

Ewa Augustynowicz

WYBRANE ELEMENTY PROCESU WYTWARZANIA SZCZEPIONEK PRZECIW GRYPIE

SELECTED PROBLEMS OF MANUFACTURING INFLUENZA VACCINES

Zakład Badania Surowic i Szczepionek, Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego- Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie

STRESZCZENIE

W pracy przedstawiono wybrane elementy związane z procesem wytwarzania szczepionek przeciw grypie, które mogą przyczynić się do usprawnienia oraz zwiększenia jego wydajności. Nowe kierunki w procesach opracowania bezpiecznych i skutecznych szczepionek przeciw grypie dotyczą: wprowadzania nowych adjuwantów umożliwiających obniżenie zawartości antygenów przy niezmięnionej immunogenności szczepionki, opracowanie alternatywnych dróg podania szczepionki, zastosowanie nowych podjednostek struktury wirusa, w tym DNA, nowych sposobów namnażania wirusa oraz opracowanie żywych szczepionek.

Słowa kluczowe: *wirus grypy, szczepionka przeciw grypie, reasortacja, adjuwant*

ABSTRACT

In the study chosen issues of manufacturing influenza vaccines running to increase effectiveness were performed. New concepts into development of process of safety and efficacy influenza vaccines are connected with use a new adjuvants, use of alternative routes of administration of vaccine, new structural virus subunits including DNA, new way of virus culture and use of live, attenuated vaccines.

Key words: *influenza strain, influenza vaccine, reasortation, adjuvant*

WSTĘP

Zachorowania na grypę stanowią duży problem zdrowotny na całym świecie. Zgodnie z danymi Światowej Organizacji Zdrowia (ŚOZ) co roku na grypę i zakażenia grypopodobne choruje od 330 milionów do 1 575 miliarda ludzi, a od 500 000 do 1 000 000 umiera (1). W Polsce, w zależności od sezonu epidemicznego od września do kwietnia, rejestruje się od kilkuset tysięcy do kilku milionów zachorowań na grypę i zakażenia grypopodobne (2).

Najskuteczniejszym i najtańszym sposobem zapobiegania zachorowaniom na grypę oraz powikłaniom pogrypowym jest szczepienie. W krajach członkowskich Unii Europejskiej (EU) opracowane są strategie mające na celu zwiększenie zasięgu szczepień przeciw grypie sezonowej w populacjach obciążonych dużym ryzykiem wystąpienia zachorowań na grypę oraz ryzykiem wystąpienia powikłań tj. osób w wieku podeszłym i osób z chorobami przewlekłymi. Za szczególnie istotne uznano uzyskanie odsetka zaszczepionych osób starszych na poziomie $\geq 70\%$ (3). Polska wciąż należy do krajów o najniższym odsetku osób zaszczepionych przeciw grypie. W sezonie 2006-2007 oraz 2007-2008

przeciw grypie zaszczepiono odpowiednio poniżej 10% i 13,9% osób starszych (3). Jednym z czynników wpływających na mały zasięg szczepień przeciw grypie może być niedostateczna informacja w środowiskach lekarzy o jakości szczepionek przeciw grypie sezonowej.

Każdego roku na całym świecie wzrasta zapotrzebowanie na szczepionki przeciw grypie. Wymaga to od producentów zwiększania produkcji i dostarczania odpowiedniej liczby dawek skutecznej i bezpiecznej szczepionki w określonym czasie. Powoduje to określone problemy technologiczne z zakresu kontroli zanieczyszczeń biologicznych (4).

Na przestrzeni ostatnich 10 lat obserwowano ogromny postęp w opracowaniu nowych technologii w procesie wytwarzania szczepionek przeciw grypie sezonowej. Sprzyjają temu połączone starania przemysłu, przedstawicieli nauki, opiniotwórczych instytucji zdrowia publicznego i in. (5).

RODZAJE SZCZEPIONEK PRZECIW GRYPIE

Ogólnie przyjęty jest podział szczepionek przeciw grypie na szczepionki inaktywowane- zabite (TIV-

trivalent inactivated vaccine) oraz szczepionki żywe (LAIV- *live-attenuated influenza vaccine*) (4).

1. Szczepionki żywe. Szczepionki przeciw grypie, tzw. żywe zawierają atenuowane wirusy grypy, które zostały pozbawione zjadliwości dla człowieka. Szczepionki żywe przygotowywane są w postaci aerozolu i podawane drogą donosową. Zawarte w nich atenuowane wirusy grypy indukują procesy odpornościowe na poziomie humoralnym i komórkowym zbliżonym do procesów występujących podczas naturalnego zakażenia. Szczepionki tego typu indukują dłuższy okres trwania odporności oraz wyższą krzyżową odporność w porównaniu ze szczepionkami inaktywowanymi. Charakteryzują się również wysoką skutecznością w grupie dzieci w wieku od 6 miesięcy do 18 lat wynoszącą 73-96% w sezonie pierwszych szczepień oraz 82-100% po powtórny szczepieniu w następnym sezonie. Jednak u ok. 10-15% osób podanie szczepionki żywej powoduje wystąpienie objawów ze strony górnych dróg oddechowych o średnim natężeniu (6, 7).

Szczepionki przeciw grypie, zawierające atenuowane wirusy żywe stosowane są w Stanach Zjednoczonych oraz w Rosji (7). W Stanach Zjednoczonych donosowa szczepionka przeciw grypie zgodnie z zaleceniami ACIP (The Advisory Committee in Immunisation Practices) od 2003 r. może być stosowana w grupie osób w wieku 5-49 lat. Od 2008 r. wskazania te rozszerzono na grupę osób w wieku 2-49 lat (8).

2. Szczepionki inaktywowane. Szczepionki inaktywowane zawierają zabite wirusy grypy. Są to szczepionki przygotowywane w postaci jałowej zawiesiny mieszaniny szczepów wirusa grypy lub adsorbowanej na nośnikach odpowiednich do podawania drogą domięśniową.

Na rynku dostępne są 4-generacje szczepionek inaktywowanych, z których 3-generacje są dostępne w Europie (4).

2.1. Szczepionki zabite. Pierwsza skuteczna inaktywowana szczepionka przeciw grypie opracowana w 1937 r. zawierała cały wirus grypy pozyskany z płynu omocznioowego zależonych jaj kur poddany inaktywacji działaniem formaldehydu. W badaniach klinicznych wykonanych wśród amerykańskich żołnierzy skuteczność tej szczepionki została oceniona na poziomie 70%. W 1945 r. szczepionka została w Stanach Zjednoczonych dopuszczona do stosowania dla ludności cywilnej. Pierwszej inaktywowanej szczepionce przeciw grypie przypisywano stosunkowo wysoką odczynowość, wynikającą z niedoskonałości procesu jej wytwarzania, zwłaszcza obecności zanieczyszczeń pochodzących z jaj kur. Obecnie szczepionki inaktywowane zawierające cały wirus są wciąż dostępne w kilku krajach, ale nie w Europie (4).

2.2. Szczepionki z rozszczepionym wirionem. Szczepionki z rozszczepionym wirionem zostały po raz pierwszy zastosowane w 1964 r. Szczepionki te są przygotowywane z inaktywowanych cząstek wirusa grypy (tzw. *split*). Przygotowane produkty zawierają fragmenty wirusa chemicznie rozbijane z użyciem niejonowych detergentów (np. Tritonu X-100) lub eteru, a następnie oczyszczane w celu usunięcia białek pochodzenia niewirusowego. W procesie wytwarzania szczepionek zawiesina wirusa poddawana jest zagęszczaniu i oczyszczaniu przez ultrawierowanie w gradiencie ciężkości (9, 10). Szczepionki zawierające rozszczepiony wirion są do chwili obecnej najbardziej powszechne wśród szczepionek inaktywowanych.

Przykładem dostępnych obecnie szczepionek II generacji zawierających rozczepiony wirion są szczepionki Begrivac (Novartis Vaccines and Diagnostics GmbH, CoKG), Fluarix (GlaxoSmithKline Biologicals S.A.), Vaxigrip (Sanofi Pasteur S.A.) oraz IDflu® (Sanofi Pasteur S.A.).

2.3. Szczepionki podjednostkowe. W 1976 r. do obrotu wprowadzono szczepionkę podjednostkową (tzw. *sub-unit*) zawierającą oczyszczone antygeny wirusa grypy. Szczepionki te są przygotowywane w taki sposób, że w procesie wytwarzania stosowane są dodatkowe etapy oczyszczania, w stosunku do etapów procesu wytwarzania szczepionki typu rozszczepiony wirion. Zagęszczone wirusy poddawane są działaniu bromku cetyl-3-metyl amonu (CTAB), tritonu X-100 lub tritonu N-101. W efekcie produkt końcowy szczepionki zawiera głównie dwa oczyszczone antygeny hemaglutyninę (HA) i neuraminidazę (NA) o zachowanych właściwościach antygenowych (4).

Przykładem dostępnych obecnie szczepionek III generacji- podjednostkowych jest szczepionka Influvac (Solvay Pharmaceuticals B.V.).

2.4. Szczepionki wirosomalne. Wirosom jest cząstką podobną do wirusa grypy i zawiera odtworzoną otoczkę wirusa bez materiału genetycznego wirusa, ale posiada aktywność wiązania cząstek i aktywność fuzji z błoną komórkową. Wirosom pełni rolę adiuwantu oraz układu dostarczania oczyszczonych antygenów HA i NA wirusa grypy (4, 11).

W procesie formułacji szczepionek wirosomalnych szczepki wirusa grypy po namnażaniu poddawane są inaktywacji, a następnie przygotowywane w taki sposób aby preparat zawierał głównie antygeny HA i NA umieszczone w wirosomie przez zmieszanie z lecytyną, która tworzy naturalną podstawę dwuwarstwowej błony lipidowej (11).

Przykładem dostępnych obecnie szczepionek IV generacji- wirosomalnych jest szczepionka Inflexal®V (Berna Biotech Italia S.r.l).

WPLYW ZMIENNOŚCI WIRUSA GRYPY NA DOBÓR SZCZEPÓW SZCZEPIONKOWYCH

Wirusy grypy charakteryzują się wysokim poziomem zmienności związanym z segmentową budową genomu i wynikającą z tego zdolnością do reasortacji, wysokiej częstości mutacji punktowych oraz braku mechanizmów naprawczych w czasie replikacji wirusów, co skutkuje kumulacją zmian szczególnie w obrębie genów kodujących dwa główne antygeny powierzchniowe wirusa grypy HA i NA.

Wśród głównych mechanizmów zmienności wymieniane są: skok antygenowy (*antigenic shift*) oraz przesunięcie antygenowe (*antigenic drift*) (4). Skok antygenowy określany jest genetyczną reasortacją polegającą na wymianie jednego bądź kilku fragmentów RNA wirusa. Mechanizm ten występuje wśród szczepów wirusa grypy typu A, który wywołuje zakażenia u ludzi i zwierząt. Do skoku antygenowego dochodzi w sytuacji, gdy organizm gospodarza jest zakażony jednocześnie przez dwa różne szczepy wirusa grypy typu A. W takiej sytuacji może dochodzić do wymiany między wirusami ludzkimi i zwierzęcymi jednego lub obu genów kodujących powierzchniowe glikoproteiny, co może prowadzić do powstania odrębnego antygenowo szczepu wirusa, o znacznych zmianach antygenowych HA i NA, przeciw którym organizm nie wytworzył odporności. W warunkach naturalnych szczepy reasortanty pochodzące od wirusa ludzkiego i zwierzęcego powstają najczęściej w organizmie świni (tzw. *mixing vessel*) (12).

Przesunięcie antygenowe polega na spontanicznych zmianach sekwencji nukleotydów w obrębie całego genomu jako wynik mutacji punktowych RNA wirusa i podstawień pojedynczych aminokwasów, które występują w czasie replikacji wirusów. Jest to mechanizm mniej dramatyczny w skutkach w stosunku do skoku antygenowego, wywołujący zmiany trwające latami u wszystkich typów wirusa - chociaż nie prowadzi do poważnych zmian genotypu wirusa, zwykle jest przyczyną nieskutecznego działania szczepionki sezonowej.

WYBÓR SZCZEPÓW SZCZEPIONKOWYCH

Pierwsze szczepionki przeciw grypie składały się z pojedynczego szczepu wirusa grypy. Do szczepionki wybierano szczep wirusa krążący w środowisku, izolowany w danym sezonie epidemicznym. Wraz z odkryciem zmian antygenowych szczepów wirusa grypy krążących w środowisku, w latach 60-tych i 70-tych opracowano koncepcję szczepionki sezonowej polegającej na zmianie składu szczepów wirusa w zależności od sytuacji epidemiologicznej (12). Początkowo wpro-

wadzono szczepionki złożone z dwóch szczepów wirusa grypy. Od 1978 r. wszystkie szczepionki przeciw grypie sezonowej (inaktywowane oraz żywe) są trójskładnikowe i wyjściowo przygotowywane z dwóch szczepów wirusa grypy typu A (typ A (H3N2) i A (H1N1) oraz szczepu wirusa grypy typu B (12).

W 1947 r. z inicjatywy ŚOZ zorganizowano Światową Sieć Laboratoriów ds. Grypy liczącą obecnie 125 ośrodków w 96 krajach (w Polsce ogniwem w sieci jest Krajowy Ośrodek ds. Grypy mieszczący się w NIZP-PZH), 5 Głównych Laboratoriów (WHO *Collaborating Centres*) oraz 4 Laboratoria Kontroli Jakości (13). Proces wyboru szczepów obejmuje izolację od osób zakażonych szczepów wirusa grypy krążących w danej populacji oraz ich identyfikację. Około 8 000 szczepów wirusa pochodzących z 500 000 materiałów klinicznych przesyłanych jest rocznie do głównych laboratoriów sieci w celu oceny zmian genetycznych wirusa i opracowania składu antygenowego szczepionek przeciw grypie. Dane te wraz z wynikami badań genetycznych oraz serologicznych, w których określa się stopień odporności populacji na poszczególne szczepy wirusa, są podstawą doboru szczepów szczepionkowych wirusa grypy. Eksperti ŚOZ dokonują corocznie przeglądu sytuacji epidemiologicznej i jeżeli to konieczne, zalecają użycie w procesie wytwarzania szczepionek nowych szczepów wirusa grypy, odpowiadających danej sytuacji epidemiologicznej (14). Wybierane są szczepy, co do których istnieje wysokie prawdopodobieństwo, że mogą być przyczyną zachorowań na grypę w kolejnym sezonie epidemicznym. Oryginalne szczepy są poddane pasażowaniu w celu uzyskania wyjściowych szczepów produkcyjnych, które następnie wraz z porównawczymi antygenami i surowicami są udostępniane wytwórcom produkującym szczepionkę przeciw grypie w celu przygotowania serii siewnej wirusa (12, 15).

W sezonie 2010/2011 Komitet ds. Produktów Leczniczych Stosowanych u Ludzi (CHMP- *Committee for Human Medicinal Products*) działający w ramach Europejskiej Agencji Leków (EMA- *European Medicines Agency*) na półkulę północną rekomendował następujące szczepy wirusa grypy sezonowej: A/Brisbane/59/2007 (H1N1)-like virus; A/Brisbane/10/2007 (H3N2)-like virus oraz B/Brisbane/60/2008-like virus (12).

PRZYGOTOWANIE SZCZEPÓW REASORTANTÓW

1. Szczepy reasortanty w szczepionkach inaktywowanych. Ważnym etapem procesu wytwarzania szczepionek inaktywowanych jest charakterystyka wzrostu szczepu wirusa w bezpośrednich i kolejnych pasażach. Wyjściowe szczepy siewne wirusa grypy typu A często

słabo się namnażają, dlatego też w celu zwiększenia efektywności produkcji szczepionki w ośrodkach referencyjnych przygotowywane są szczepy reasortanty wysoko wydajne (*high-growth vaccine strain*) charakteryzujące się wysoką zdolnością wytwarzania antygenów powierzchniowych (10). Szczepy reasortanty zawierają HA i NA pochodzące ze szczepu dzikiego wybranego w danym sezonie oraz pozostały materiał genetyczny pochodzący ze szczepu laboratoryjnego A/PR/8/34, co pozwala na wysoki poziom namnażania w zależonych jajach kur (16). Wyjściowe szczepy siewne wirusa grypy typu B są pozyskiwane drogą powtarzanych, kolejnych pasażów w zależonych jajach kur (10).

2. Szczepy reasortanty w szczepionkach żywych. Najczęściej wykorzystywaną metodą atenuacji szczepów szczepionkowych wirusa grypy było wykonywanie powtarzanych pasażów wirusa oraz adaptacja wzrostu w obniżonej temperaturze replikacji. W procesie wytwarzania dostępnych na rynku szczepionek żywych stosowane są szczepy zaadaptowane do obniżonych temperatur (*cold adapted strain*). Adaptacja wirusów do wzrostu w obniżonej temperaturze jest najskuteczniejszą metodą uzyskania ich stabilności genetycznej. W wyniku adaptacji do stopniowego obniżania temperatury namnażania otrzymywane są szczepy wrażliwe na zmiany temperatury, które wydajnie namnażają się w temp. do 25°C, a niedostatecznie w temp. 37°C (6, 17).

Obecnie opracowywane szczepionki przeciw grypie żywe są przygotowywane metodami reasortacji. Szczepy reasortanty wirusa (typy A i B) są przygotowywane przez mieszanie szczepu atenuowanego ze szczepem epidemicznym. Uzyskany szczep reasortanta (6:2) zawiera 2 geny kodujące antygeny HA i NA szczepu epidemicznego oraz 6 genów kodujących białka niepowierzchniowe, pochodzących z zaadoptowanego do obniżonej temperatury szczepu macierzystego. Następnie kolejne pasażów szczepu reasortanta lub niereasortanta prowadzone są w zależonych jajach kur lub linii komórek ssaków (6, 17, 18).

Alternatywnym systemem jest przygotowanie szczepu reasortanta przez przepisanie informacji genetycznej z RNA wirusa na cDNA. Obecnie jako szczep atenuowany stosowany jest szczep X-31 będący reasortantem A/PR/8/34 i szczepu A/HK/6/68. Szczep X-31 jest stosowany jako szczep atenuowany w procesie przygotowania szczepu reasortanta szczepionkowego dla szczepionek inaktywowanych. Do przygotowania szczepu reasortanta szczepionkowego dla szczepionek żywych stosowany jest szczep X-31ac pozyskany ze szczepu X-31 po pasażach w niskiej temperaturze (18).

W Stanach Zjednoczonych FDA (*Food and Drug Administration*) zarejestrowała szczepionkę przeciw grypie opracowaną z użyciem szczepów wirusa grypy temperaturo-wrażliwych pochodzących z wyższego

niż normalnie akceptowalny pasaż macierzystej serii siewnej wirusa grypy (szczep wysoko atenuowany) (6).

PROCES WYTWARZANIA SZCZEPIONEK PRZECIW GRYPIE

Proces wytwarzania szczepionek przeciw grypie jest ściśle ograniczony czasem. Od momentu rekomendacji szczepów epidemicznych przez ŚOZ do zwolnienia pierwszych serii szczepionki do obrotu wymagany jest czas 6-8 miesięcy (19). Cykl produkcyjny szczepionki inaktywowanej przeciw grypie obejmuje następujące etapy: przygotowanie reasortantów szczepów A (H3N2) oraz A (H1N1), namnażanie wirusów w zależonych jajach kur, inaktywacja oczyszczanie, rozszczepianie, przygotowanie i napełnianie szczepionki do opakowań bezpośrednich oraz badania kliniczne oceny bezpieczeństwa i immunogenności. W sezonie 2009/2010 wyprodukowano 500 mln dawek szczepionki przeciw grypie sezonowej dla półkuli północnej (19).

1. Serie siewne wirusa grypy. Cały proces wytwarzania szczepionki przeciw grypie oparty jest na systemie serii siewnych wirusa grypy. Obowiązujące są wymagania dotyczące liczby pasażów roboczych serii siewnych wirusów grypy wybranych jako szczepy szczepionkowe. Dla większości szczepionek przeciw grypie, w procesie wytwarzania siewny wirus używany do wytwarzania szczepionki jest namnażany w zależonych jajach kur ze stad wolnych od określonych patogenów (SPF) (14). Namnażanie to stosowane jest na etapach izolacji wirusa grypy, przygotowania serii siewnych wirusa i późniejszego namnażania wirusa. Określana jest tożsamość antygenów HA i NA tak, aby wykazać, że pochodzą z odpowiedniego szczepu wirusa grypy. Prowadzone są badania zanieczyszczeń bakteryjnych i grzybiczych w badaniu jałowości oraz badania obecności mykoplazm. Pochodzenie oraz historia pasażów szczepów wirusa jest zatwierdzana przez organ do tego upoważniony (9).

2. Inaktywacja. Ważnym etapem w procesie wytwarzania inaktywowanych szczepionek przeciw grypie jest proces inaktywacji. Etap ten prowadzony jest w taki sposób, aby doprowadzić do inaktywacji wirusa grypy, przy minimalnych zmianach antygenów HA i NA, bez uszkodzenia ich antygenowości. Wytwórcy stosują różne metody inaktywacji, ale zawsze proces ten jest zwalidowany i powtarzalny. Hodowle wirusa najczęściej poddawane są inaktywacji działaniem formaldehydu lub betapropiolaktonu (16).

Zgodnie z obowiązującymi wymaganiami przedstawionymi w Farmakopei Europejskiej proces inaktywacji wirusa grypy musi wykazywać zdolność inaktywacji wirusów białaczek ptasich oraz mykoplazm (9).

3. Przygotowanie serii końcowej szczepionki. Inaktywowane szczepionki przeciw grypie dopuszczone do obrotu w UE wytwarzane są w taki sposób, że każdy z trzech wirusów grypy namnażany jest pojedynczo i poddawany kolejnym etapom obróbki oddzielnie. Wytwarzane są szczepionki monowalentne (3 szczepionki wirusa) i dopiero odpowiednie ilości szczepionek monowalentnych pod postacią odpowiedniej ilości mieszaniny trzech monowalentnych zbiorów są łączone w celu uzyskania pojedynczej porcji szczepionki przed rozdozowaniem. Na tym etapie może być dodawany adiuwant. Seria końcowa szczepionki jest przygotowywana przez rozdozowanie w warunkach aseptycznych końcowej pojedynczej porcji szczepionki do jałowych pojemników zamykanych, tak aby zapobiec zanieczyszczeniom. Szczepionki przeciw grypie sezonowej przygotowywane są do podawania w pojedynczych dawkach (9). Pojedyncza dawka szczepionki inaktywowanej dla dorosłych zawiera 45 µg antygeny hemaglutyniny (po 15 µg dla każdego z 3 typów wirusa grypy).

Każdego roku, szczepionki dopuszczone do obrotu oceniane są w badaniach klinicznych w celu potwierdzenia ich immunogenności i bezpieczeństwa po zmianie szczepów szczepionkowych. Badania takie wykonywane są na nie mniej niż 50 osobach w wieku od 18 do 60 lat i 50 osobach w wieku ponad 60 lat. Szczepionka powinna spełniać stosowne kryteria EMA dotyczące immunogenności dla każdego z 3-ch szczepów wirusa, gdzie oceniane są parametry serokonwersji (≥ 4 krotny wzrost), poziomu ochronnego (≥ 40 miano przeciwciał hamujących hemaglutynację) i średnia geometryczna miana > 2 w grupie starszych (lub 2,5 w grupie dorosłych w wieku od 18 do 59 lat) (15).

4. Zanieczyszczenia w procesie wytwarzania szczepionek przeciw grypie. Zanieczyszczenia pochodzące z materiału wyjściowego, procesów pośrednich czy produktu końcowego w procesie wytwarzania szczepionki przeciw grypie powinny zostać efektywnie inaktywowane lub usunięte odpowiednio do rodzaju zanieczyszczeń. Na etapie kontroli roboczej serii siewnej wirusa każdorazowo wykonywane są kontrolne badania zanieczyszczeń bakteryjnych i grzybiczych oraz badanie na obecność mykoplazm (9).

Do chwili obecnej nie wykryto zanieczyszczeń czynnikami zewnątrzpochoźnymi w procesie wytwarzania szczepionki przeciw grypie w seriach szczepionek dopuszczonych do obrotu. Jednak należy brać pod uwagę taką sytuację, zwłaszcza wobec wcześniej opisanych przypadków zanieczyszczenia retrowirusami i aktywności odwrotnej transkryptazy w procesie wytwarzania innych szczepionek, gdzie w procesie wytwarzania używane są jaja kur (20).

STRATEGIE ZWIĘKSZENIA WYDAJNOŚCI PROCESU WYTWARZANIA ORAZ UZYSKANIE ZWIĘKSZONEJ LICZBY DAWEK SZCZEPIONKI

Ważnymi elementami krytycznymi dostępności szczepionek przeciw grypie są m.in. czas trwania i łatwość procesu wytwarzania szczepionki, zmiany dotyczące substratów stosowanych w procesie wytwarzania i do namnażania wirusa, krzyżowa ochrona dla różnych wariantów szczepów wirusa, bezpieczeństwo, a pośrednio również cena dawki szczepionki. Opracowywane są strategie zwiększenia ilości dostępnej szczepionki w sytuacji, gdy ilość produkowanej szczepionki jest zbyt mała w stosunku do potrzeb.

Poszukiwania sposobów prowadzących do zwiększenia produkcji szczepionki przeciw grypie skupione są na następujących kierunkach:

- stosowanie adiuwantów;
- opracowanie alternatywnych dróg podawania, w tym śródskórnym i bezpośrednio na błony śluzowe;
- zastosowanie namnażania wirusów grypy w liniach komórek.
- opracowanie szczepionek żywych.

Należy zaznaczyć, że w większości obecnie zarejestrowanych szczepionek przeciw grypie sezonowej adiuwanty nie występują. Jednak ponieważ zastosowanie adiuwantu w szczepionce wzmacnia immunogenność antygeny, pozwala to zmniejszyć dawkę szczepionki przez zmniejszenie zawartości antygeny lub zmniejszenie objętości podawanej szczepionki. System ten również umożliwia krzyżową odporność w stosunku do szczepów wariantów antygenowych wirusa. Podejmowane są działania opracowania szczepionek zawierających w składzie nowe adiuwanty (5, 10).

W Europie do obrotu została dopuszczona szczepionka FluAD® (Chiron) przygotowana w postaci olejowo-wodnej emulsji MF59 zawierającej 5% skwalenu, 0,5% Tween 80 i 0,5% trioleinianu sorbitanu. Szczepionka ta zawiera HA w ilości 15 µg antygeny każdego z trzech szczepów wirusa grypy. Dodanie adiuwantu przyczyniło się do 1,5-krotnego podwyższenia średniej geometrycznej poziomu przeciwciał, przy wzroście jej reaktogenności (21). Profil bezpieczeństwa szczepionki zawierającej w składzie skwalen, jako jeden z adiuwantów, jest porównywalny z profilem bezpieczeństwa takiej samej szczepionki bez adiuwantu poza występowaniem bólu w miejscu jej podania. Szczepionki zawierające adiuwant przygotowany na bazie skwalenu wywołują więcej miejscowych niepożądanych odczynów poszczepiennych w miejscu podania szczepionki takich jak: ból, rumień i stwardnienie rozsiane, ponadto

podwyższona ciepłota ciała, niekiedy ból mięśniowy u dorosłych (22).

Szczepionki przeciw grypie są najczęściej podawane domięśniowo. Alternatywne drogi podania to śródskórna i donosowa. Zastosowanie śródskórnej drogi podania pozwala na dostarczenie szczepionki bezpośrednio do zewnętrznej warstwy skóry bogatej w komórki prezentujące antygen, co zwiększa immunogenność szczepionki (14).

W sezonie 2009-2010 dopuszczono do obrotu w Europie szczepionkę IDflu do podawania śródskórnego. Jest to szczepionka typu rozszczepiony wirion zawierająca po 9 µg i 15 µg antygeny HA każdego z zalecanych szczepów wirusa grypy/dawkę i nie zawiera adiuwantu ani środka konserwującego. Umieszczona jest w ampułko-strzykawce z systemem do mikrostrzykiwań, który zapewnia precyzyjne podawanie antygeny bezpośrednio do skóry właściwej. Strzykawka zaopatrzona jest w mikroigłę o dł. 1,5 mm tj. prawie 10-krotnie krótsza od igieł stosowanych w szczepionkach do podania domięśniowo. Osobom dorosłym w wieku do 59 lat stosuje się szczepionkę zawierającą mniejszą zawartość antygeny wirusa po 9 µg/dawkę każdego szczepu. Szczepionka jest przeznaczona do zapobiegania powikłaniom pogrypowym u osób z grupy ryzyka. Ze względu na brak danych klinicznych nie jest zalecana do szczepienia dzieci i młodzieży poniżej 18 lat. Natomiast szczepionka zawierająca 15 µg antygeny/dawkę, przeznaczona jest do stosowania u osób dorosłych w wieku 60 lat i starszych, u których występuje podwyższone ryzyko wystąpienia powikłań grypy.

W badaniach na 1000 ochotników w wieku od 18 do 60 lat, wykazano, że 3-składnikowa szczepionka zawierająca 9 µg HA, podawana metodą mikroiniekcji oraz szczepionka zawierająca 15 µg HA podawana drogą domięśniową powodowały podobny profil bezpieczeństwa i poziom immunogenności określony mianem przeciwciał hamujących hemaglutynację (23). Zastosowanie systemu do mikrostrzykiwań pozwala na podawanie dawki o objętości 0,1 ml, a nie 0,5 ml, co ma bezpośrednie przełożenie w 5-krotnie zwiększonej podaży procesu wytwarzania. Wykazano, że 3-składnikowa szczepionka typu rozszczepiony wirion zawierająca po 15 µg i po 21 µg HA każdego szczepu wirusa, podana drogą mikroiniekcji była bardziej immunogenna niż taka sama szczepionka podana domięśniowo.

Zastosowano inną technologię PowderJet, gdzie szczepionka w postaci proszku podawana jest za pomocą urządzenia ze strumieniem helu. System ten zapewnia podniesienie immunogenności szczepionki, przez jej iniekcję do immunokompetentnej tkanki, bezbólowo, za pomocą urządzenia bez igły eliminując ryzyko zanieczyszczenia krawędziami (4, 10).

Większość dopuszczonych do obrotu w UE szczepionek przeciw grypie sezonowej jest wytwarzanych z

użyciem wirusów grypy namnażanych w zależonych jajach kur. Jest to jednak związane z niebezpieczeństwem zanieczyszczeń biologicznych, bakteryjnych i grzybiczych oraz zanieczyszczeń wirusowymi czynnikami zewnątrzpochođnymi, w tym również zakażeniem wirusem grypy ptasiej A(H7N7), co opisano np. w Holandii w 2003 r. (24). Namnażanie wirusów w zależonych jajach kur związane jest również z wystąpieniem alergii na białko jaja kurzego oraz ograniczeniami związanymi z uzyskaniem znacznej liczby dawek szczepionki w krótkim czasie (25). Wytwarzanie szczepionek, dla których wirus grypy namnażany jest w zależonych jajach kur, wymaga dostarczania milionów jaj kur. Ilość antygeny oczyszczonego wirusa zawarta w pojedynczej dawce szczepionki jest uzyskiwana z płynu omocznio-wego 1 zależonego jaja, tak więc w celu wyprodukowania np. 100 000 dawek szczepionki wytwórca musi przygotować wcześniej 100 000 zależonych jaj kur. Każde jajo jest myte, podlega dezynfekcji i jest zakażane 1 szczepem wirusa grypy. Po 2-3 dniach inkubacji zbierany jest płyn omocznio-owy.

Od lat podejmowane są starania zastąpienia hodowli wirusa w zależonych jajach kur alternatywnymi metodami (5, 10, 26). Jednym z alternatywnych sposobów namnażania wirusa grypy jest jego namnażanie z użyciem ciągłych linii komórek pochodzących od ssaków. Wykorzystanie takiej drogi namnażania wirusa może przyczynić się do większej dostępności szczepionki sezonowej. Obecnie wykorzystuje się dwie ciągłe linie komórek tj. linie MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*) komórki nerki psa oraz linie Vero nerki afrykańskiej małpy zielonej. Bezpieczeństwo linii komórek MDCK i Vero używanych w procesie wytwarzania szczepionek przeciw grypie jest potwierdzane zgodnie z obowiązującymi regulacjami EU. Wytwarzanie szczepionek przygotowanych w hodowlach komórek jest oparte na systemie banku komórek z koniecznością wykonywania badań jakości banku komórek linii komórek wykorzystywanych w procesie wytwarzania (20, 25).

Metody namnażania wirusa grypy w linii komórek zwierzęcych użyto w procesie wytwarzania szczepionki OPTAFU® (Novartis), która została dopuszczona do obrotu przez EMA, ale stosowanie linii komórek do namnażania wirusa grypy nie jest wciąż zatwierdzone przez FDA.

Wprowadzenie namnażania wirusa szczepionko-wego w linii komórek związane jest z koniecznością dodawania do hodowli surowicy, co wiąże się z niebezpieczeństwem potencjalnych reakcji nadwrażliwości, zmiennością między seriami surowicy, oraz możliwymi zanieczyszczeniami, głównie mykoplazmami i wirusami bydłęcymi. Ostatnie poszukiwania rozwiązań metodologicznych prowadzą do opracowania podłoży do hodowli niezawierających białek ani surowicy. Przykładem jest wytwarzanie szczepionki podjednostkowej

OPTAFLU®, gdzie wirusy grypy namnażane są w linii komórek MDCK 33016. Linia ta pochodzi wyjściowo z linii komórek nabłonka MDCK i została zaadaptowana do namnażania w warunkach bez surowicy, z wykorzystaniem podłoża chemicznie zdefiniowanego (25).

Sposobem uzyskania antygeny bez konieczności namnażania wirusa w zależonych jajach lub linii komórek ssaków i następnie inaktywacji żywego wirusa jest wykorzystanie rekombinowanych białek HA i NA uzyskanych z wykorzystaniem linii komórek owadzieh i systemu ekspresji bakulowirusa (BEVS) (27). System bakulowirusa jest uważany jako bezpieczny, eliminuje niebezpieczeństwo czynników zewnątrzpochoźnych. Obecnie w trakcie oceny rejestracyjnej w Stanach Zjednoczonych jest szczepionka rekombinowana nowej generacji FluBlok® (Protein Sciences Corporation), gdzie substancją czynną jest rekombinowane białko HA przygotowane z użyciem systemu ekspresji bakulowirusa. Szczepionka ta zawiera trzykrotnie więcej antygeny HA w stosunku do inaktywowanej szczepionki trójskładnikowej TIV. Wysoko oczyszczone białko jest dobrze tolerowane i silnie immunogenne, wzbudza długoterminową ochronę i ochronę krzyżową w stosunku do zmutowanych szczepów wirusów grypy. Szczepionka nie zawiera pozostałości białka kurzego, środków konserwujących ani adiuwantów (27).

PIŚMIENNICTWO

1. New influenza A (H1N1) virus: global epidemiological situation, June 2009. *Wkly Epidemiol Rec* 2009; 84: 249-57.
2. Meldunki epidemiologiczne. <http://www.pzh.gov.pl/epimeld/grypa/index.htm>
3. Blank PR, Schwenkglenks M, Szucs TD.: Vaccination coverage rates in eleven European countries during two consecutive influenza seasons. *J Infect* 2009; 58, 446-58.
4. Bridges CB, Katz JM, Levandowski RA i in. Inactivated influenza vaccines. *Vaccines*. Plotkin S, Orenstein W, Offit P. Elsevier Inc. USA. 2008: 259-85.
5. Palache B. New vaccine approaches for seasonal and pandemic influenza. *Vaccine* 2008;26:6232-36.
6. Murphy BR, Coelingh K. Principles underlying the development and use of live attenuated cold-adapted influenza A and B virus vaccine. *Viral Immunol* 2002;15:295-323.
7. Belshe RB, Walter R, Stoddard JJ i in. Influenza vaccine-live. *Vaccines*. Plotkin S, Orenstein W, Offit P. Elsevier Inc. USA. 2004: 291-305.
8. Poland GA, Jacobson RM, Targonski PV. Avian and pandemic influenza: an overview. *Vaccine* 2007;25:3057-59.
9. Influenza vaccine (split virion, inactivated). 01/2008:0158. *European Pharmacopoeia* 6.0 vol. 1: 801-3.
10. Palese P. Making better influenza virus vaccines? *Emerg Inf Dis* 2006;12:61-65.
11. Herzog Ch, Hartmann K, Kunzi V, i in. Eleven years of Inflflexal®V- avirosomal adjuvanted influenza vaccine. *Vaccine* 2009;27:4381-87.
12. Barr IG, McCauley J, Cox N, i in. Epidemiological, antigenic and genetic characteristics of seasonal influenza A(H1N1), A(H3N2) and B influenza viruses: basis for the WHO recommendation on the composition of influenza vaccines for use in the 2009-2010 Northern Hemisphere season. *Vaccine* 2010;28:1156-67.
13. Brydak LB, Grypa, pandemia grypy mit czy realne zagrożenie? Warszawa, Oficyna Wydawnicza RYTM, 2008: 193-252.
14. Hooland D, Booy R, De Looze F, i in. Intradermal influenza vaccine administered using a new microinjection system produces superior immunogenicity in elderly adults: a randomized controlled trial. *J Infect Dis* 2008;198:650-58.
15. Note for guidance on harmonization of requirements for influenza vaccines. Committee for proprietary medicinal products 1997; CPMP/BWP/214/96.
16. Meghrou J, Mahmoud W, Jacobs D, i in. Development of a simple and high-yielding fed-batch process for the production of influenza vaccines. 2010; 28: 309-16.
17. Kilbourne ED. Future influenza vaccines and the use of genetic recombinants. *Bull World Health Organ*. 1969;41:643-5.
18. Jung E-J, Lee K-H, Song B.L. Reverse genetic platform for inactivated and live-attenuated influenza vaccine. *Exp Mol Medicine* 2010;42:116-21.
19. Partridge J, Kleny MP, the World Health Organization H1N1 influenza vaccine Task Force. Global production of seasonal and pandemic (H1N1) influenza vaccine in 2009-2010 and comparison with previous estimates and global action plan targets. *Vaccine* 2010; article in press.
20. Gregersen J-P. A risk-assessment model to rate the occurrence and relevance of adventitious agents in the production of influenza vaccines. *Vaccine* 2008; 26:3297-04.
21. Podda A. The adjuvanted influenza vaccines with novel adjuvants: experience with the MF59-adjuvanted vaccine. *Vaccine* 2001;19:2673-80.
22. Prevention and Control of seasonal influenza with vaccines- Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR* 2009;58:RR-8.
23. Beran J, Ambrozaitis A, Laiskonis A, i in. Intradermal influenza vaccination of healthy adults using a new microinjection system: a 3-year randomized controlled safety and immunogenicity trial. *BMC Medicine* 2009;7;13-28.
24. Koopmans M, Wilbrink B, Conyn M, i in. Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. *Lancet* 2004;363:587-93.
25. Liu J, Shi X, Schwartz R, i in. Use of MDCK cells for production of live attenuated influenza vaccine. *Vaccine* 2009; 27: 6460-63.
26. Paillet C, Forno G, Kratje R, i in. Suspension- Vero cell cultures as a platform for viral vaccine production. *Vaccine* 2009;27: 6464-67.
27. Cox MM, Hollister JR, FluBlok®, a next generation influenza vaccine manufactured in insect cells. *Biologicals* 2009;37:182-9.

Otrzymano: 09.06.2010 r.

Zaakceptowano do druku: 24.06.2010 r.

Adres do korespondencji:

Dr Ewa Augustynowicz

Zakład Badania Surowic i Szczepionek

Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego-

Państwowy Zakład Higieny

ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa

tel: 22 5421213

e-mail: eaugustynowicz@pzh.gov.pl