

Vakcína a její léková forma

Aleš Franc

Ústav farmaceutické technologie

Vakcína - definice

- **Vakcína je biologický přípravek**, určený k navození či zvýšení specifické a aktivní imunity vůči infekčnímu agens
- **Má antigenní specifitu** a dokáže v hostiteli vzbudit imunitní odpověď, resp. tvorbu protilátek či buňkami zprostředkovanou imunitu
- Bývá vyrobena z **oslabených nebo usmrcených forem patogenů** - bakterií a virů **nebo jejich částí**, případně **odvozených agens**, jako **toxoidů, proteinů, polysacharidů, DNA, RNA**
- **Nesmí být** pro organismus **toxická**
- **Stimuluje imunitní systém organismu**, aby rozpoznával a ničil patogen jako cizorodý prvek a zároveň si "pamatoval" jeho antigen, který by imunitní systém mohl v budoucnu snadněji eliminovat, aniž by došlo k rozvoji infekčního onemocnění
- **Reaktivita** je pak obecně reakce organismu na přijetí vakcíny
- **Imunogenita** je pak obecně schopnost vakcíny vyvolat imunitní odpověď

Seznam důležitých zkratk použitých v přednášce

CTB – cholерický subjednotkový toxin B
DT – difterický toxoid
(DTaP) – difterický a tetanický toxoid spolu se subjednotkovou vakcínou proti pertussis
EP – urychlovač penetrace
H – hemaglutinin
HepB – vakcína proti hepatitidě B
HiB – virus hepatitidy B
HIV – virus lidské imunitní nedostatečnosti
HPV – lidský papilomavirus
ISCOM – imunostimulační komplex
IPV – inaktivovaná vakcína proti polioviru
KA – usmrcený antigen
LAV – živá atenuovaná vakcína
MPs – polymerní mikročástice
N – neuramidáza
NPs – polymerní nanočástice
OMP – mikročástice obalené membránou

OPV – orální vakcína proti poliomyelitidě
OV – perorální vakcíny
PCV – pneumokokový konjugát
PMV – perorální rostlinná vakcína
rCTB – rekombinantní cholерický subjednotkový toxin B
rHBsAg – rekombinantní antigen proti hepatitidě B
RSV – respirační syncytiální virus
RV – rekombinantní vakcína
SUV – subjednotková vakcína
SV – štěpená vakcína
T – toxoid (anatoxin)
TBC – tuberkulóza
TCI – transdermální imunizace
Td – společná vakcína proti difterii a tetanu
TT – tetanický toxoid
VLP – částice podobná viru
VV – vektorová vakcína
wP – inaktivovaná vakcína proti pertussis
YF – žlutá zimnice

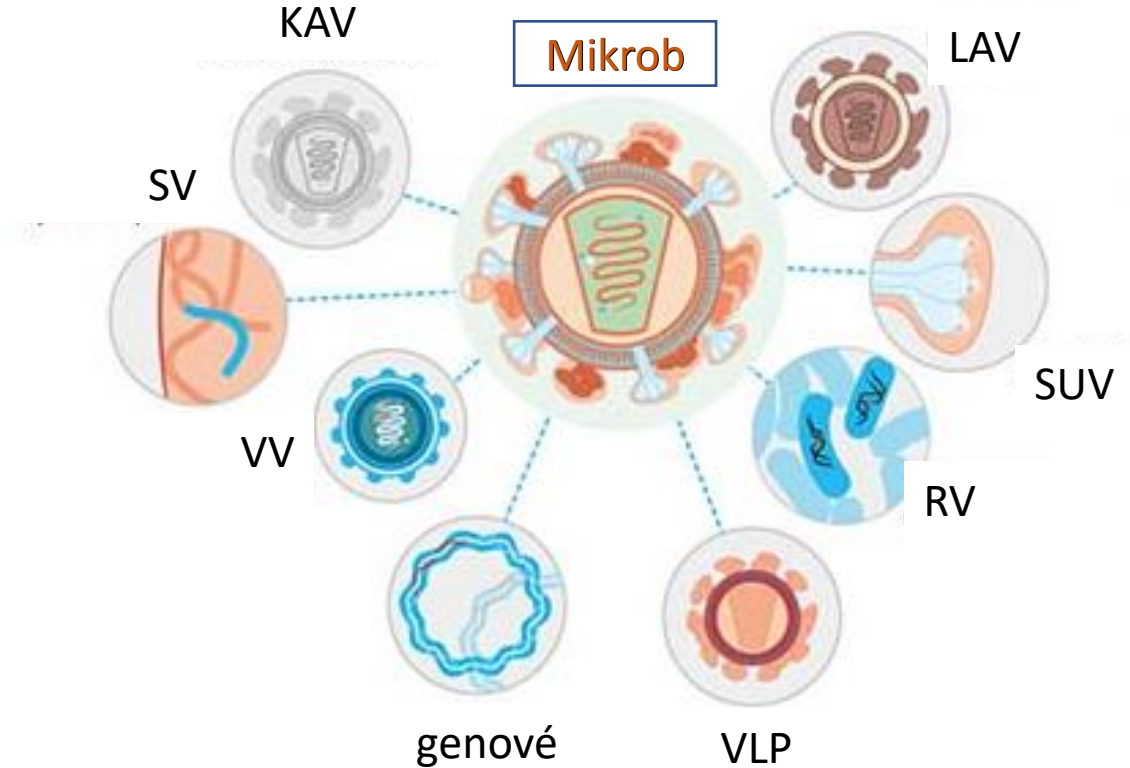
Krátká historie vakcinace

- **Starověk** - Indové požívali hadí jedy k imunizaci proti hadímu uštknutí
- **1695** - v Číně používali tampónů namáčených v lézích pravých neštovic
- **1767** – v Indii pokusy o plošnou variolizaci
- **1796** - Edward Jenner aplikoval rozdrcený neštovičný strup z dojnice (latinsky vacca)
- **1885** - Louis Pasteur připravil vakcínu z oslabeného viru vztekliny
- **1830** - byla na našem území největší proočkovanost proti variole
- **1961** - dětská obrna (poliomyelitis) u nás vymizela díky Sabinově vakcíně
- **1979** - v Somálsku poslední výskyt varioly
- **1953 - 2010** - v ČR se až čtyřicetkrát snížil počet případů TBC oproti zbytku světa
- **2002** - v ČR eradikace vztekliny u lišek



Druhy vakcín

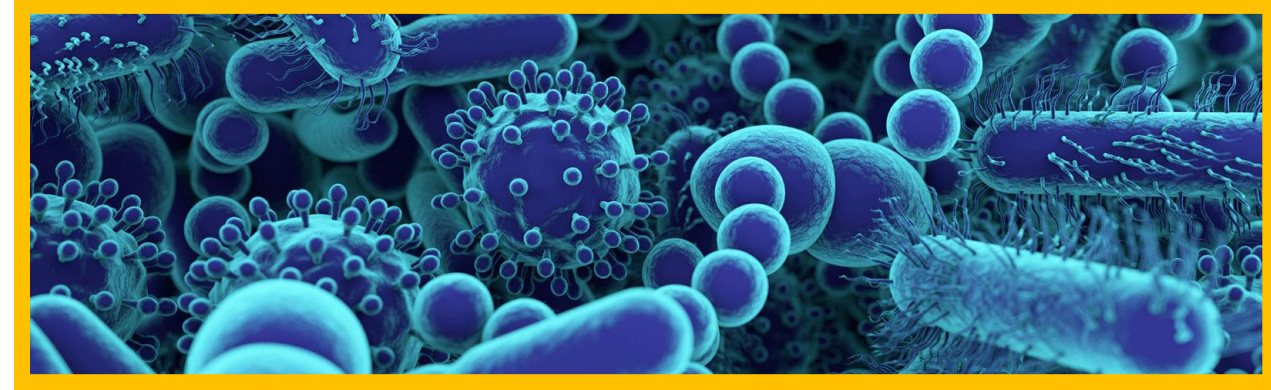
- **Atenuované vakcíny - LAV** (Live attenuated vaccines)
- **Inaktivované vakcíny - KAV** (Killed antigen vaccines)
- **Subjednotkové vakcíny - SUV** (Subunit vaccines)
- **Štěpené vakcíny – SV** (Splitting vaccines)
- **Toxoidy - T** (Toxoids)
- **Rekombinantní vakcíny - RV** (Recombinant vaccines)
- **Vektorové vakcíny – VV** (Vector vaccines)
- **Perorální rostlinné vakcíny - PMV** (Plant made vaccines)
- **Virům podobné částice - VLP** (Virus like particles)
- **Genové vakcíny** (DNA resp. RNA vaccines)



Zdroj: ARIAL S. Microbe Notes 2018 (upraveno)

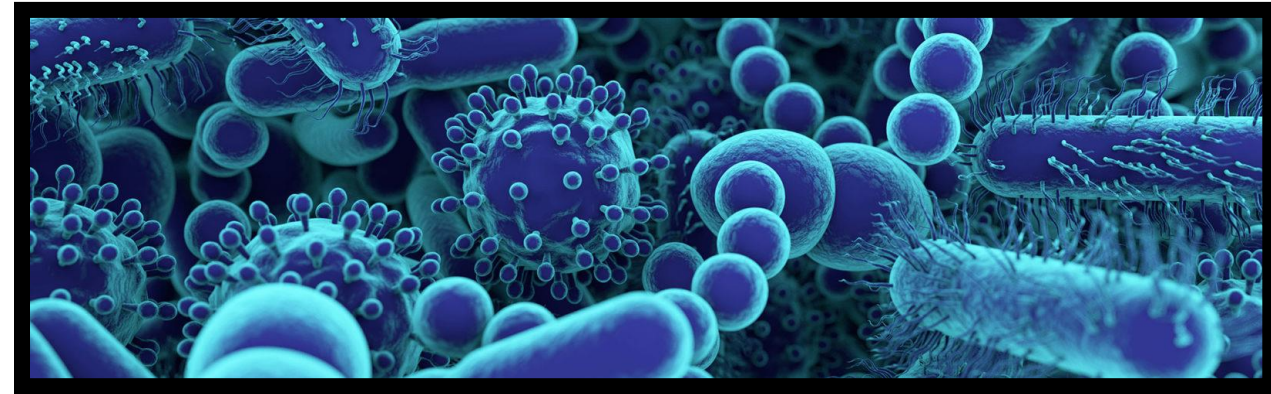
Atenuované (LAV)

- Vyrobeny z celých oslabených bakterií či virů
- Vysoká imunogenita i reaktivita
- Mohou způsobit infekční onemocnění
- Nejstarší technologie
- Deaktivace formaldehydem, fenolem, hydroxidem sodným, saponiny, teplotou či UV zářením
- Zachovaná antigenní specifita
- Stačí jedna dávka
- Kultivace na zvířecí či lidské tkáni nebo buňkách
- U virů oplodněná vejce, zvířecích embrya nebo zvířecí či lidské kultury, fibroblasty
- WHO doporučuje pět LAV vakcín, které doporučuje WHO. *BCG Bacillus Calmette-Guérin*, *Mycobacterium bovis* se sníženou virulencí, perorální vakcína *proti poliomyelitidě (OPV)*, *rubeole*, *rotaviru a žluté zimnici (YF)*



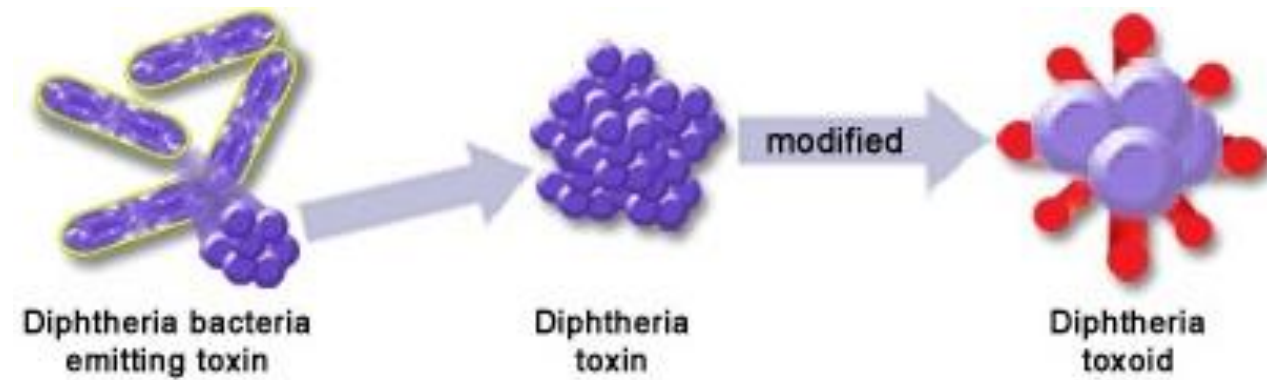
Inaktivované (KAV)

- Vyrobeny z celých usmrcených bakterií či virů
- Nižší imunogenita i reaktivita
- Nemohou způsobit infekční onemocnění
- Umrtvení roztokem kyseliny askorbové, betaaminofenylketonem, ethyleniminem, formaldehydem, fenolem, propiolaktonem nebo jejich směsi, zvýšeným tlakem, teplotou, UV zářením
- Zachovaná antigenní specifita
- Je třeba více dávek
- Kultivace jako LAV
- WHO doporučuje současné době inaktivovanou vakcínu proti *pertussis (wPa)* poliomyelitidě (IPV)



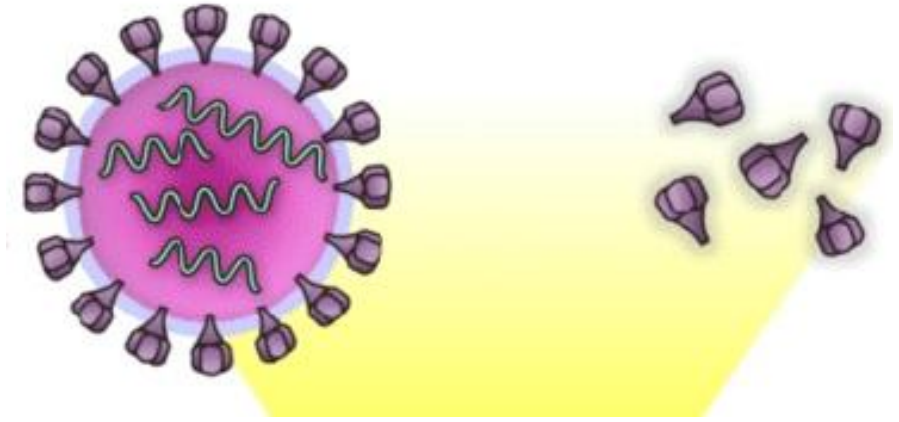
Toxoidy (T)

- Vyrábí se inaktivací toxinů obvykle formaldehydem
- Jsou netoxické
- Kultivace bakterií a produkce toxinů
- Mohou být tekuté nebo adsorbované na sorbent
- Reaktivita nižší (přísada imuno adjuvantu)
- Jsou méně imunogenní
- Obvykle nevystačí na celý život (po nějaké době opakování)
- WHO doporučuje vakcinaci proti diftérii a tetanu právě formou vakcín ve formě *TT* a *DT*



Subjednotkové vakcíny (SUV)

- Obsahují pouze komponenty mikrobů
- Nemohou způsobit infekční onemocnění
- Obsahují jen povrchové antigeny
- Nižší reaktivita
- Nižší imunogenita
- Usmrcený patogen je zde rozložen, jeho komponenty separovány a dále použity k přípravě vakcíny.
- Obvykle nevystačí na celý život (po nějaké době opakování)

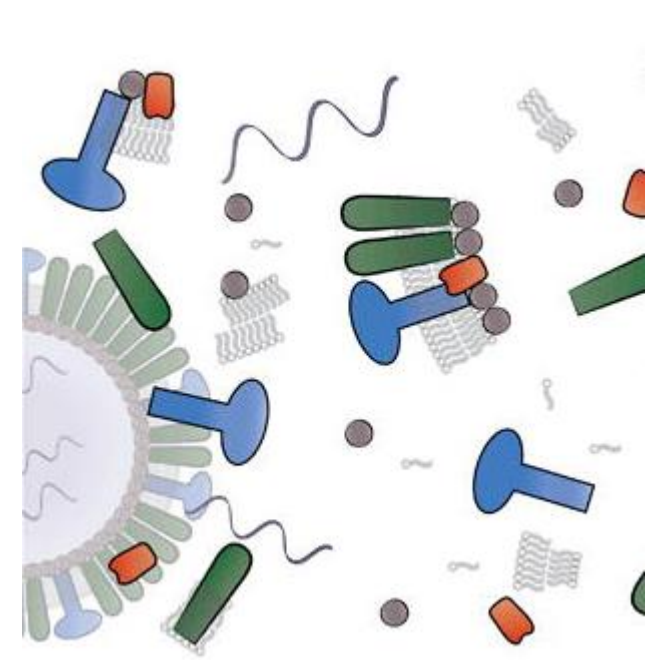


Dělí se na

- **Proteinové** z povrchového proteinového antigenu viru hepatitidy *B* (*HBsAg*) a acelulární vakcína proti pertusis (*aP*)
- **Polysacharidové** *Pneumo23*, která chrání proti 23 typům pneumokoků
- **Konjugované** konjugace s proteinem zvyšuje imunogenitu, např. s DT a TT *Haemophilus influenzae* (*Hib*) nebo sedmivalentní (*PCV-7*), desetivalentní (*PCV-10*) nebo třináctivalentní (*PCV-13*) pneumokový konjugát proti pneumokokové infekci

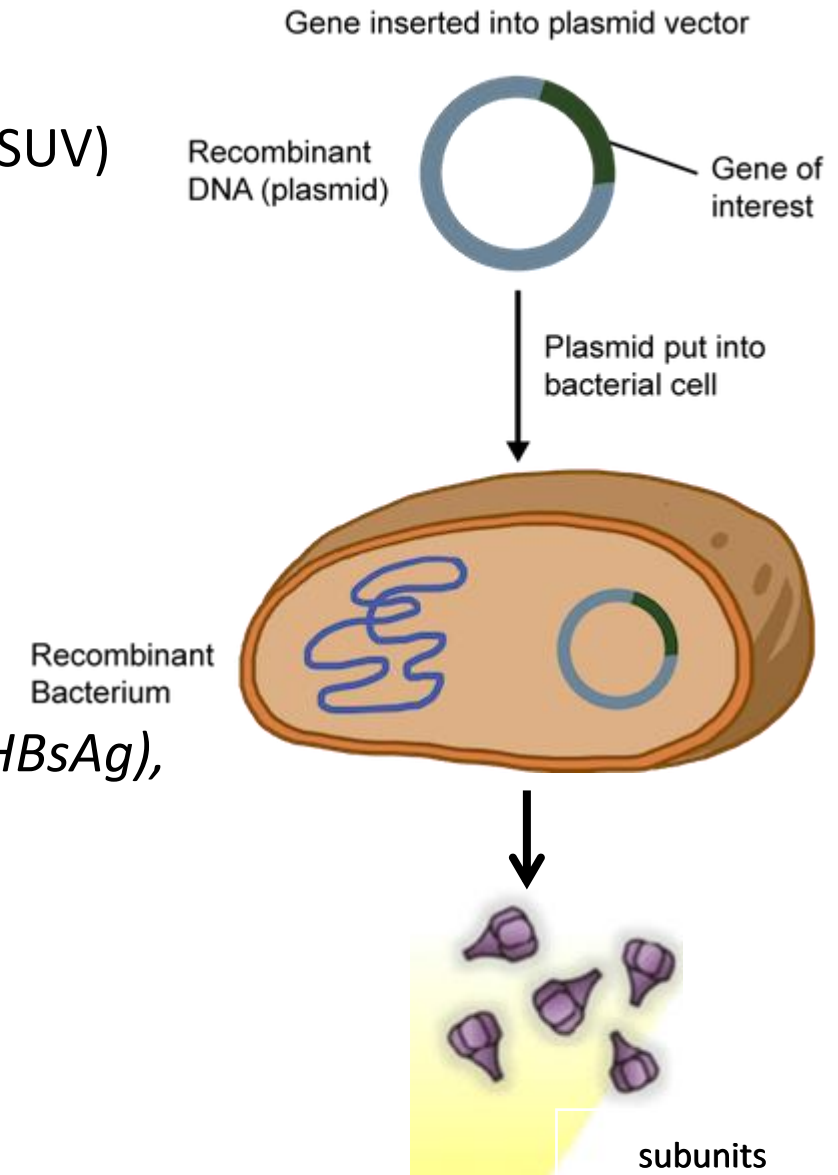
Štěpné vakcíny (SV)

- Obsahují pouze komponenty chřipkových virů
- *hemagglutinin (H), neuraminidázu (N), RNA a nukleoproteiny*
- Ke štěpení dochází organickým rozpouštědly
- Nemohou způsobit infekční onemocnění
- Jsou účinnější než SUV
- Reaktivita nízká
- Imunogenita přijatelná
- Díky mutacím viru je třeba opakovat
- Používají se při výrobě vakcín k prevenci *chřipky*



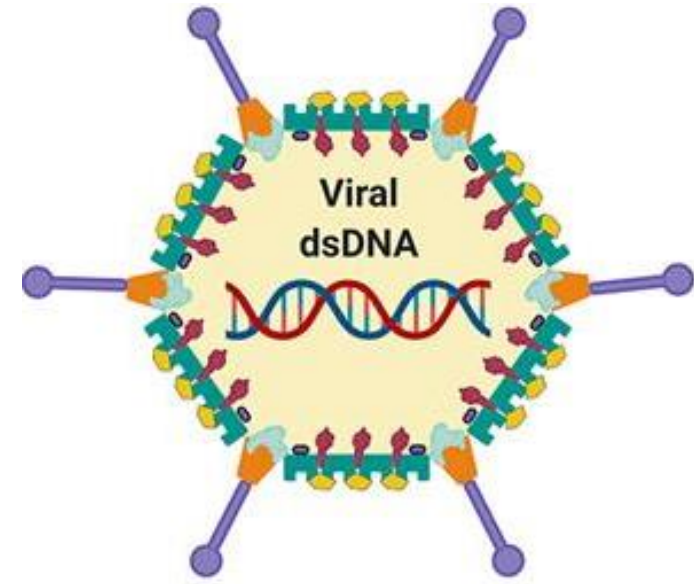
Rekombinované (RV)

- Obsahují zpravidla virové částice, resp. fragmenty (podobně jako SUV)
- Jsou produkovány metodami genového inženýrství
- Produkce kvasinka, *Escherichia coli* nebo savčí buňky
- Odpadá nutnost kultivace patogenu
- Po kultivaci štěpení a chromatografické čištění
- Obvykle inaktivace formaldehym a absorpce na hydroxid hlinitý
- Obecně platí to co u SUV
- Z komerčních vakcín: rekombinantní vakcína proti *hepatitidě B* (*rHBsAg*), vakcína proti *lidskému papilomaviru* (HPV)



Vektorové (VV)

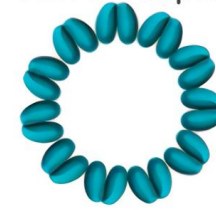
- Antigen vpraven do nepatogenního mikrobu
- Virové vektory: adenoviry, poxviry, herpes viry, pikornaviry, cytomegaloviry a RNA retroviry a flaviviry
- Nejčastěji *Vaccinia virus* (pojme až 30 genů)
- Z řady bakterií: *Typhimurium*, *Clostridium* nebo *Salmonela*
- Replikují se v buňce
- Na povrchu se vytváří epitop, vzbuzující imunitu
- Vyvolávají humorální i buněčnou imunitu
- V podstatě platí co pro LAV nicméně nevyvolají infekci
- Odpadají purifikační technologie
- Obvykle stačí jedna dávka
- Například *lidské (ad5) a opičí (ad26) adenovirové vektory Sputnik V (Covid 19)*



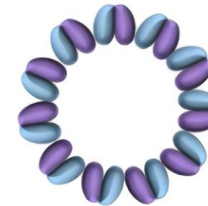
Virům podobné částice (VLP)

- Struktury o rozměrech 30-90 nm
- Produkovány r-bakteriemi a r-*krvasinkami*
- Obdoba výroby SUV
- Vznikají samonaskládáním
- Neobsahují nukleové kyseliny, často ani lipidy
- Obsahují například N a H a jaderné proteiny M1,2
- Nemohou způsobit infekční onemocnění
- Indukce humorální i buněčné imunity
- Nemohou se replikovat (rozdíl of LAV a VV)
- Reaktivita nižší
- Imunogenita přijatelná
- FDA schváleny vakcíny proti *hepatidě B (HepB)* a lidskému *papilomaviru (HPV)*

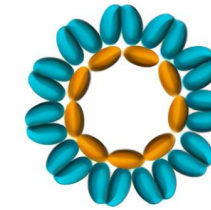
Non-enveloped:



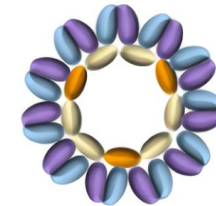
Single layer
1 protein



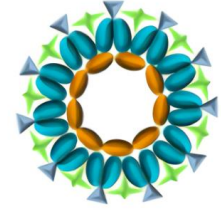
Single layer
2 proteins



Double layer
2 proteins



Double layer
4 proteins



Triple layer
4 proteins

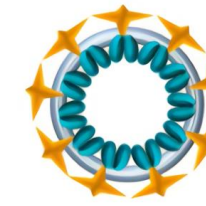
Enveloped:



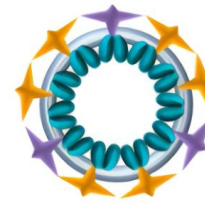
Single layer
1 protein



Single layer
2 proteins



Double layer
3 proteins



Double layer
3 proteins

Perorální rostlinné (PMV)

- Jedná se o obdobu RV
- Hostitelem je transgenní rostlina
- Přenašečem genů je *Agrobacterium tumefaciens*
- Aplikuje se rostlina, např. lyofilizát v enterosolventní tobolce
- Má být zcela bezpečné
- Aktivace střevních M buněk
- Zvýšená aktivita IgA a IgG
- Riziko nízké imunogenity a vzniku tolerance
- V současnosti bylo vyvinuto přes 700 PMV
- FDA schváleno: *B-subunit CTB*, což je *podjednotka B-cholera toxinu*, produkovaná semeny rýže

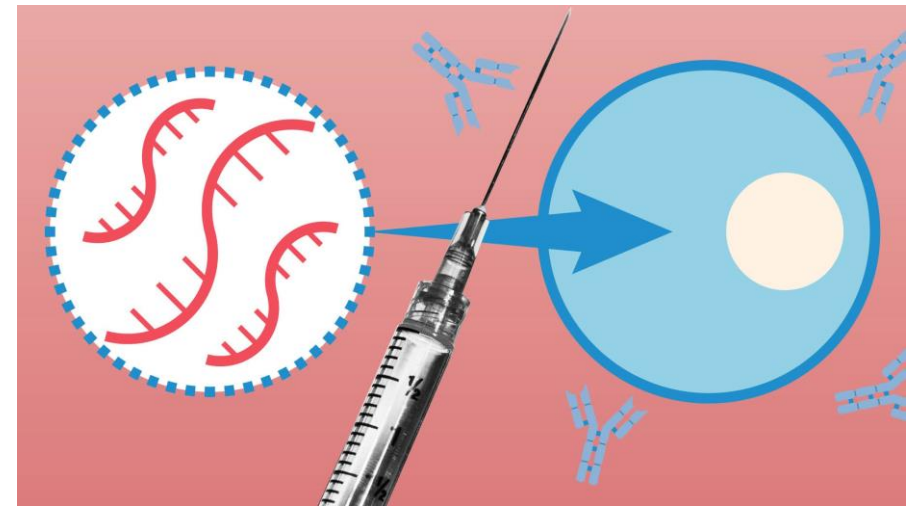


Genové (mRNA/DNA) vakcíny

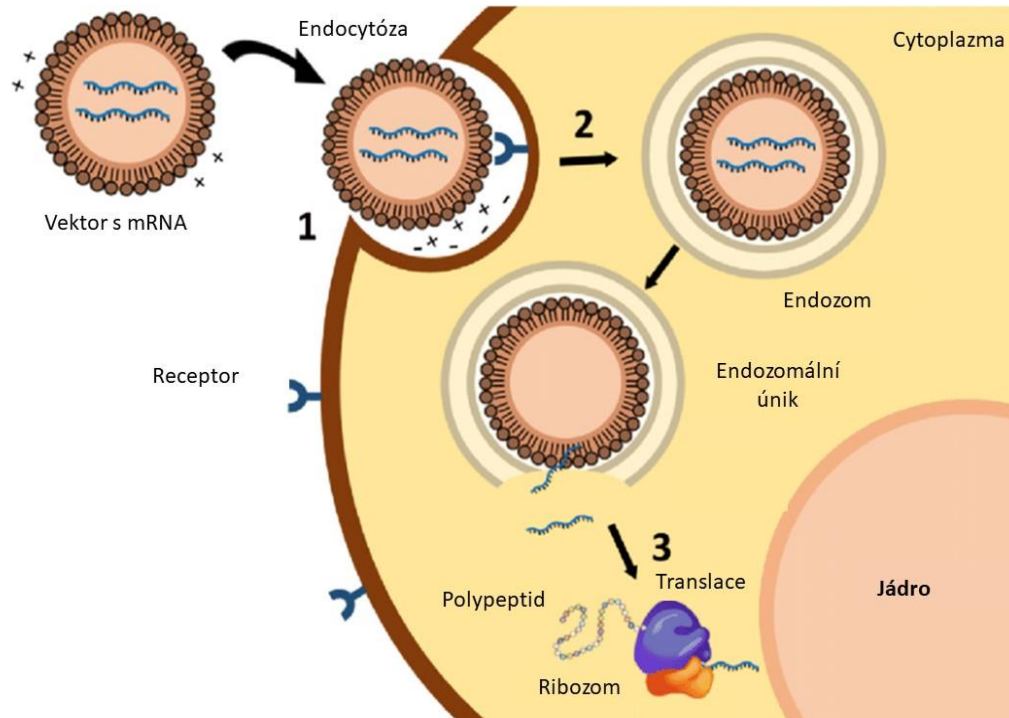
- Vnáší se nukleová kyselina
- Plazmid DNA nebo mRNA
- V ribozomech syntéza proteinu
- Vzniká epitop na povrchu

(aktivace T-buněk a B buněk), případně vzniká i protilátka

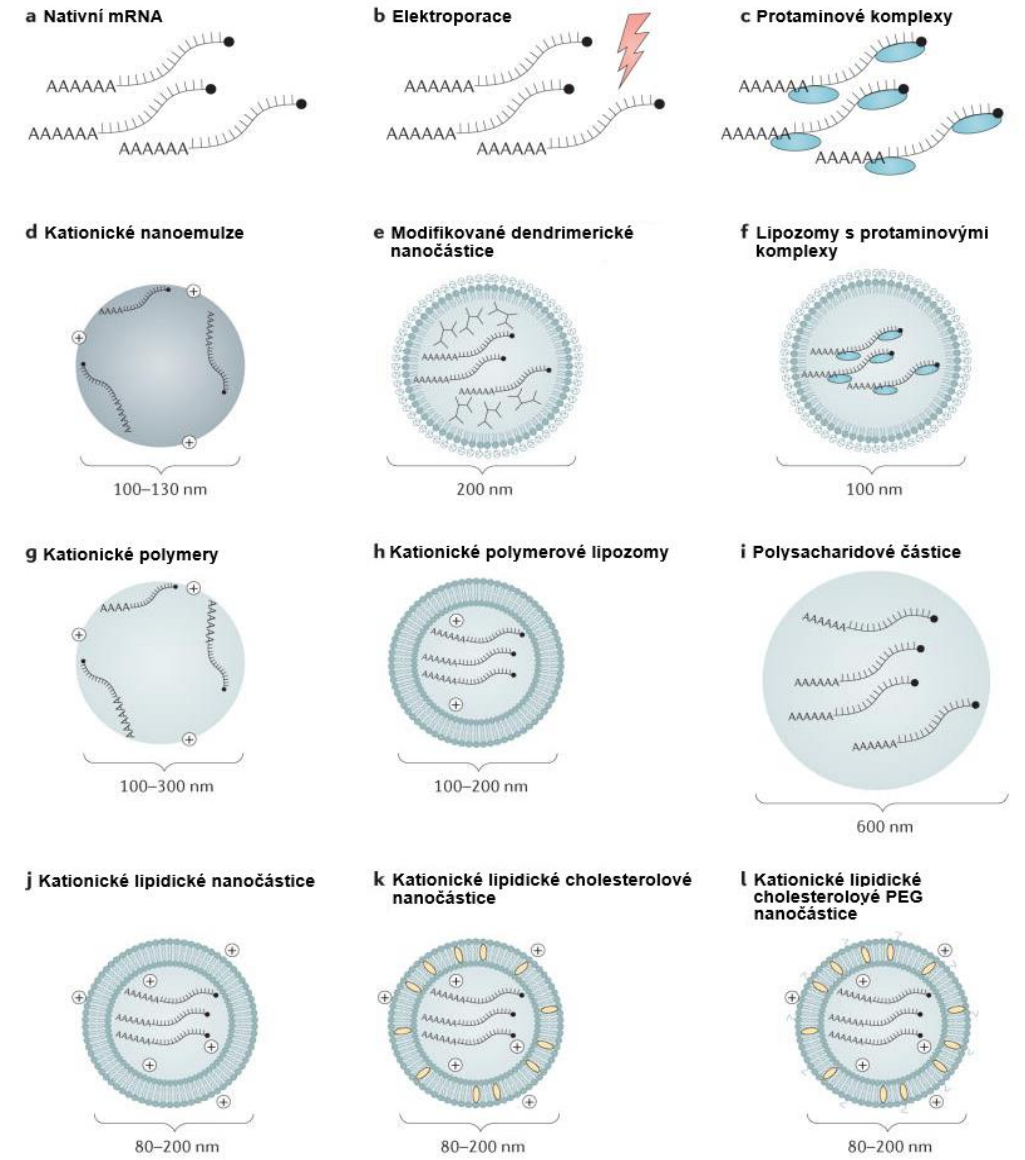
- mRNA obchází jádro
- Možnost zasáhnout nemutující části virové RNA
- Příslib možnosti jediné dávky
- Reaktivita (údaje se liší) někdy je třeba imuno adjuvantu
- Zatím chybí dlouhodobé klinické hodnocení na člověku
- Potenciální genetické ovlivnění, autoimunita? (Ojedinelé teoretické námitky)
- Řada vakcín na *Covid-19*, v klinice *Zika*, *HIV*



Transportní systémy genových vakcín



Mechanismus transfekce (dle Gómez-Aguado et al.)



Translační systémy mRNA (dle Pardi et al.)

Souhrn jednotlivých typů a jejich použití

Typ vakcíny	Zkratka	Příklady
<i>Inaktivovaná</i>	KAV (killed antigen vaccine)	wP, IPV, cclIV3, eIPV, JE-MB, JE-VC, ViCPS
<i>Oslabená</i>	LAV (live attenuated vaccine)	LAIV, LAIV4, BCG, OPV, YF
<i>Subjednotková</i>	SUV (subunit vaccines)	aP, HBsAg
<i>Konjugovaná</i>	CV (conjugate vaccine)	Hib, PCV-7, PCV-10, PCV-13
<i>Štěpená</i>	SV (splitting vaccines)	TIV, QIV, IIV
<i>Toxoid</i>	T (toxoid)	TT, DT, DTP, Td, DTaP
<i>Rekombinantní</i>	RV (recombinant vaccines)	RIV3, RZV, rHBsAg, HPV
<i>Perorální rostlinná</i>	PMV (plant made vaccines)	CTB
<i>Virům podobné částice</i>	VLP (virus like particles)	HepB, HPV
<i>Vektorová</i>	VV (vector vaccines)	YFV 17D* SARS-COV-2**
<i>Genová**</i>	DNA/RNA	ZIKV, HIV SARS-COV-2

Složení injekčních vakcín



- **Antigen:** viry, bakterie, štěpné produkty, toxoidy, nukleové kyseliny
- **Pufry:** fosfátové, sukcinátové, boritanové včetně histidinu a trometamolu
- **Smáčedla:** polysorbáty – Tween 20 a 80
- **Konzervanty:** thiomersal, fenol, fenoxyetanol, benzethonium chlorid
- **Stabilizátory:** síran a chlorid hořečnatý, laktóza, sacharóza, manitol, dextróza, želatina, glycin, glutamát
- **Imuno adjuvanty:** hydroxid hlinitý, fosforečnan hlinitý, síran hlinito draselný, olejové emulze, ISCOM
- **Antibiotika:** neomycin, polymixin, streptomycin, gentamycin, kanamycin a chlortetracyklin
- **Zbytky z kultivace:** proteiny, nukleové kyseliny, antibiotika, konzervanty, formaldehyd, glutaraldehyd

Imuno adjuvanty

Druh vakcíny	Antigen	Adjuvant
LAV	variola, polio, morbili, parotitis, rubeola, poxvirus, rotavirus, <i>Shigela</i> , influenza, YF, TBC, typhus	NE
KA	polio, japonská encefalitis, hepatitis A, influenza, rabies, pertussis	ANO/NE
T	tetanus, anthrax, difterie	ANO
SUV polysacharidová	pneumokok pro dospělé a DT	NE
SUV konjugovaná	pneumokok pro děti, haemophilus B, bakteriální meningitis	ANO/NE
SUV proteinová	pertussis	ANO/NE
VLP	hepatitis B, lidský papilomavirus	ANO
mRNA/DNA	Covid-19	ANO/NE
VV s DNA	Covid-19	NE

Lékové formy

Transdermalia (BCG)

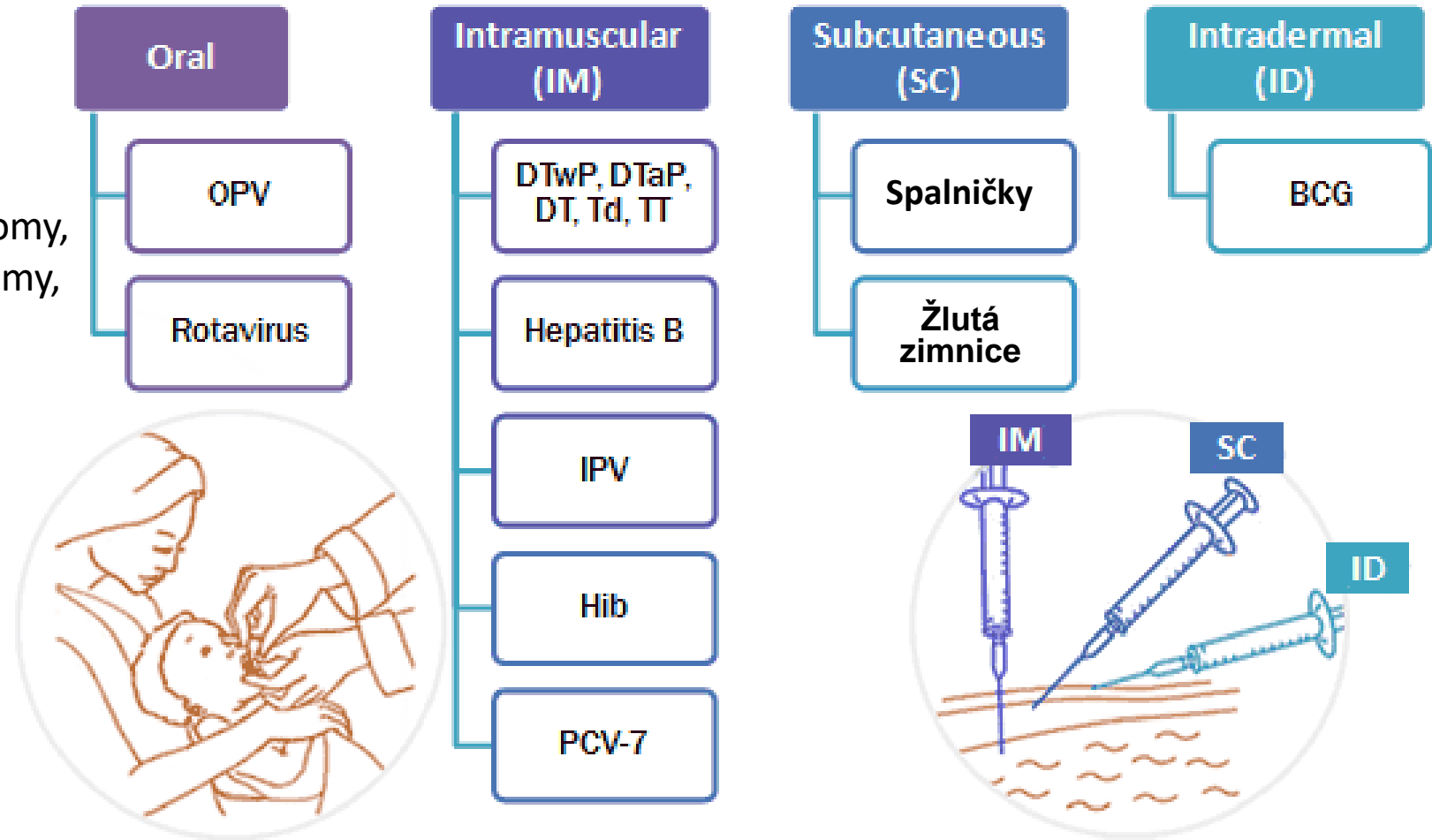
ultrazvuk, iontoforeza, mikrojuhely, liposomy, pevné nanoemulze, transferosomy, etosomy, kubosomy, niosomy, disperze v oleji

Nasalia (LAIV A, B)

mikročástice obalené membránou (OMP), liposomy, imunostimulační komplexy (ISCOM) nebo například mikročástice na bázi PLGA

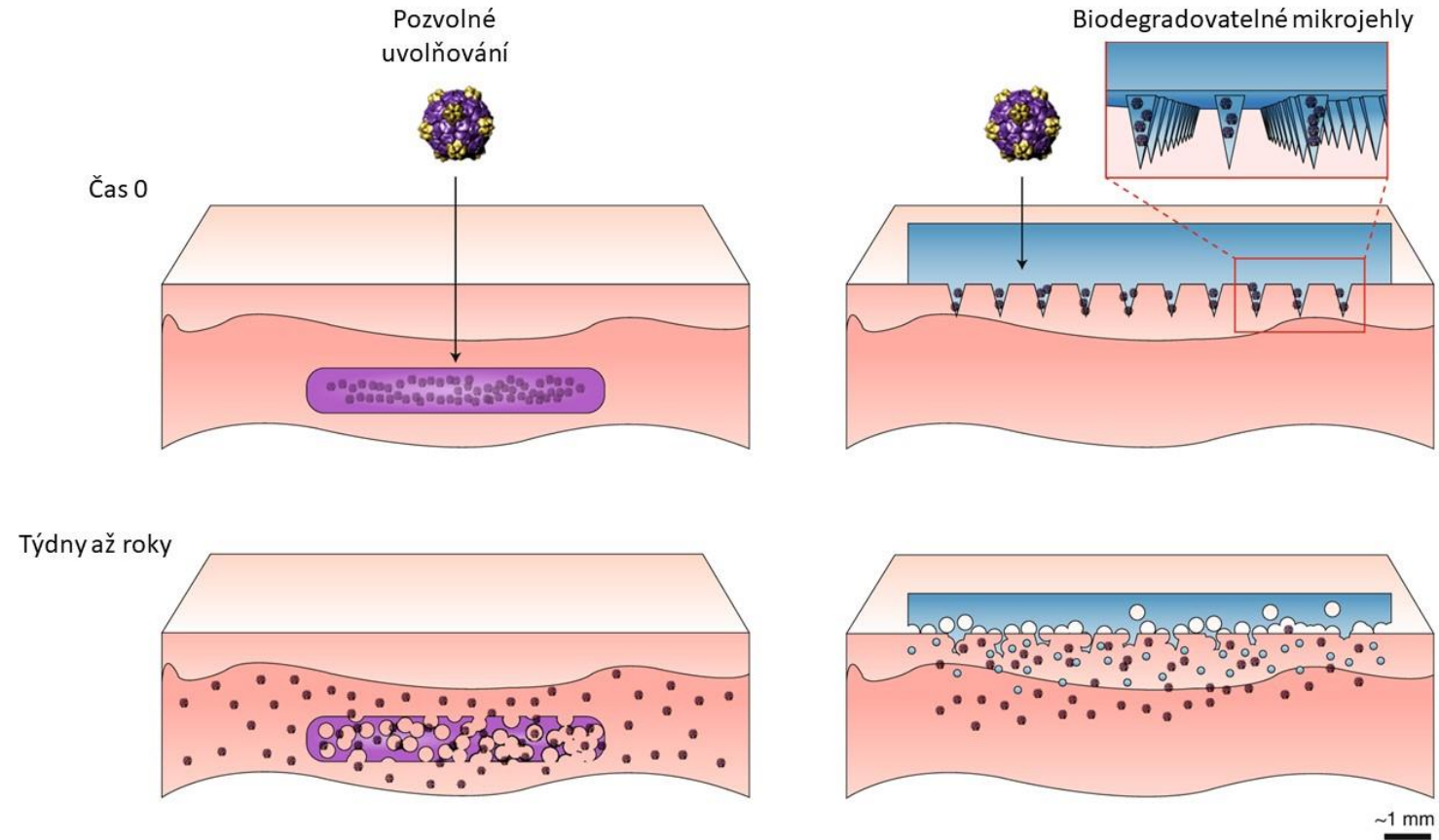
Peroralia (OPV, Ty21A)

niosomy, liposomy, bilosomy, ISCOM, polymerní mikročástice (MPs) a nanočástice (NPs) z PLA a PLGA, fosfolipidů, chitosanu ad. Částice pak mohou být obaleny enterickými nebo kolonickými polymery (Eudragit FS)



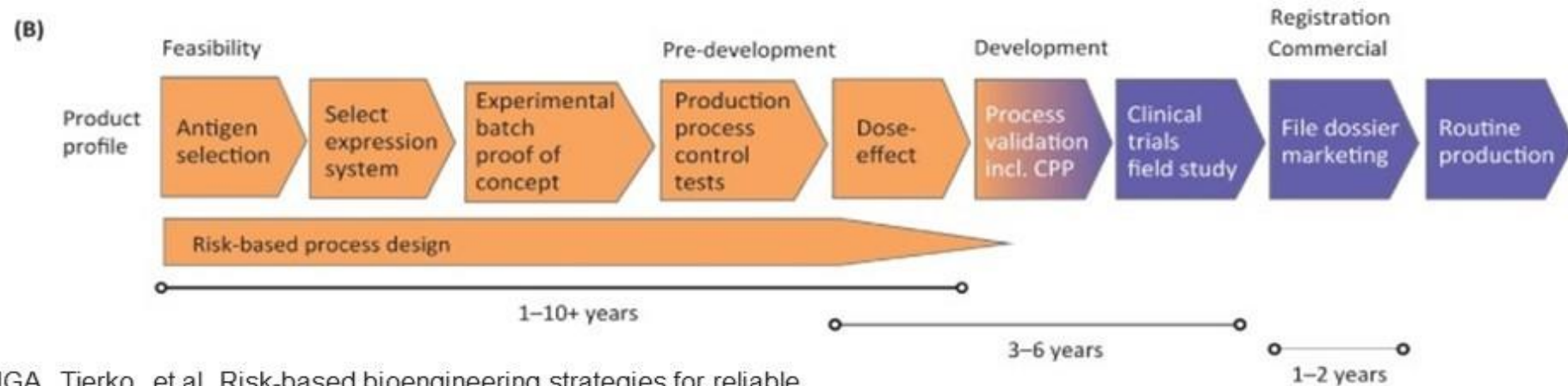
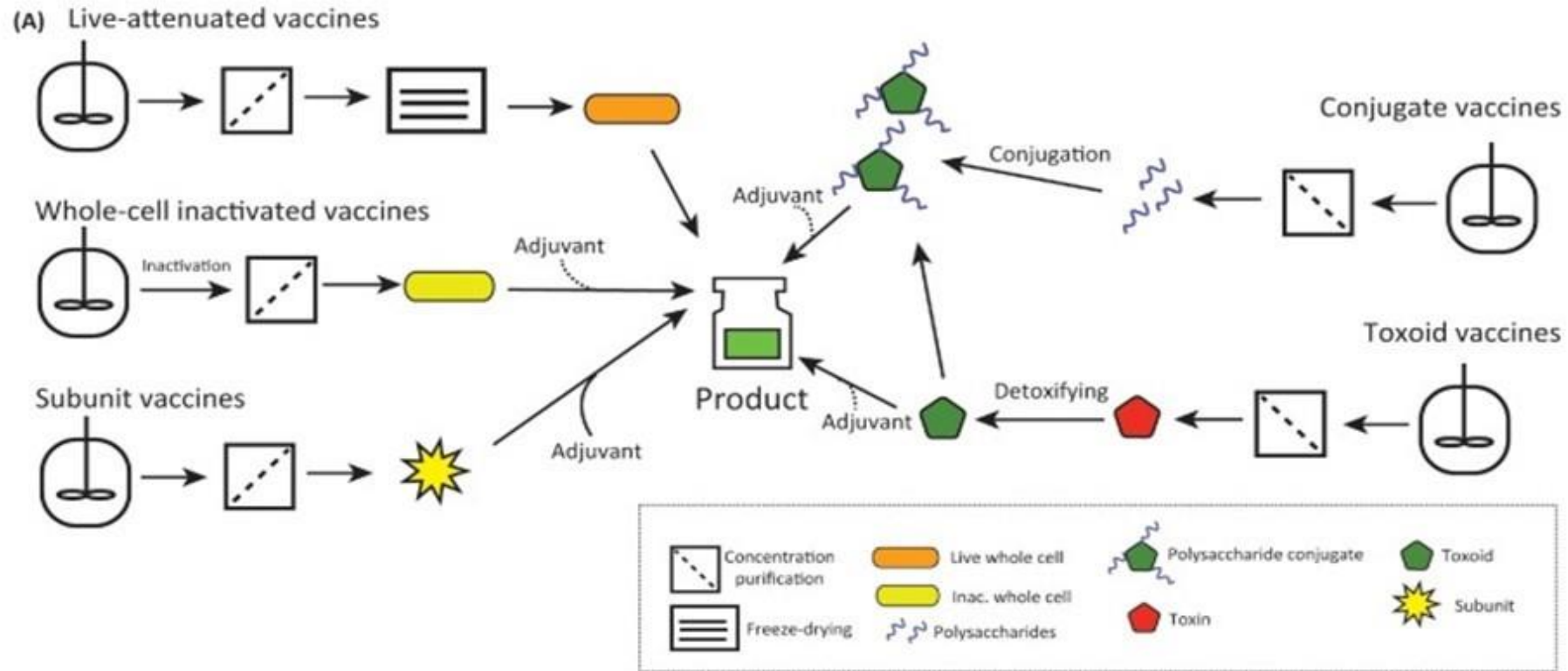
Zdroj: WHO – Vaccine Safety Basic

Lékové formy



Možné způsoby aplikace řízeného uvolňování vakcín (dle Shin et al.)

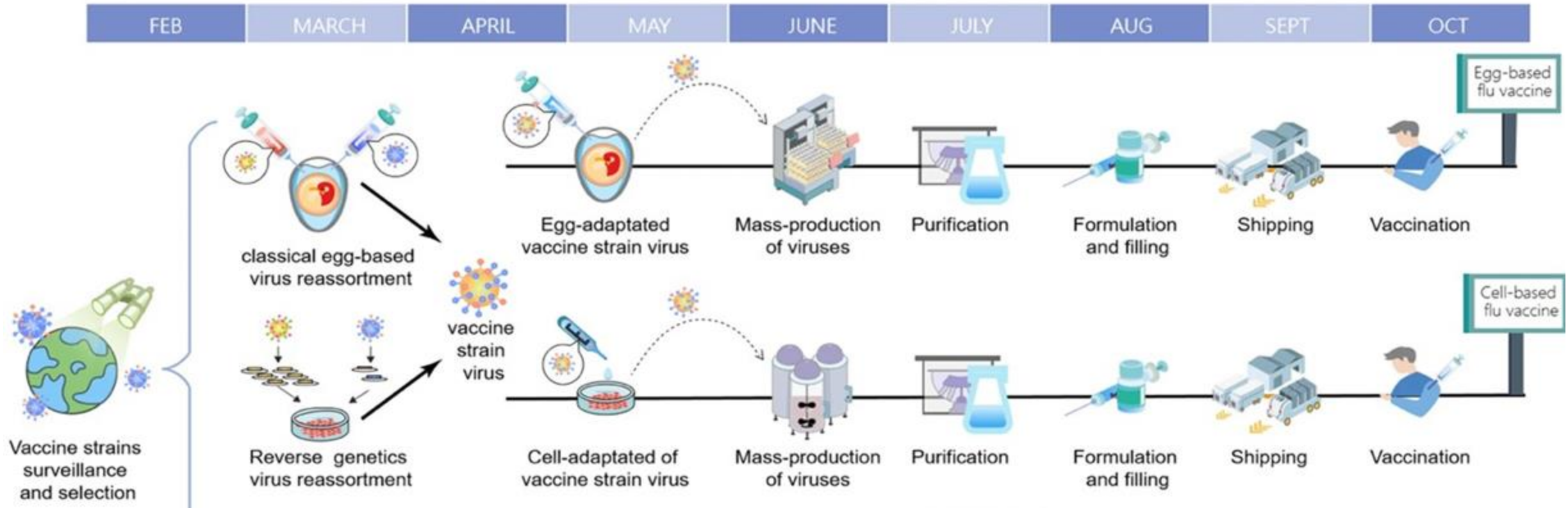
Principy výroby



Zdroj: KAMMINGA, Tjerko, et al. Risk-based bioengineering strategies for reliable bacterial vaccine production. *Trends in biotechnology*, 2019, 37.8: 805-816.

Principy výroby

Výroba vakcín proti chřipce



Zdroj: CHEN, Juine-Ruey, et al. Better influenza vaccines: an industry perspective. Journal of Biomedical Science, 2020, 27.1: 1-11.

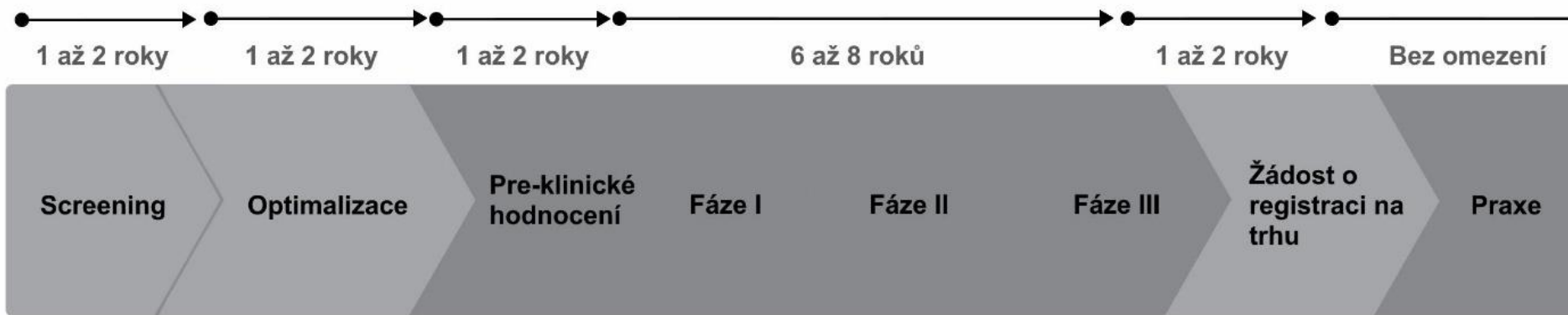
Hodnocení vakcín

- **Identifikace a izolace antigenu** (preklinika a vývoj lékové formy)
- **Klinické hodnocení:**
 - I. Fáze (cca 10 - 100) hodnotí se bezpečnost a imunogenita (tolerovaná dávka)
 - II. Fáze (cca 100 – 1000 jedinců) hodnotí se vedlejší účinky a dávkování (dávkovací schéma)
 - III. Fáze (cca 1 000 – 10 000 jedinců, mezinárodní multicentrické studie) hodnotí se klinická účinnost
 - IV. Fáze – postregistrační - sledují se nežádoucí účinky a hodnotí se následné klinické studie
- **Stabilita:** zrychlená a dlouhodobá
- **Vybrané lékopisné zkoušky:** pH, obsah hliníku a vápníku, formaldehyd, fenol, endotoxiny
- **Zavádění do výroby:** (PAT technologie, QbD a MVDA)
- **Registrace:** kompletace a posouzení orgány (administrativní fáze, do roka)
- **Celková doba vývoje:** 8 – 20 let (mezní hodnoty)



Zdroj: EMMA Int. Cons. Group

Obecné schéma klinického hodnocení



Testování konceptu
Předběžné hodnocení bezpečnosti

TOXICITA	BEZPEČNOST	DÁVKA	ÚČINNOST	SCHVÁLENÍ	POUŽÍVÁNÍ
Farmakologický profil	Tolerance	Biologická aktivita	Potvrzení terapeutického účinku	Rozhodnutí na základě získaných dat o kvalitě bezpečnosti a účinnosti	Rutinní sledování bezpečnosti a účinnosti
Analytické metody	Tolerované rozmezí dávky	Stanovení optimální dávky	Bezpečnostní profil		
Stabilita	Typ a rozsah imunitní odpovědi	Terapeutický účinek	Dlouhodobé nežádoucí příhody		

Délka vývoje bezpečné a účinné vakcíny včetně klinického hodnocení - celkem cca 10 – 16 let (dle Chmelíka, 2014)

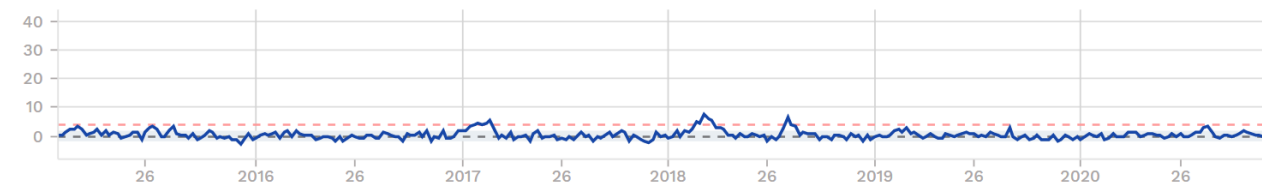
Výzvy ve vakcinaci

- **Influenza:** cca 300 000 – 600 000 úmrtí ročně; Úspěšnost vakcinace se zde odhaduje na 10 – 60 %
- **TBC:** až 1 700 000 ročně umírá; infikováno až 25 % populace; 10 000 000 nových případů, projevy u 5 – 10%
- **RSV:** cca 60 000 úmrtí dětí do 5 let; 3 000 000 hospitalizací
- **Malárie:** 770 000 úmrtí; 38 000 000 infikovaných

Spain



Germany (Berlin)



Sezónní úmrtnost za posledních pět let, zahrnující vlny podzimních a jarních respiračních nákaz <https://www.euromomo.eu/graphs-and-maps>

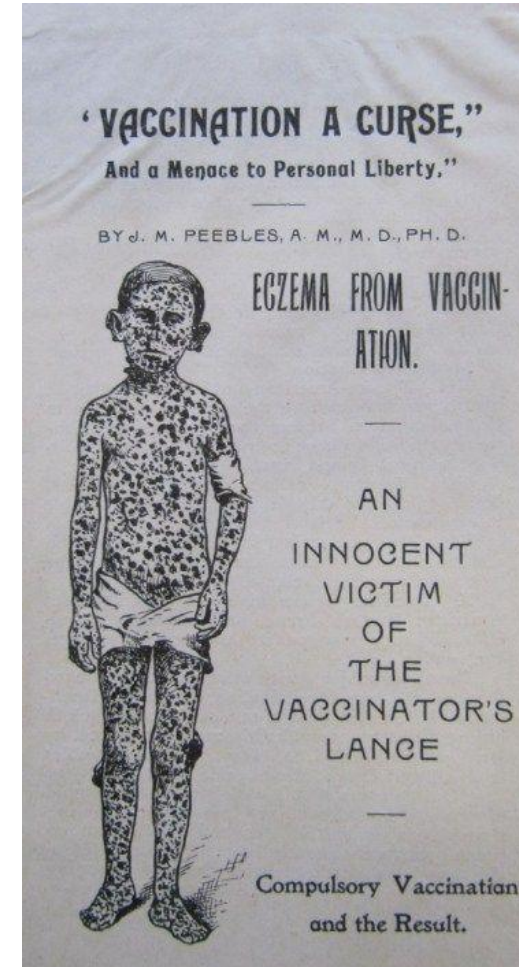
Kontraindikace

- **Těžká anafylaktická reakce po předchozí dávce či jakékoli složce vakcíny**, obvykle BCG, DTwP, DTaP, OPV, IPV, HepB, rotavirus, morbillivirus, HiB, PCV-7 a YF; reziduální proteiny, antibiotika, případně konzervanty, vaječný protein
- **Autoimunní onemocnění nebo těžší průjemové a virového respiračního onemocnění**
- **Vakcíny v graviditě a u nedonošených dětí** je snaha vyhnout se thiomersalu
- **Vakcíny s obsahem pertusové složky**, (např. Infarix[®] a Hexainfarix[®]) v důsledku alespoň týdenní encefalopatie po předchozí dávce, progresivní encefalopatie, progresivní neurologické poruše, včetně infantilních spasmů nebo nekontrolované epilepsie
- **Vakcína proti spalničkám, příušnicím a zarděnkám (LAV)**, např. Priorix[®], případně v kombinaci se složkou proti planým neštovicím (např. Priorix tetra[®]) v případě gravidity a těžkých imunodeficiencí
- **Očkování proti TBC** je kontraindikováno v případě tuberkulózy v anamnéze, positivity tuberkulinového kožního testu, imunodeficience, generalizovaného kožního onemocnění a gravidity



Obvyklé argumenty používané proti vakcínám

- Přítomnost těžkých kovů
- Přítomnost zbytků z kultivace
- Kultivační buňky z lidských embryí
- Změna lidské DNA
- Nedostatečné klinické hodnocení
- Nedobrovolnost vakcinace
- Tlak farmaceutických firem
- Střety zájmů
- Umělá redukce počtu obyvatel



Použitá literatura k přednášce:

- Franc A. *Vakcína z pohledu farmaceuta*. Čes. Slov. Farm. 2020; 69, 151–162
- Franc A. *Jsou vakcíny bezpečné?* Prakt. Lékáren 2020; 16(4) 204-204

Literatura v češtině z oblasti výroby vakcín:

- Benešová E. Fusek M, Hubálková P. *Bioléčiva*. VŠCHT Praha (2. vydání, 2016)

Literatura v češtině z oblasti imunologie:

- Jílek P. *Imunologie stručně, jasně, přehledně* – Grada (2. vydání, 2019)
- Toman M. a kol. *Veterinární imunologie* – Grada (2. vydání, 2009)

