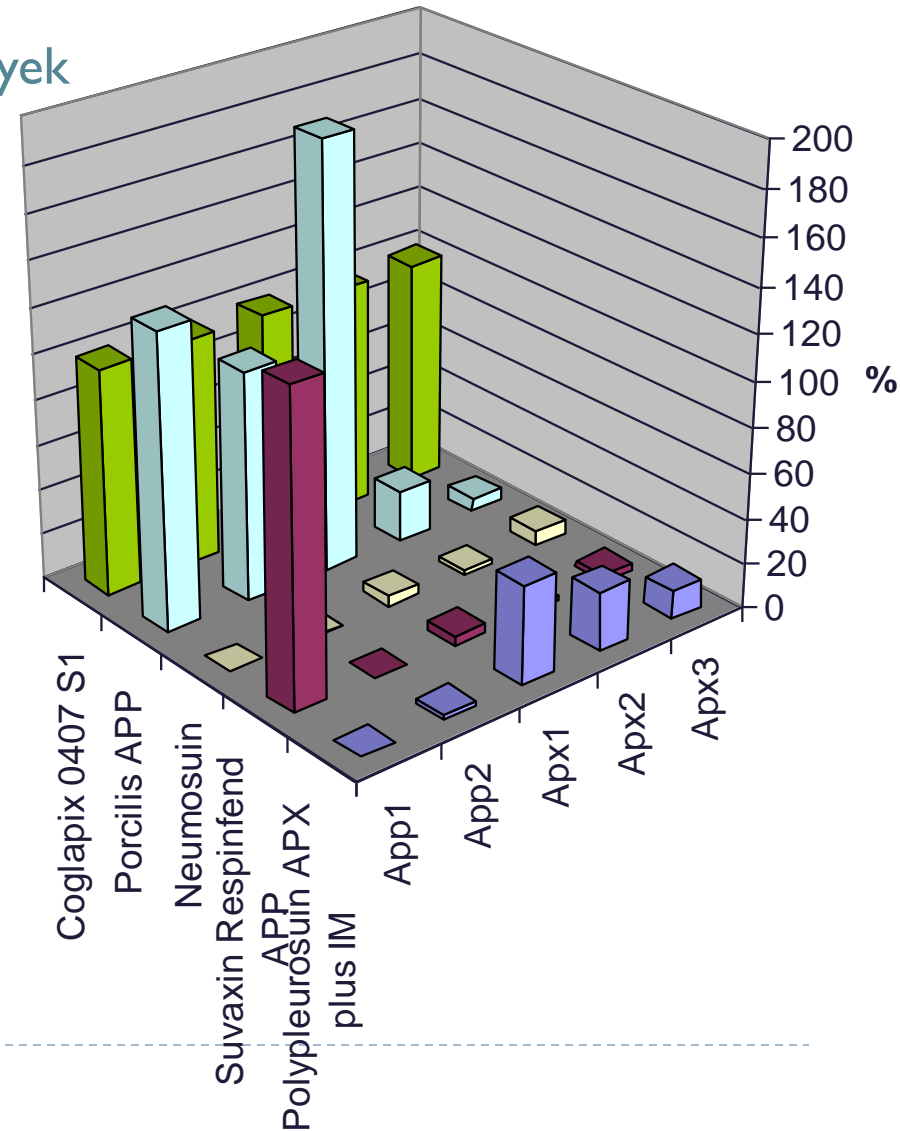


1. Példa – *Actinobacillus pleuropneumoniae* vakcina

Szerológiai eredmények

Eredmények:

- ▶ kiegyenlített antigén tartalmú, biztonságos, hatékony oltóanyag
- ▶ Az éves eladás 700 literről 35 000 literre nőtt 2012-re
- ▶ ~ a világ 2. legnépszerűbb *Actinobacillus pleuropneumoniae* vakcinája



2. 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

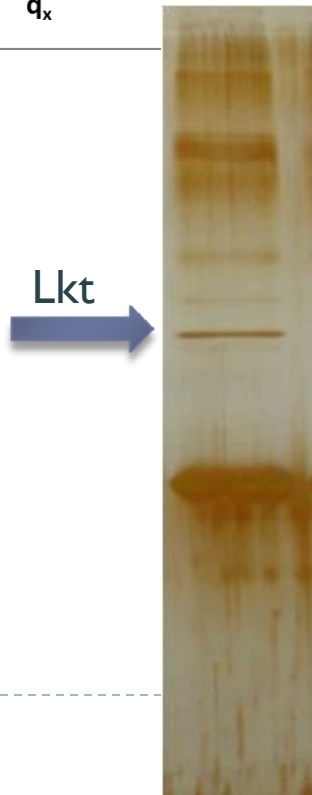
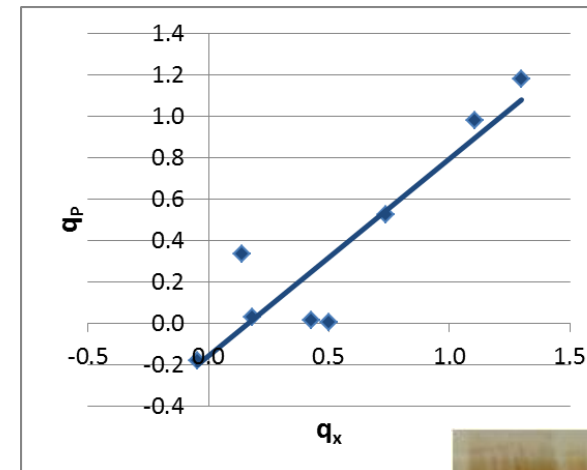
- ▶A *Mannheimia* által szekretált leukotoxin a leukociták $\beta 2$ integrin receptorához kötve pórusokat hoz létre a membránon, ezáltal elpusztítva azokat és segítve a baktériumok megtelepedését.
- ▶A Ceva klasszikus statisztikai alapú optimalizálást végzett

2. Példa - *Mannheimia haemolytica* – tápoldat összetétel optimalizálás



2. Példa - *Mannheimia haemolytica* - előkísérletek

- ▶ A Lkt képződés alapvetően **növekedéshez kapcsol**
- ▶ **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)

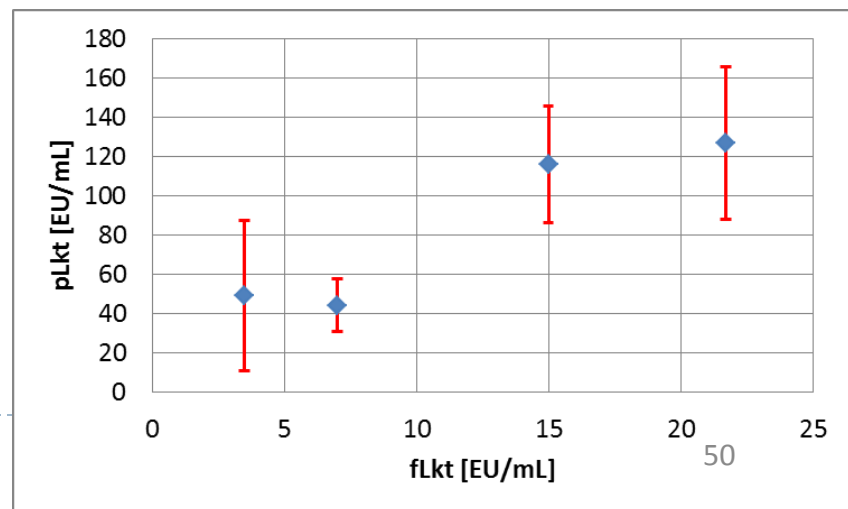
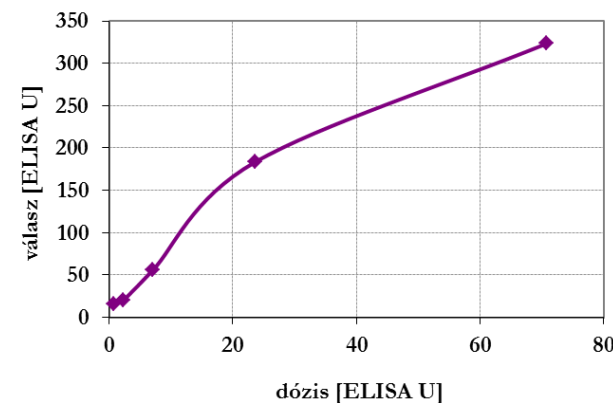


2. Példa - Mannheimia haemolytica

- ▶ Állat szerológia vizsgálatok labor és célállatban, monovalens és polivalens oltóanyagokkal megtörténtek, jó dózis-választ eredményezve.
- ▶ A challenge (direkt ráfertőzés célállaton) 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

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

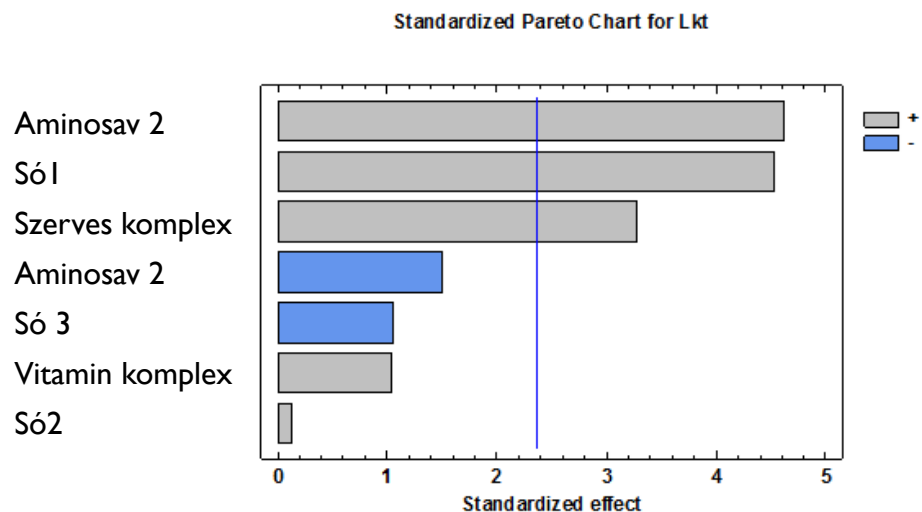
Leukotoxin dózis-válasz nyúlban



2. Példa - Mannheimia haemolytica

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

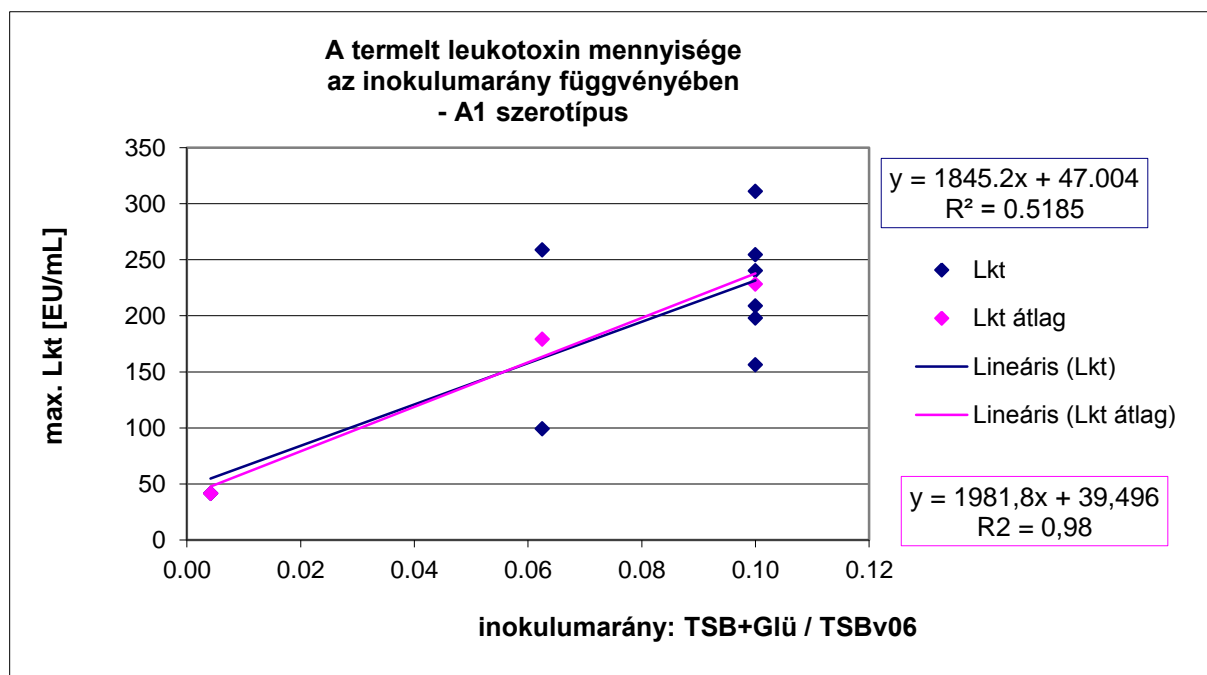
	mL							
	PB1	PB2	PB3	PB4	PB5	PB5	PB7	PB8
Aminosav 1	0	1	0	1	0	1	0	1
Aminosav 2	0	0	1	1	0	0	1	1
Só 1	0	0	0	0	1	1	1	1
Só 2	1	0	0	1	1	1	0	1
Só 3	1	0	1	0	0	1	0	1
Szerves komplex	1	1	0	0	0	0	1	1
Vitamin komplex	0	1	1	0	1	0	0	1
10 x alap	1	1	1	1	1	1	1	1
dH2O	37.5	37	37	32.5	37	30	32.5	22



- 1,5 literes fermentorra méretnövelve az értékek abszolút értékben nem egyeztek, de **259 EU/ml max titer**t sikerült elérni, és mind A1 és A2 törzs esetében 200 EU/ml fölött tartani.
- Probléma: 60 L-re növelve a titer jelentősen csökkent. (2,58; 7,83; 9,17 EU/mL) – összefügg-e az inokulum aránnyal?

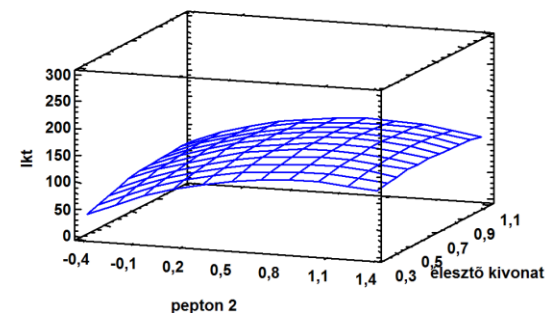
2. Példa - *Mannheimia haemolytica*

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



2. Példa - Mannheimia haemolytica

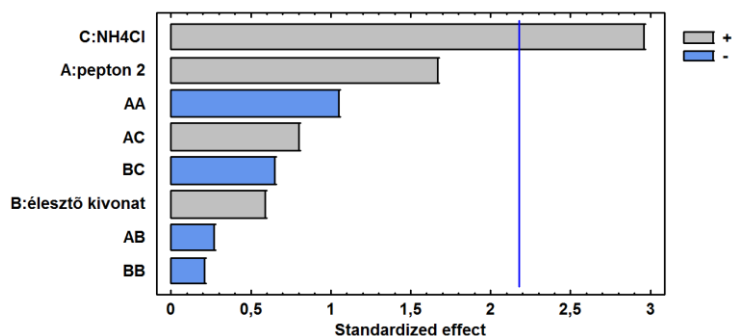
Estimated Response Surface
NH4Cl=1,8225



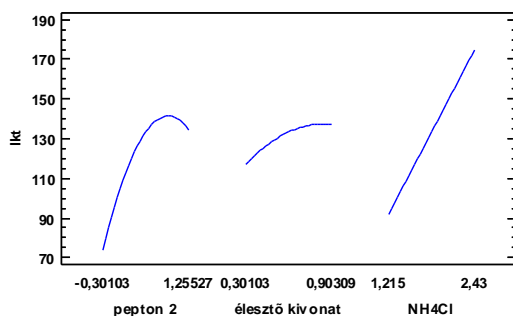
Faktoriális terv1

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

Standardized Pareto Chart for lkt




Main Effects Plot for lkt



faktorok	1.	2.	3.	egyéb összetevők	mért értékek	
szintek	3 (log)	3 (log)	2		OD	Lkt (ELISA)
Tápanyag	Pepton 2	Élesztő kivonat	NH4Cl	CaCl ₂ , MgCl ₂ , NaCl, glükóz, cisztein-HCl	OD	Lkt (ELISA)
1	alacsony	alacsony	alacsony	konstans	5,5	27,5
2	alacsony	alacsony	magas	konstans	6	25
3	alacsony	közepes	alacsony	konstans	8,9	45,8
4	alacsony	közepes	magas	konstans	8,8	79,8
5	alacsony	magas	alacsony	konstans	16,9	196,4
6	alacsony	magas	magas	konstans	9,8	91,2
7	közepes	alacsony	alacsony	konstans	8,5	56,9
8	közepes	alacsony	magas	konstans	9	58,5
9	közepes	közepes	alacsony	konstans	15,1	122,6
10	közepes	közepes	magas	konstans	10,5	43,9
11	közepes	magas	alacsony	konstans	19,3	296,8
12	közepes	magas	magas	konstans	18,8	184,5
13	magas	alacsony	alacsony	konstans	7,3	64,1
14	magas	alacsony	magas	konstans	15,5	135,5
15	magas	közepes	alacsony	konstans	21,2	148,1
16	magas	közepes	magas	konstans	20,6	145,3
17	magas	magas	alacsony	konstans	21,9	182,6
18	magas	magas	magas	konstans	21,6	190,8
2 ism	alacsony	alacsony	magas	konstans	5,8	27,7
8 ism	közepes	alacsony	magas	konstans	9,3	57
14 ism	magas	alacsony	magas	konstans	15,3	143,2
médium 6	nincs	közepes	magas	konstans	8,6	58,3

2. Példa - *Mannheimia haemolytica*

előkísérletek	0,5>3,5 EU/mL	 <p>1000-szeres leukotoxin titer növekedés</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

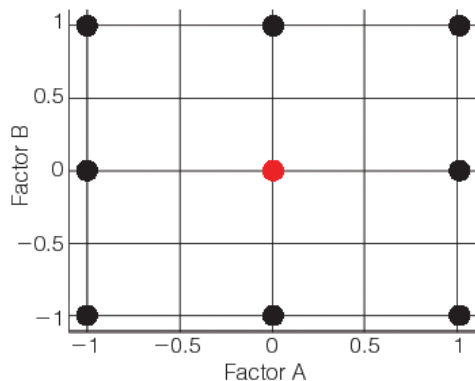


Figure 3: Central composite design for two factors (N = 9).

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

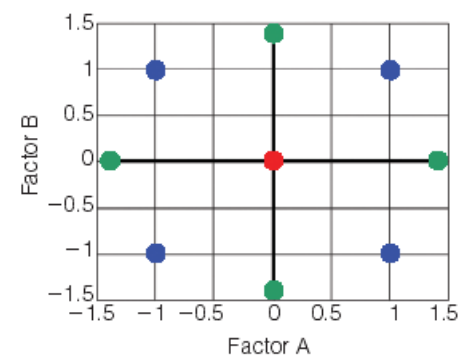
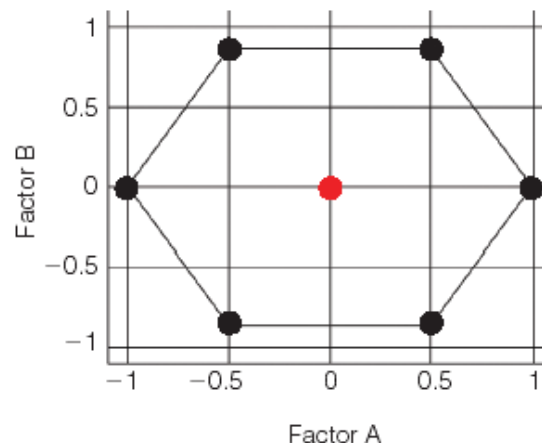


Figure 5: Doehlert design for two factors (N = 7).

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



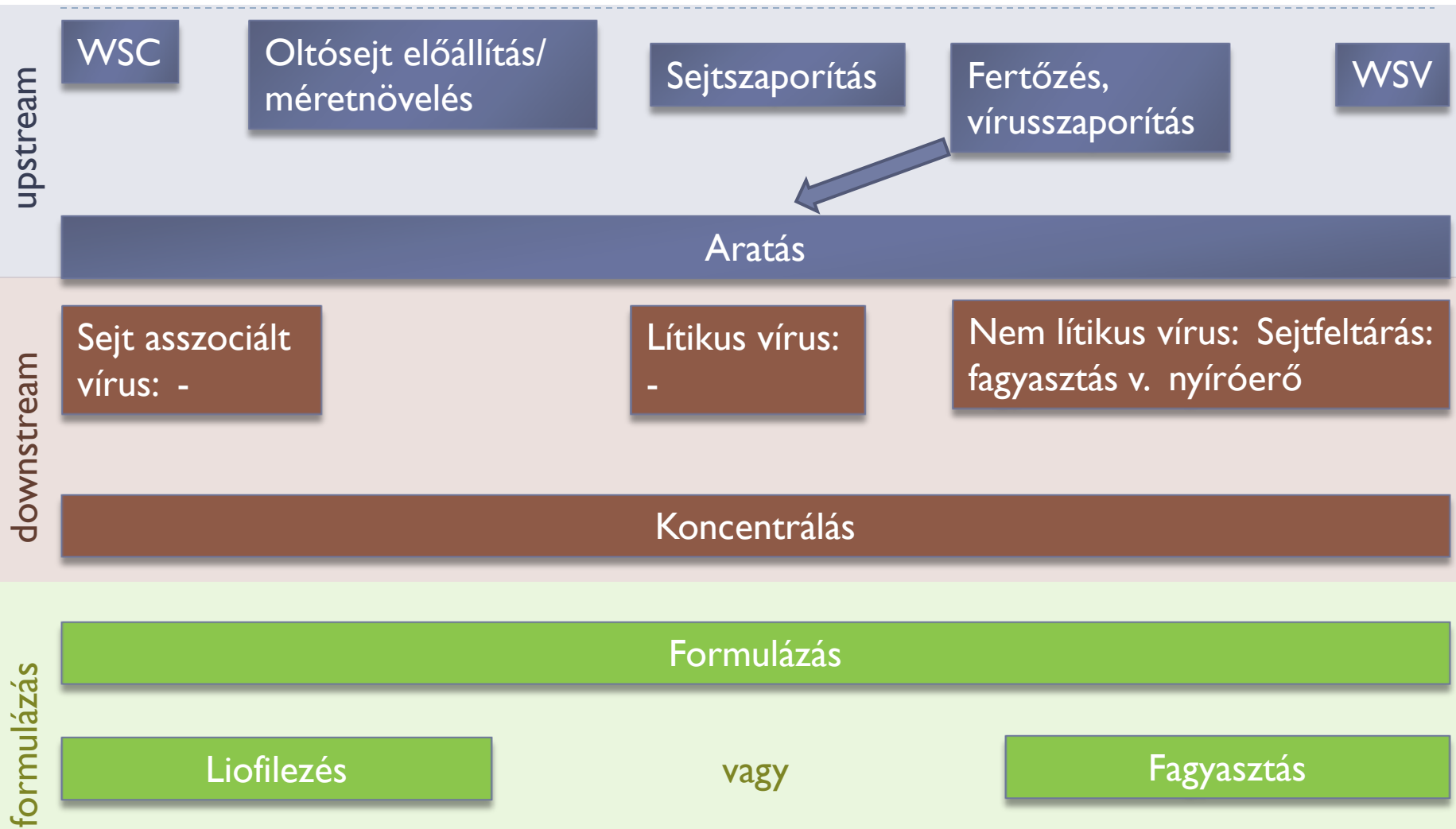
A Doehlert mátrix

- ▶ Hatékonyabb (kevesebb kísérleti beállítás szükséges). Csak software kell hozzá.

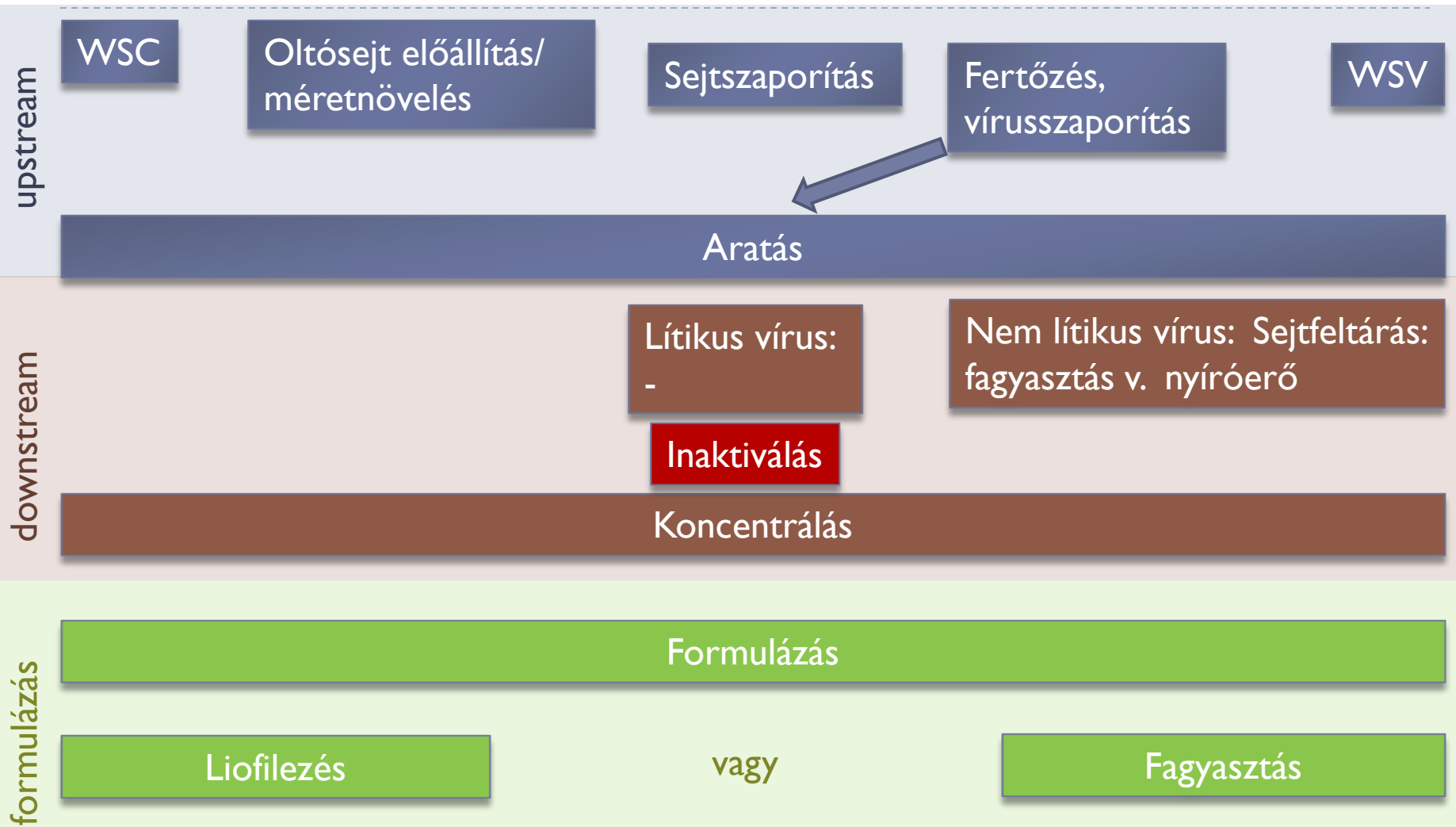
Comparison of efficiency of central composite design (CCD), Box–Behnken design (BBD) and Doehlert design (DM)

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

Élő állati vírusvakcina előállítása

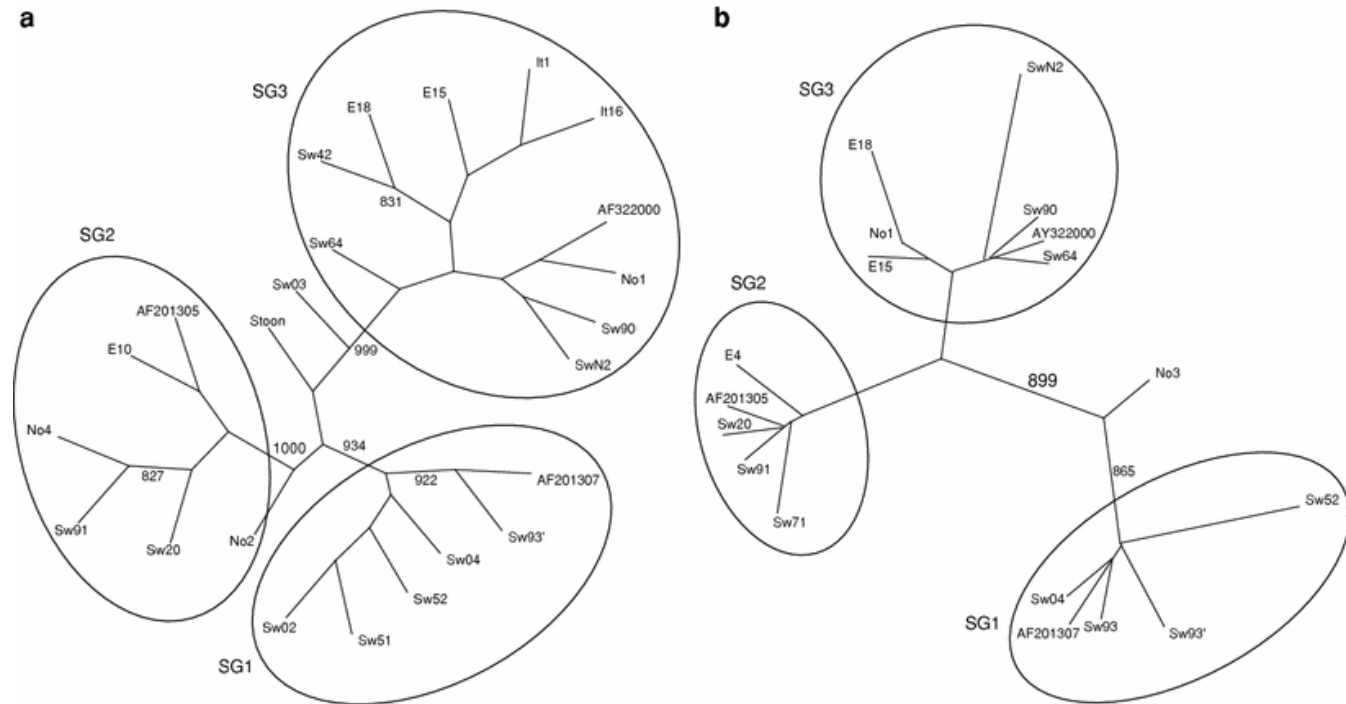


Elölt állati vírusvakcina előállítás



3. Példa – Vírus upstream technológia optimalizálása

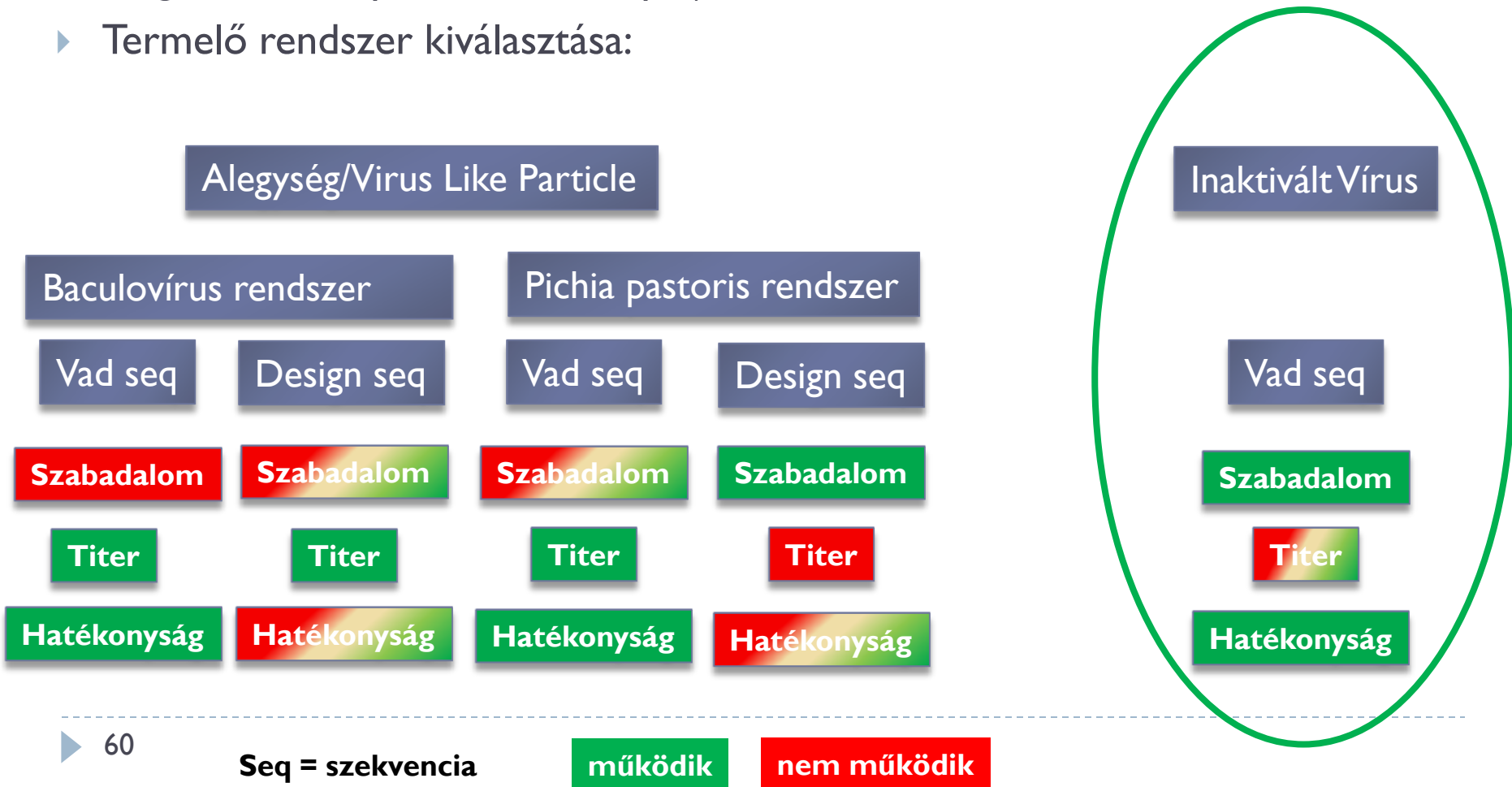
- ▶ Nem lítikus emlős vírus a fejlesztés korai fázisában
- ▶ Kifejlesztett analitikai eszközök:
 - ▶ Vírus titrálás, ELISA, RT-PCR, IFA, sejtszámlálás stb
- ▶ Kiértékelt faktorok:
 - ▶ Vírus törzs (geográfailag különböző izolátumok szekvencia analízisén és filogenetikusan kapcsolatokon alapul)



3. Példa – Vírus upstream technológia optimalizálása

▶ Kiértékelt faktorok:

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



3. Példa – Vírus upstream technológia optimalizálása

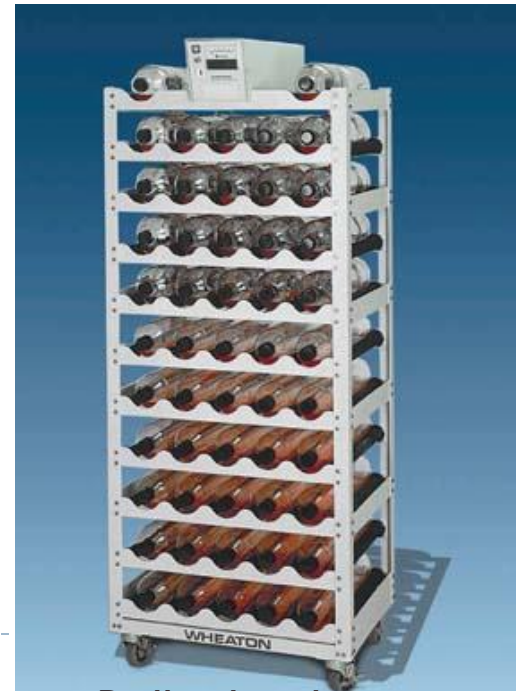
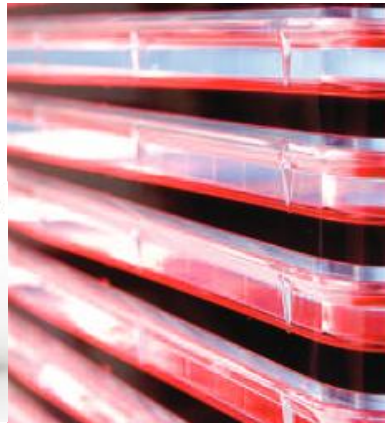
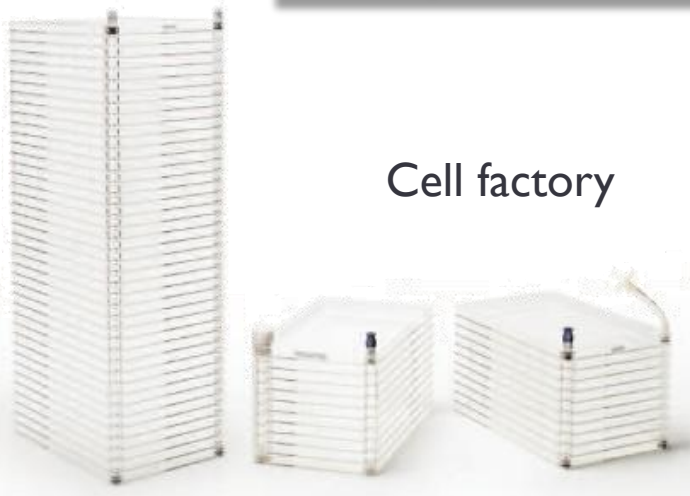
▶ Kiértékelt faktorok:

- ▶ 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 saját sejtvonal)
- ▶ Termelő eszközök:

WSC

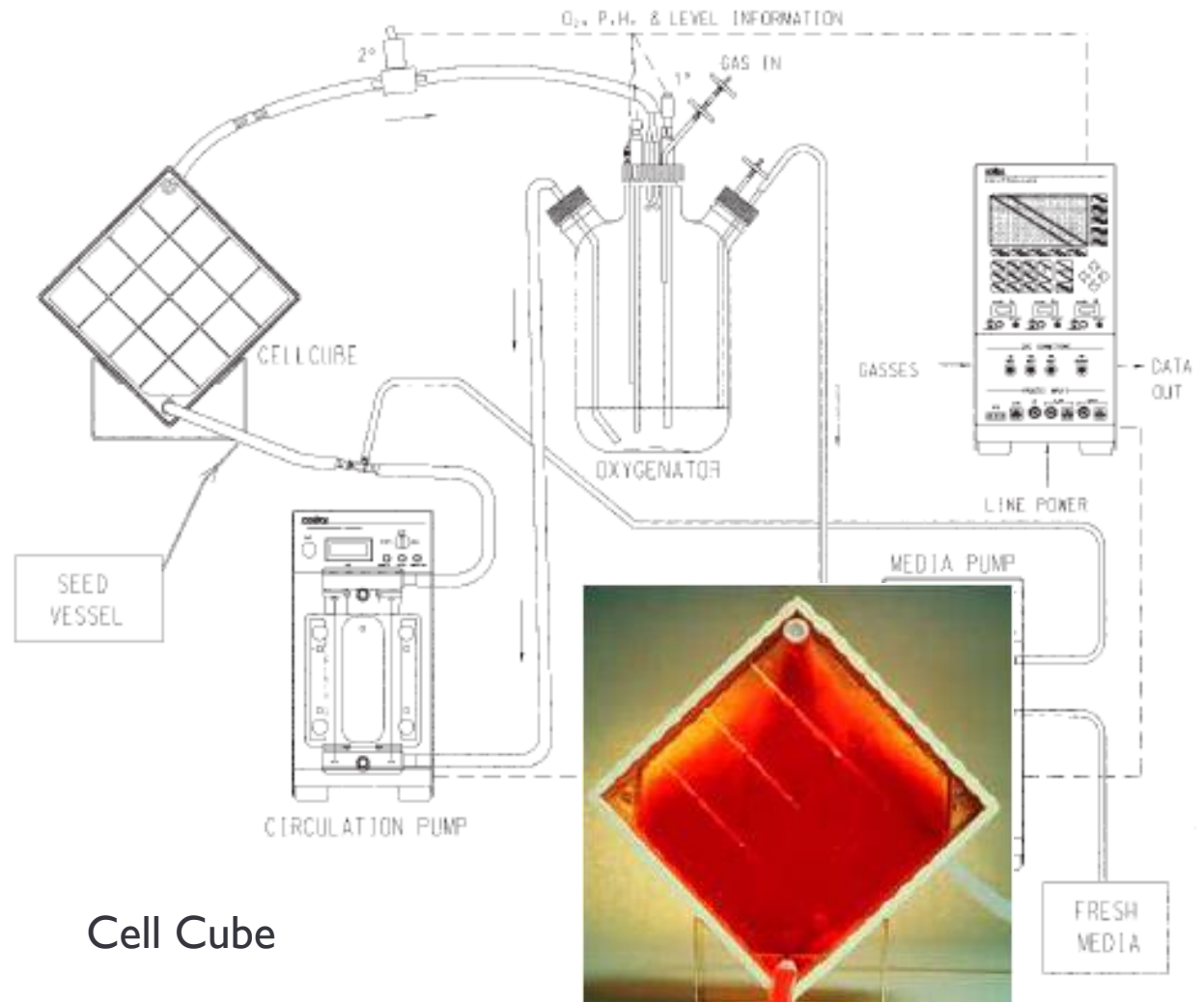
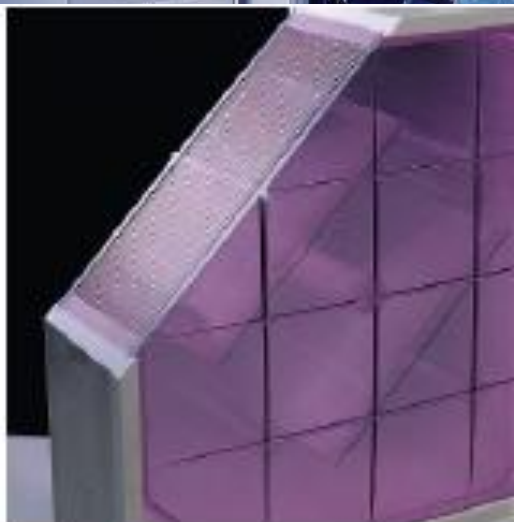
Oltósejt előállítás: roller bottle/cell factory/cell cube

Cell factory



Roller bottles

3. Példa – Vírus upstream technológia optimalizálása



Cell Cube

3. Példa – Vírus upstream technológia optimalizálása

- ▶ Nem lítikus emlős vírus a fejlesztés korai fázisában

WSC

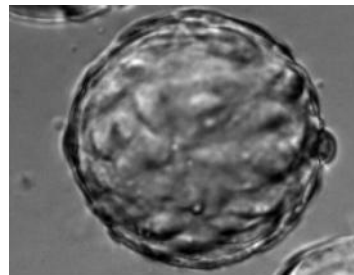
Oltósejt előállítás: roller bottle/cell factory/cell cube

Sejt leoltása hordozóra: fixed bed/microcarrier

iCellis Nano



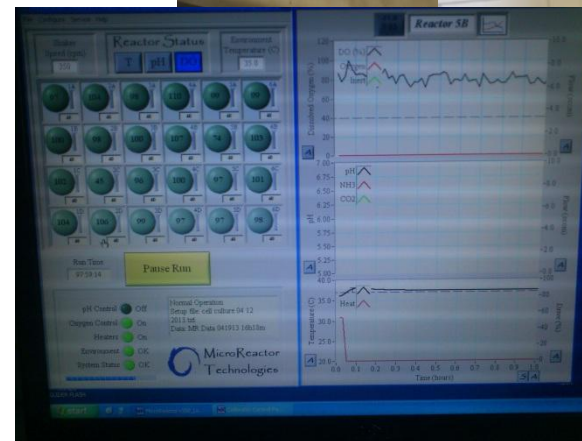
Cytodex 3 microcarrier



3. Példa – Vírus upstream technológia optimalizálása

Kiértékelt faktorok:

- ▶ Microcarrier koncentráció (1-5 g/l)
- ▶ Oltósejt koncentráció
- ▶ Vírus/sejt arány (MOI), fertőzés és aratás ideje
- ▶ Tápoldat fajtája, kiegészítő komponensei:
 - Alap tápoldat
 - Glükóz koncentráció
 - Lipidek
 - Szérum koncentráció, típus, gyártó
 - Glutamin típus (Glutamax), koncentráció
 - Habzásgátló stb.



mikrobioreaktor



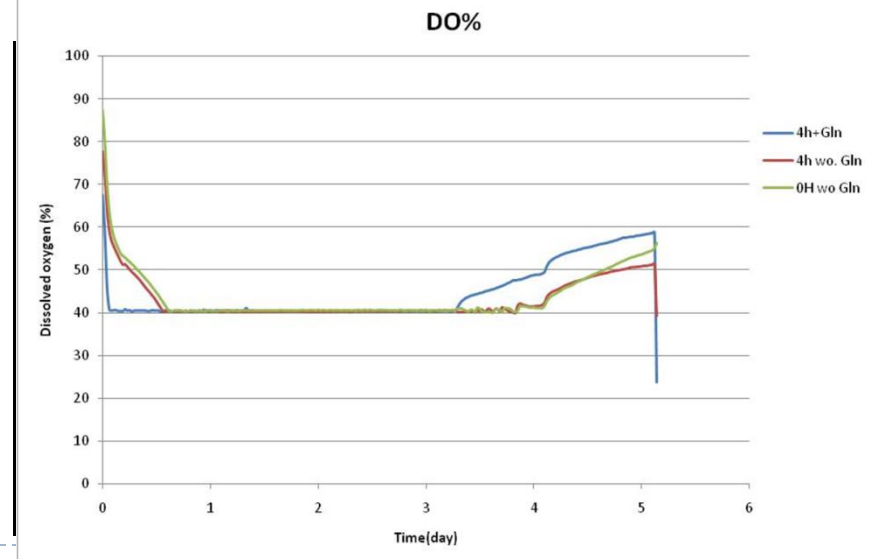
metabolit analízátor

3.Példa – Vírus upstream technológia optimalizálása

	4h fertőzés, +Gln						4h fertőzés; no GLN				0h fertőzés; no GLN			
	Glc (mmol/l)	Gln (mmol/l)	Glu (mmol/l)	Lac (mmol/l)	NH ₃ (umol/l)	Titer (EU/ml)	Glc (mmol/l)	Lac (mmol/l)	NH ₃ (umol/l)	Titer (EU/ml)	Glc (mmol/l)	Lac (mmol/l)	NH ₃ (umol/l)	Titer (EU/ml)
D0	18.87		0.44	0.77	140		18.87	0.77	140		18.87	0.77	140	
D1	18.97	2.05	0.42	5.35	662	9	14.79	5.85	184	25	18.24	7.76	182	50
D2	11.27	1.39	0.25	10.1	904	533	9.66	12.45	262	1355	9.48	12.72	243	1252
D3	8.24			12.73	1194	1140	5.63	13.02	326	2305	7.64	16.2	334	2812
D4	7.25	1.04	0.21	13.99	1191	1174	4.4	12.87	346	2950	4.47	12.98	349	2777
D5	7.76	1.15	0.33	17.94	1479	1048	6.11	19.23	488	2297	6.04	19.27	496	2095

► Fő észrevételek:

1. Szérum szint 1 %-ra vihető
2. Extra glutamin káros
3. Koinfekció nem zavarja a sejtek kötődését
4. Megfelelő DO szabályzás javítja a titert
5. Keverés lényeges



3. Példa – Vírus upstream technológia optimalizálása – Kolmogorov modell

Példa egy bioreaktor gyártó specifikációkra vonatkozó kérdőívéből:

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		

A keverő kerületi sebessége, térfogati energia bevitel mellett a Kolmogorov modellel is lehet a keverést méretnövelni.

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 várhatóan 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 megengedhető fordulatszámát.

3. 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)

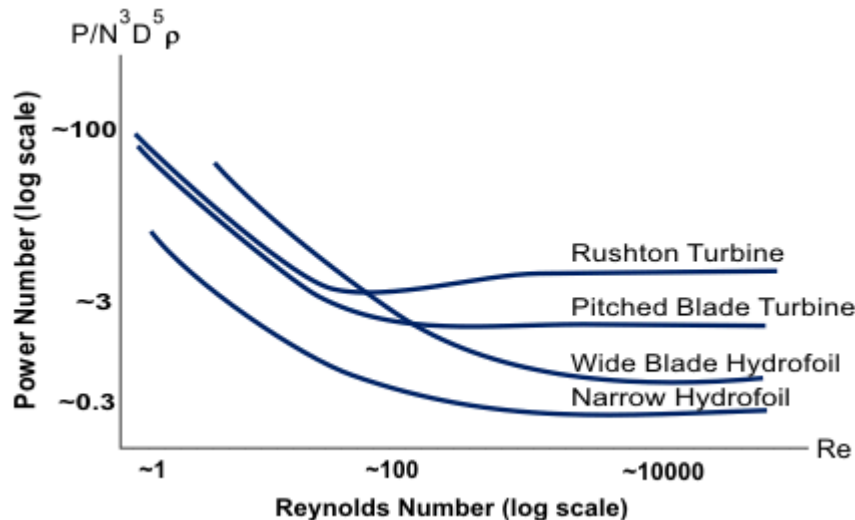
$$P_m = v^3 / \lambda^4 \quad (\text{Kolmogorov elméletből}) \quad v: \text{kinematikai viszkozitás} = \mu/\rho$$

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)



3. Példa – Vírus upstream technológia optimalizálása – Kolmogorov modell

	micrometer	in SI units	
Cytodex 3 bead diameter (D)	175	1.75E-04	m
Kolmogorov scale limit ($=2/3 * D$)		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.

3. Példa – Vírus downstream technológia optimalizálása

- ▶ Nem lítikus emlős vírus a fejlesztés korai fázisában

WSC

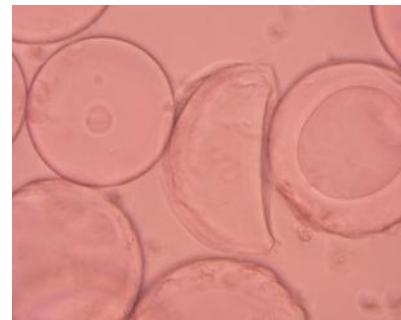
Oltósejt előállítás: roller bottle/cell factory/cell cube

Sejt leoltása hordozóra: fixed bed/microcarrier

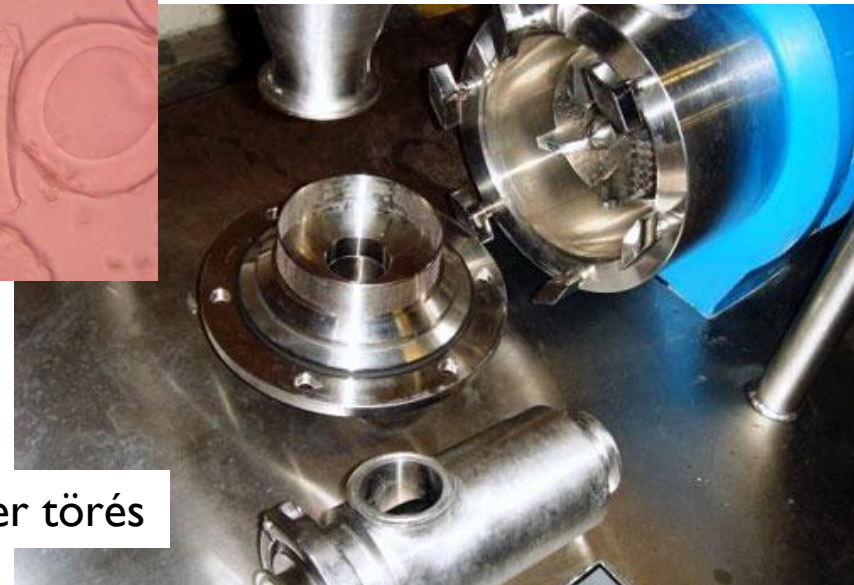
Nem lítikus vírus: Sejtfeltárás:
fagyasztás vagy **nyíróerő**



Nyíróerő: Silverson homogenizáló



Probléma: microcarrier törés

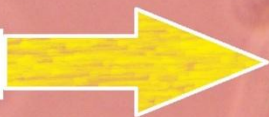




Magnification: 5 x

200 μm

Fraction of a bead



Cells still attached



3.Példa – Vírus downstream 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**

Nem lítikus vírus: Sejtfeltárás:
fagyasztás v. **nyíróerő**

Microcarrier eltávolítás

Egyszer használatos zsák

Fémszűrő



Probléma 20-50% veszteség: nem feltárt és hordozón maradó sejtek miatt

Köszönöm a figyelmet!

Kérdések

1. Mikor használnak emberek ill. állatok esetén oltóanyagokat? Milyen típusú oltóanyagokat ismer?
2. Mik az oltóanyagok fő jellemzői (amiket vizsgálnak a regisztrációs eljárás során)?
3. Mutassa be 2 faktor 3 szintű teljes faktoriális kísérleti tervét, és a 2 faktorra másodfokú modellt adó Doehlert mátrixot. Miért kedvezőbb a Doehlert mátrix használata?
4. Mi a különbség az Omics és a High Throughput megközelítés között? Mire lehet őket felhasználni? Mondjon példákat is.
5. Ismertesse a Kolgomorov modellt. Mikor érdemes használni?

