

Ministerul Apărării Naționale



Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare
Medico- Militară „Cantacuzino“

Ziua Imunologiei 2022



Dezvoltarea tehnologiei de obținere a vaccinului gripal convențional

Alina MIHALCEA 2 , Adrian ONU 1, Crina STĂVARU 1, Cătălin ȚUCUREANU 1, Ana ȘERBĂNESCU 1,
Monica IONESCU 3, Floarea DOBOȘERIU 2, Vlad TOFAN 1, Adriana COSTACHE 1, Andreea STOIAN 3,
Mădălina TALPĂU 1, Alina MINEA 2, Monica CIRSTOIU 2, Alexandru ZAVATE 2,
Alexandra CĂPRARU 2, Mihaela DRĂGHICI 2, Claudia URSU 3

INCDMM Cantacuzino, Romania

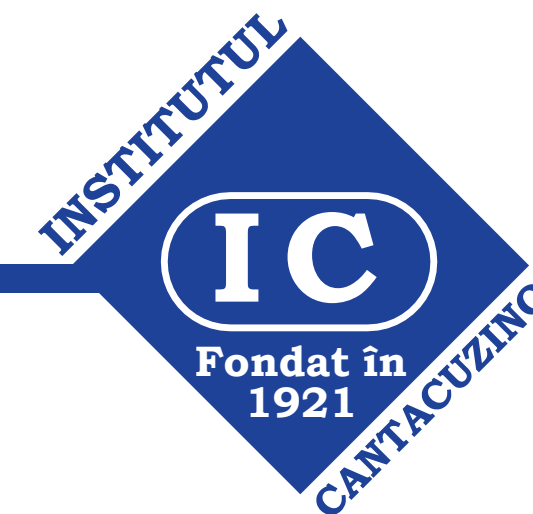
1 Centru de Cercetare-Dezvoltare Tehnologică
2 Structura Fabricație
3 Structura Calitate

Motto: Siguranță pentru viitor





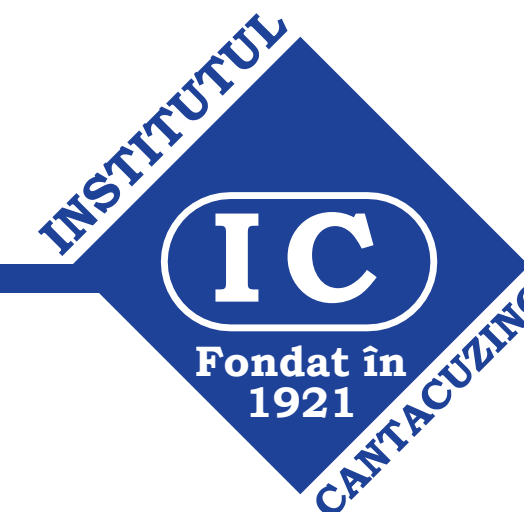
OBIECTIVE



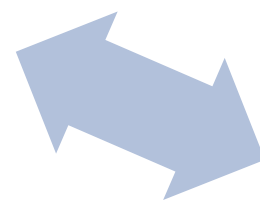
- realizarea unui vaccin stabil, calitativ și eficient, un produs obținut prin tehnologii care să corespund standardelor europene de calitate
- asigurarea prevenția și profilaxia gripei
- posibilitatea de a interveni în caz de epidemie sau pandemie



VACCINUL GRIPAL – CERINȚE



**PROGRES
ȘTIINȚIFIC**

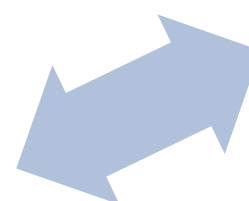


**LEGISLAȚIE/STANDARDE/
REFERINȚE:**

- Legislația europeană – EUDRALEX
- Legislația națională – Legea 95/2006 republicată / Titlul XVIII Medicamentul
- Farmacopeea europeană
- Ghiduri OMS
- Ghiduri ICH
- Ghiduri ISPE
- Standarde ISO

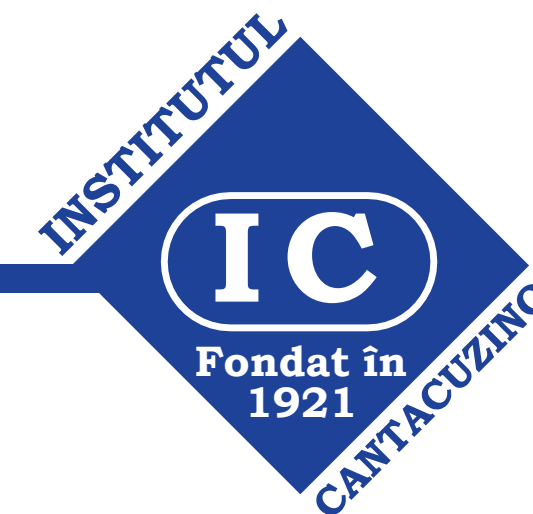


**CALITATE
EFICIENȚĂ
SIGURANȚĂ**





VACCIN GRIPAL CONVENȚIONAL

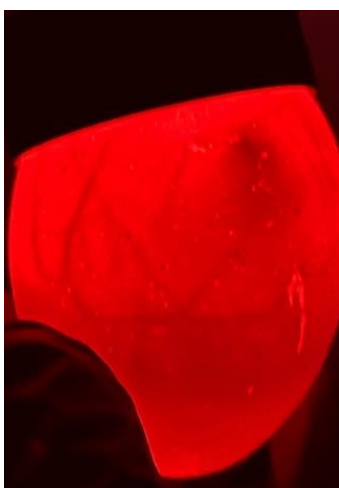


- ✓ Tehnologie bazată pe ouă embrionate de găină
- ✓ Virus gripal purificat zonal (în gradient de sucroză)
- ✓ Virus gripal inactivat
- ✓ Virus gripal fragmentat

**Monografia Ph. Eur. 07/2019:0158 - Influenza vaccine
(split virion, inactivated)**

FLUX TEHNOLOGIC - VACCIN GRIPAL

CREȘTE GRADUL DE PROTECȚIE ASUPRA PRODUSULUI



SĂMÂNȚĂ VIRUS GRIPAL
(cf. rec. OMS și EMA)

INOCULARE OUĂ EMBRIONATE
(diluție virus gripal)

INCUBARE
(multiplicare virala)

RECE
(2 -8°C)

RECOLTARE LICHID ALANTOIC INFECTAT

CLARIFICARE LICHID ALANTOIC INFECTAT
(centrifugare în flux continuu)

PURIFICARE ȘI CONCENTRARE VIRUS GRIPAL
(centrifugare zonală)

INACTIVARE VIRUS GRIPAL
(chimic)

ULTRAFILTRARE
(filtrare în sistem tangențial)

FRAGMENTARE VIRUS GRIPAL
(centr. de separare faze/ ultrafiltrare)

AMESTEC VIRAL MONOVALENT
(filtrare sterilizantă)
A/H1N1, A/H3N2, B

FORMULARE VACCIN GRIPAL
(Cf. PhEur)

DILUENT

AMBALARE PRIMARA
(divizare/umplere recipient de ambalare)

AMBALARE SECUNDARA



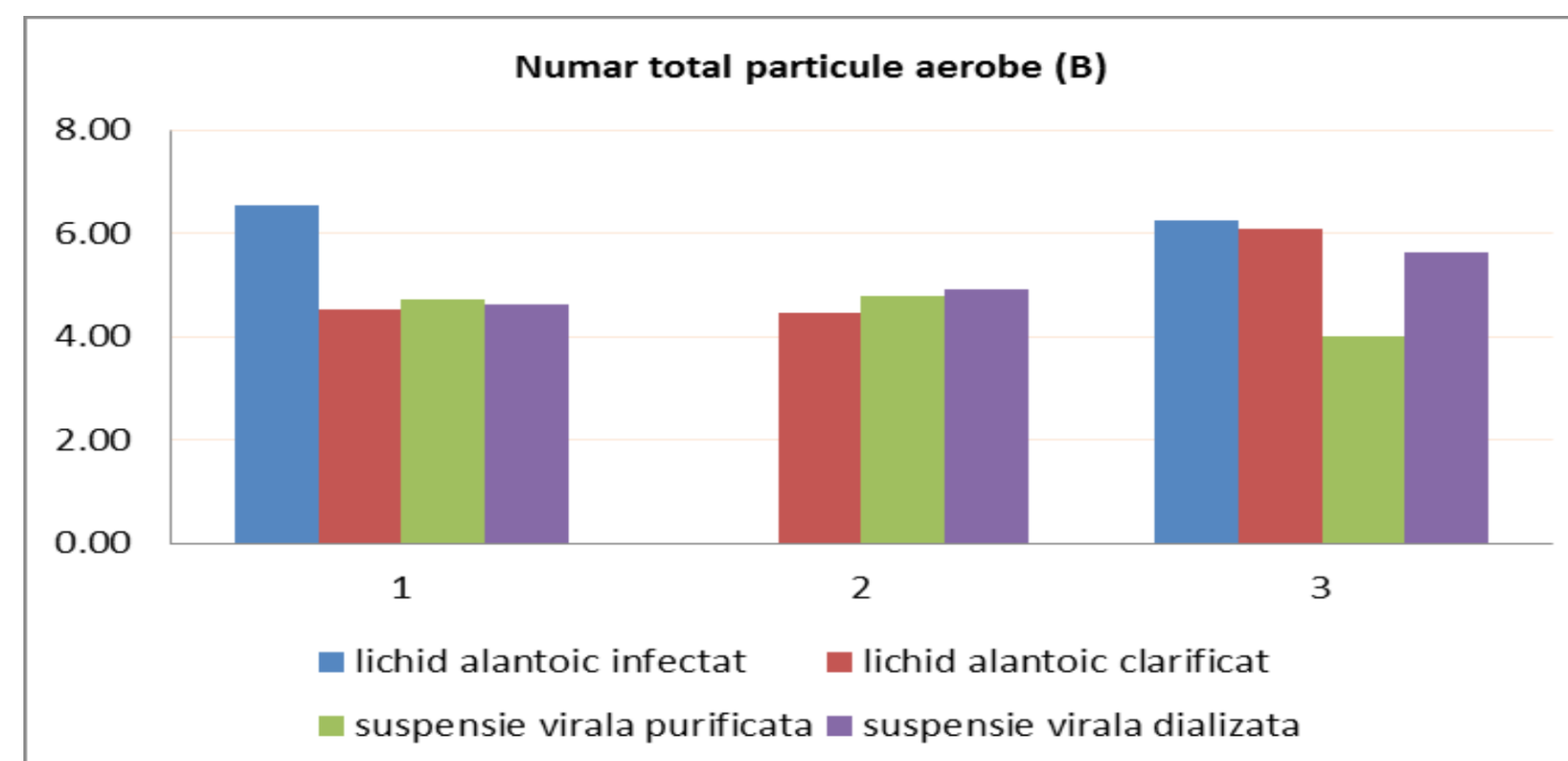
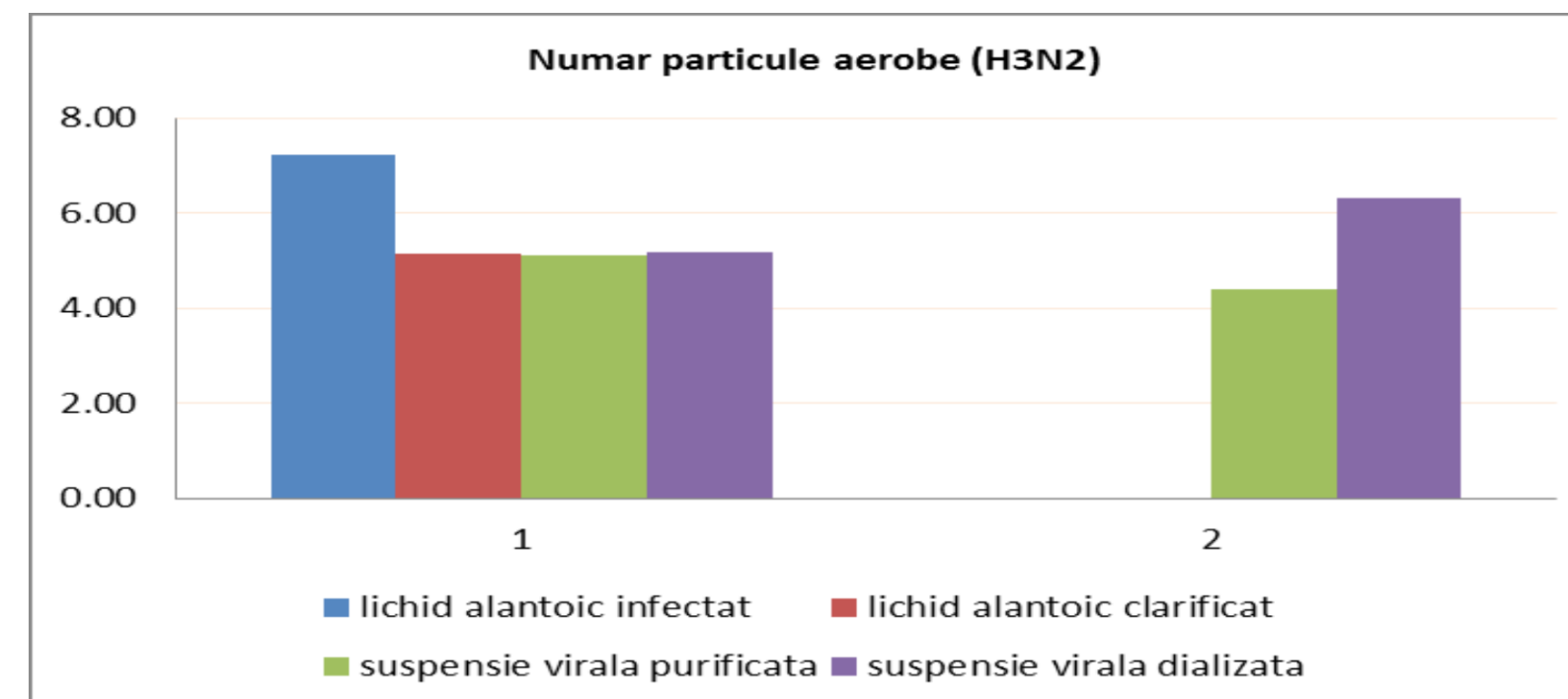
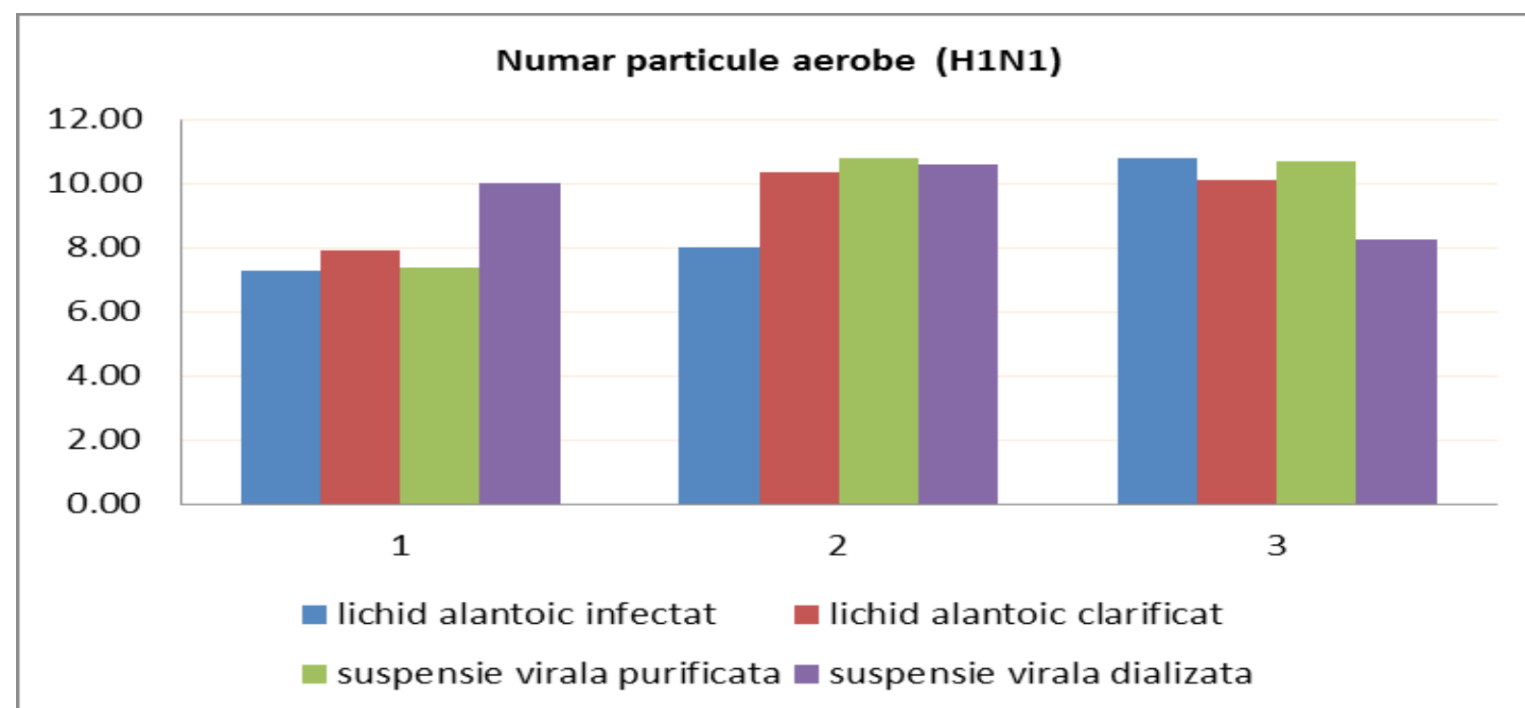
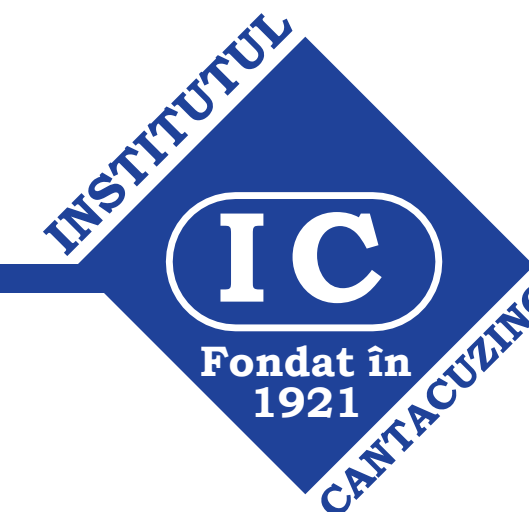
Procese upstream

Procese downstream

Procese de formulare si condiționare

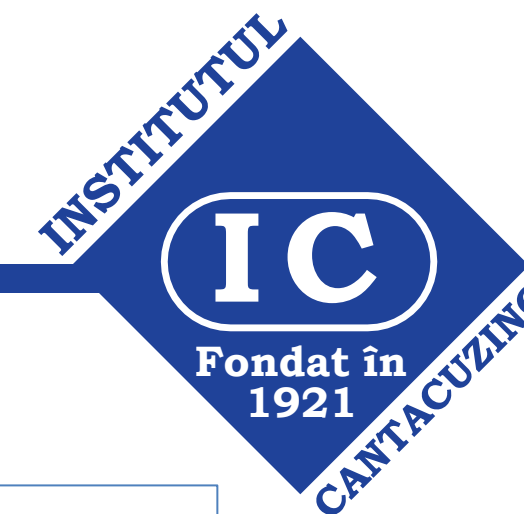


CONTROLUL CONTAMINĂRII MICROBIENE

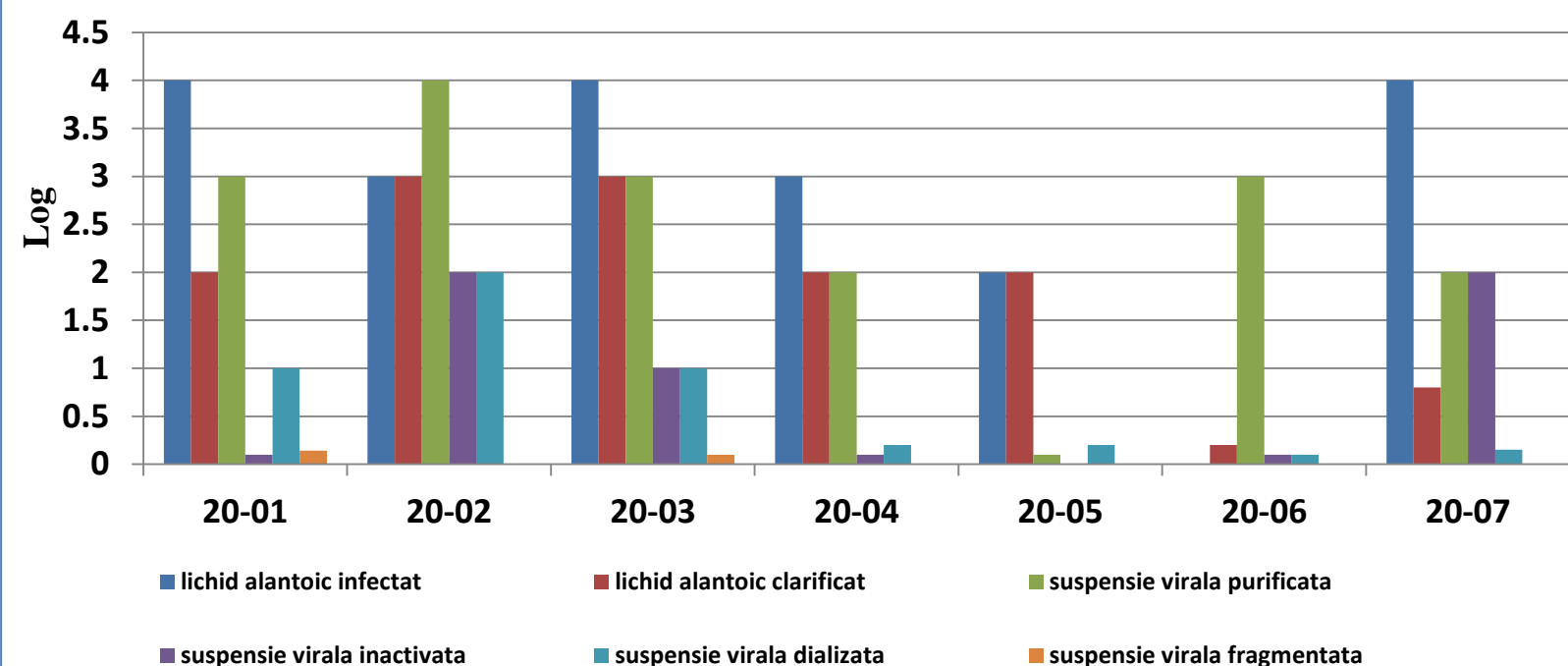




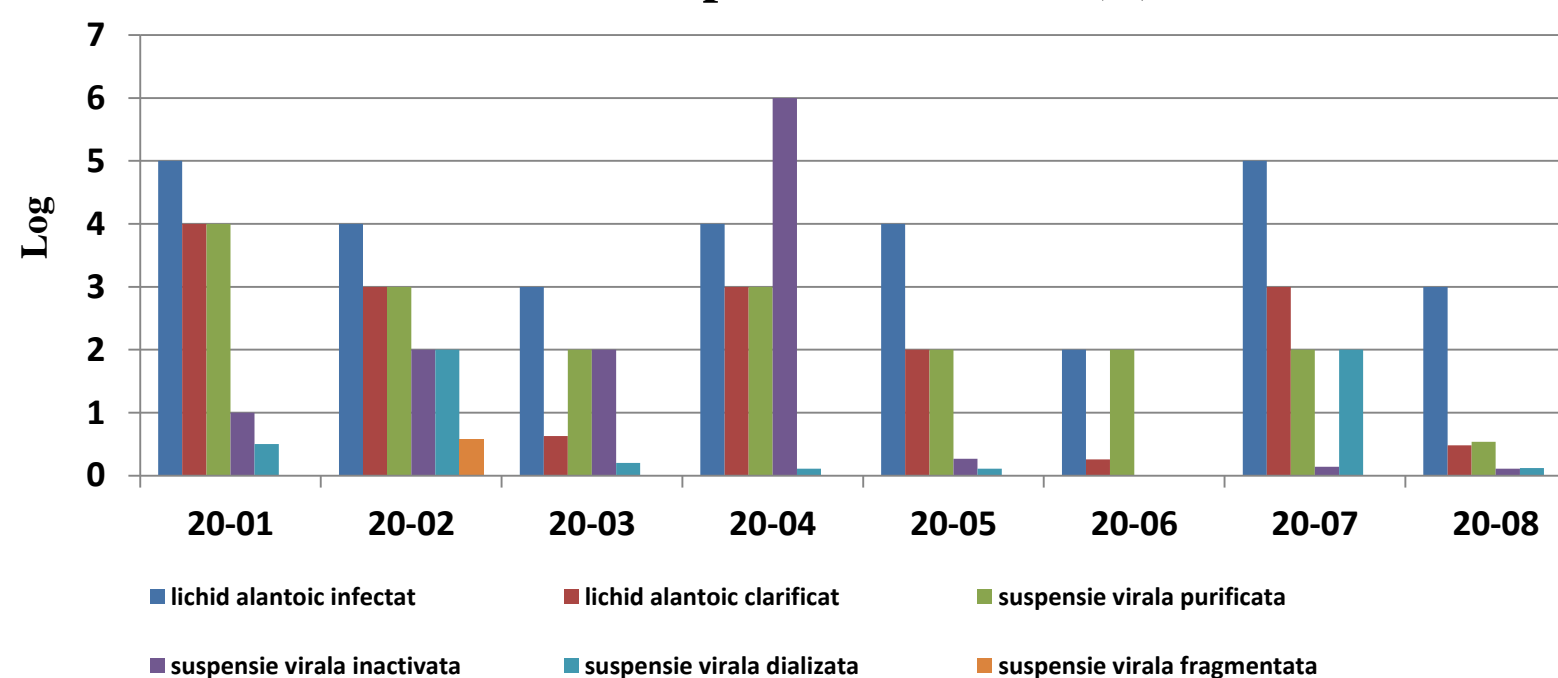
CONTROLUL CONTAMINĂRII MICROBIENE



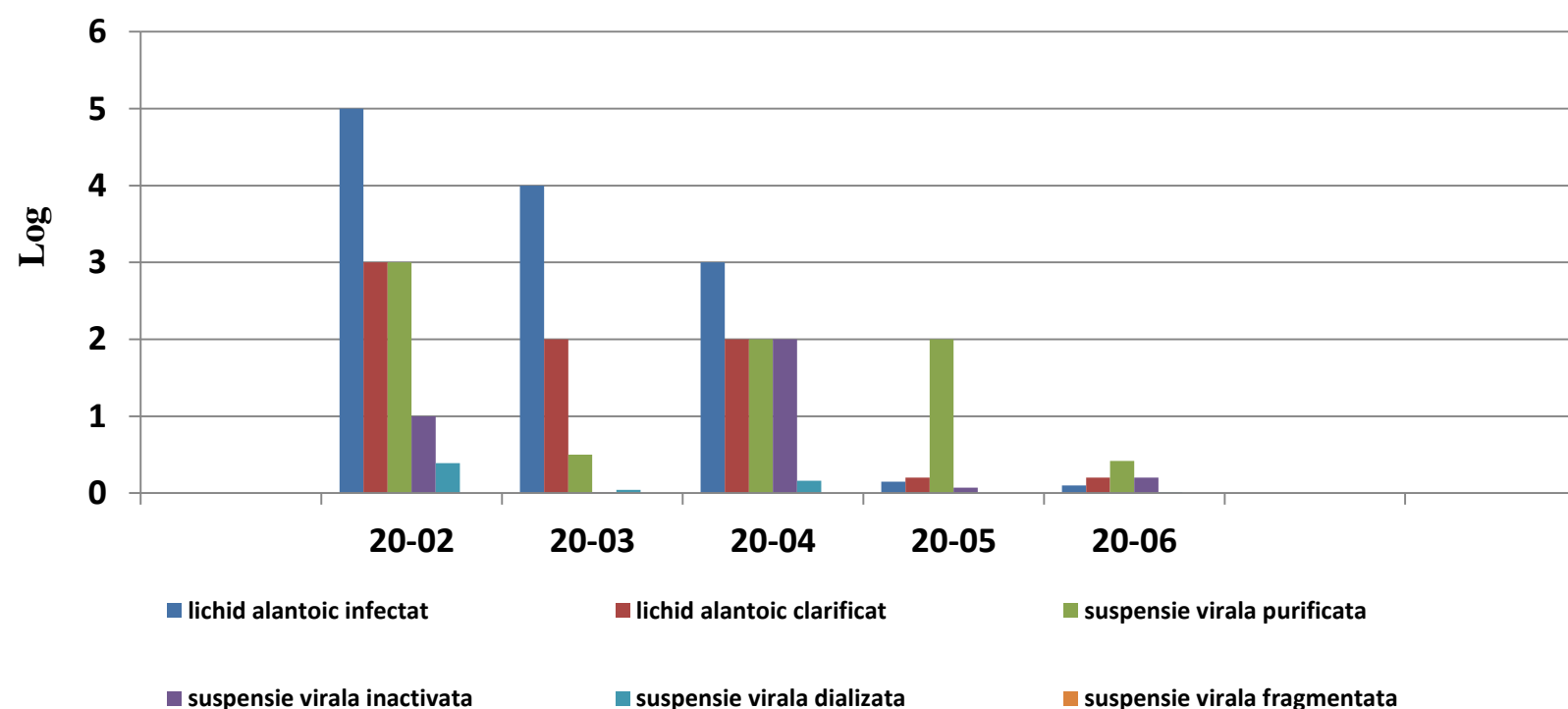
Numar particule aere (H1N1)



Numar particule aere (B)



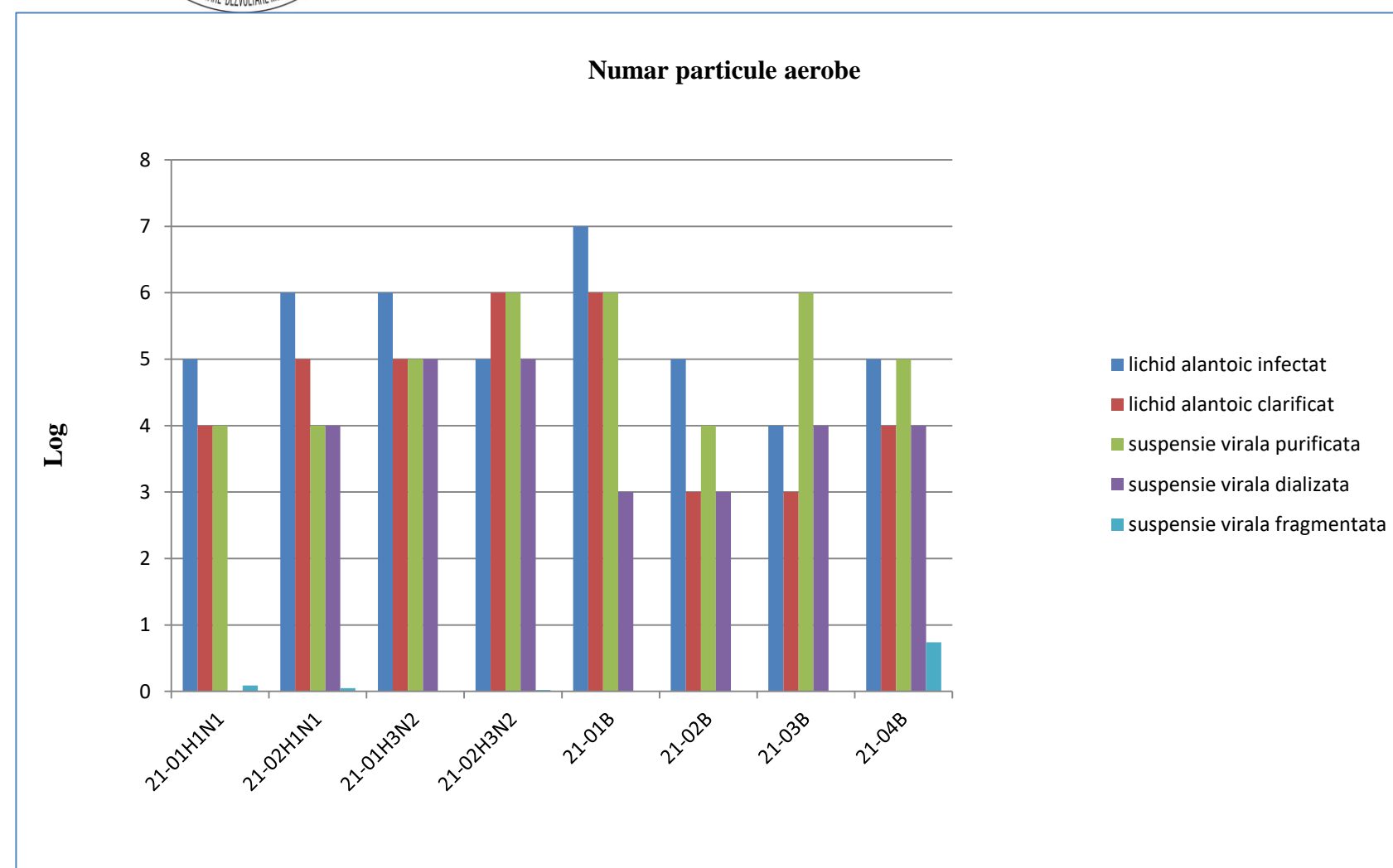
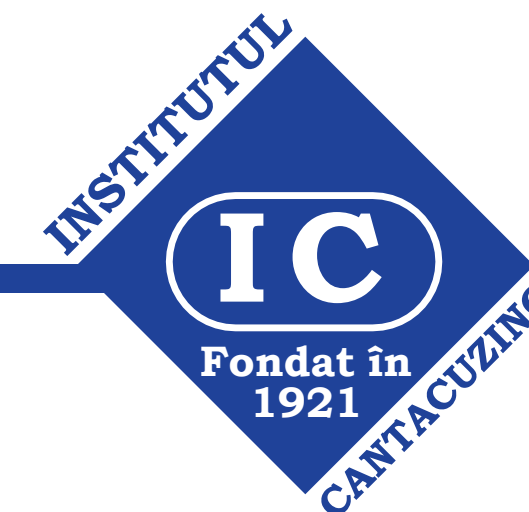
Numar particule aere (H3N2)



Scăderea contaminării microbiene atât de la inițiere cât și pe parcursul fluxului de obținere a substanței active prin optimizarea etapelor tehnologice.
Loturi pilot – 10.000 ouă embrionate.



CONTROLUL CONTAMINĂRII MICROBIENE



Impactul măririi capacității de procesare a produsului pe lot în condiții de *eliminare a tiomersalului* de pe tot procesul de obținere a componentelor monovalente ale vaccinului gripal, asupra contaminării microbiene.

Loturi de capacitate maximă de procesare– 25.000 ouă embrionate.

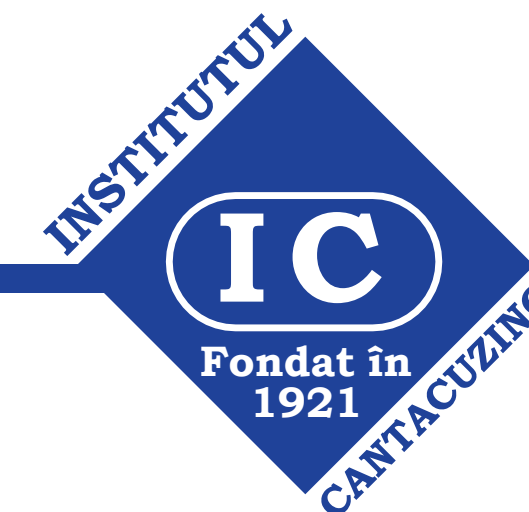
Nivelul de endotoxină per doză în vaccinul gripal experimental – valori în limita specificată de Ph. Eur. pentru toate variantele de vaccin formulat.

Limita de admisibilitate de ≤ 100 UI / doză

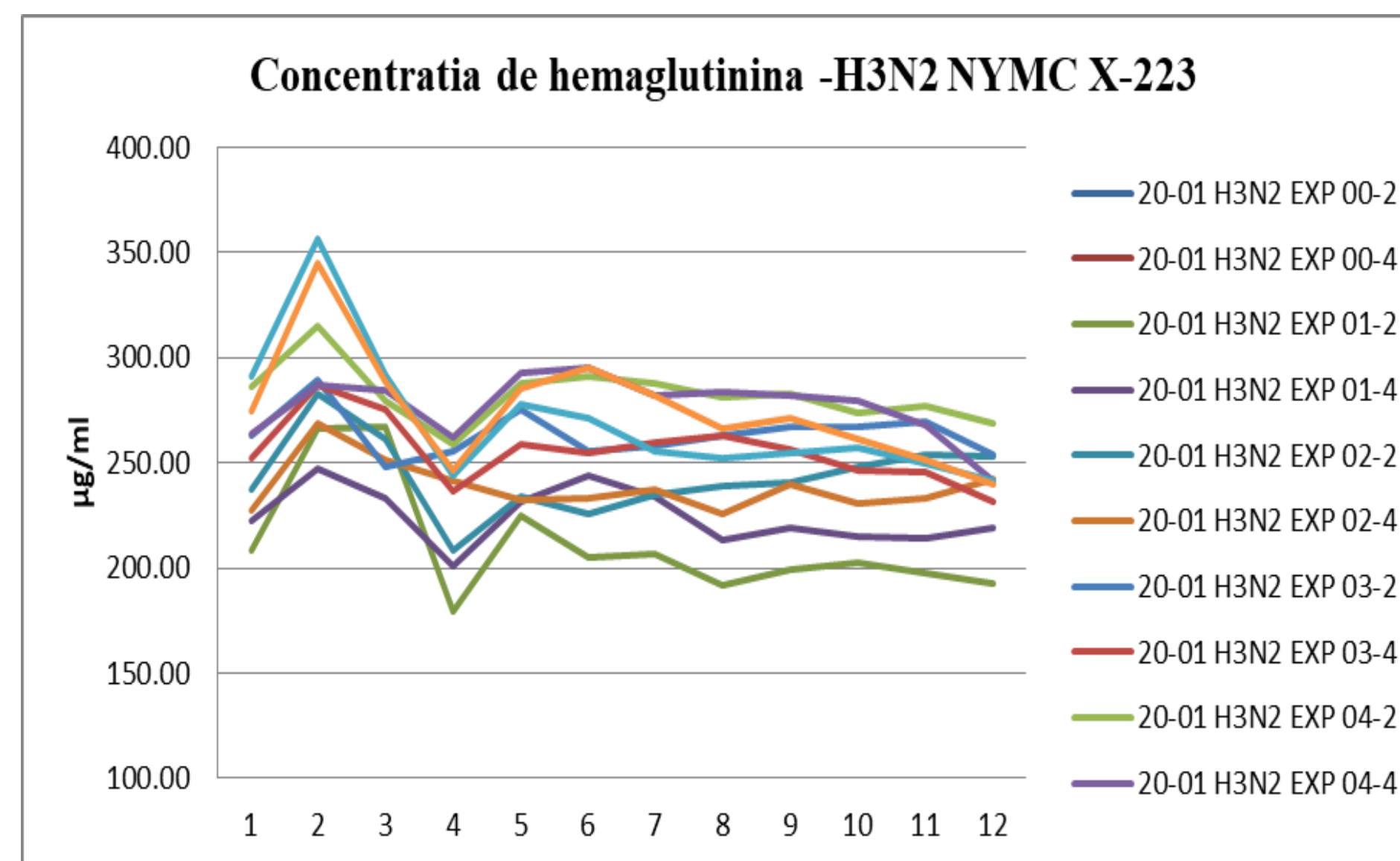
Varianta vaccin experimental	Metoda fragmentare	Endotoxine bacteriene (UI/ doză)
21-01PE1 Trivalent	Tween-dietileter	100
21-01PE2 Tetravalent	Tween-dietileter	25
21-02PE3 Trivalent	Tween-deoxicolat de Na	0.24
21-02PE4 Tetravalent	Tween-deoxicolat de Na	25



STABILITATEA VACCINULUI GRIPAL

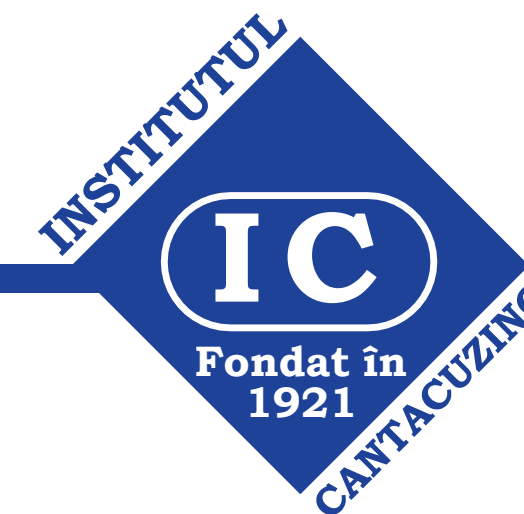


STABILITATE SUBSTANȚĂ ACTIVĂ -În urma testelor experimentale de consistență, au intrat în monitorizarea concentrației de hemaglutinina (principalul parametru de caracterizare al stabilității) și în **evaluarea stabilității pe termen lung, amestecurile virale monovalente** obținute pentru toate cele trei tipuri de tulpini virale componente ale vaccinului. Testele de control arată o stabilitate ridicată pentru toate probele luate în evidență, **la momentul de 12-14 luni concentrația de hemaglutinină fiind încă în parametrii specificați**. Trendul indică premisele să se atingă o stabilitate de minim 18 luni. O stabilitate bună dovedită pe termen lung asigură **posibilitatea utilizării substanței active pe două sezoane de fabricație** în condițiile în care formula vaccinului păstrează una sau mai multe componente virale.





STABILITATEA VACCINULUI GRIPAL



STABILITATE PRODUS FINIT (VACCIN GRIPAL EXPERIMENTAL)

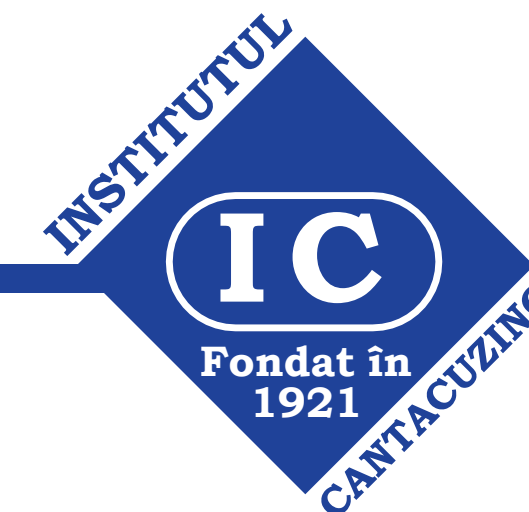
La momentul 12 luni concentrația de hemaglutinină se regăsește în limitele reglementare pentru varianta de vaccin gripal trivalent fragmentat cu tween-dietileter

LOT VACCIN	PARAMETRU TESTAT	INITIAL	1 LUNA	2 LUNI	3 LUNI	4 LUNI	5 LUNI	6 LUNI	7 LUNI	8 LUNI	9 LUNI	10 LUNI	11 LUNI	12 LUNI	
21-01PE1 Trivalent-eter		10.03.2021	13.04.2021	10.05.2021	09.06.2021	09.07.2021	09.08.2021	09.09.2021	08.10.2021	09.11.2021	09.12.2021	10.01.2022	09.02.2022	09.03.2022	
	Azpect fizic	conform			conform				conform		conform			conform	
	Identitate	pozitiv			pozitiv				pozitiv		pozitiv			pozitiv	
	Concentrație de hemaglutinină H1N1	17.39	17.55	16.57	16.74	16.65	16.61	16.64			15.09			14.63	
	Concentrație de hemaglutinină H3N2	16.52	16.69	16.41	16.81	15.19	15.45	15.26			13.51			12.83	
	Concentrație de hemaglutinină B	16.34	16.13	15.49	14.69	14.60	14.79	14.37			12.91			12.82	
	Proteine totale	222.85		217.82	230.84	199.81	184.00	206.20			244.47			205.88	
	Raport	4.42		4.49	4.79	4.30	3.93	4.46			5.89			5.11	
	Sterilitate	Steril													Steril
	Endotoxine bacteriene	100.00													100.00
	Ovalbumina	1.84							1.86		1.63			1.81	
	Formaldehida libera	0.018			0.019				0.018		0.02			0.02	
	pH	7.19			7.19				7.20		7.21			7.21	
	Toxicitate anormala	Absenta													
Volum extractibil	0.58 0.59 0.59 0.58 0.58														

Limite de admisibilitate pentru concentrația de hemaglutinină 12,75 – 17,25 μg/tulpină/doză



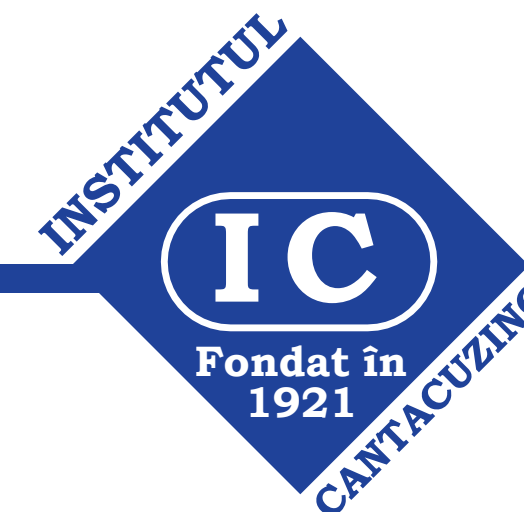
STABILITATEA VACCINULUI GRIPAL



Varianta vaccin experimental	Metoda fragmentare	Stabilitate (luni)	Tulpina virala sub limita specificata
21-01PE1 Trivalent	Tween-dietileter	12 luni	în limite
21-01PE2 Tetravalent	Tween-dietileter	6 luni	Tulpina B
21-02PE3 Trivalent	Tween-deoxicolat de Na	3 luni	Tulpina H1N1
21-02PE4 Tetravalent	Tween-deoxicolat de Na	6 luni	Tulpina B



FRAGMENTAREA VACCINULUI GRIPAL

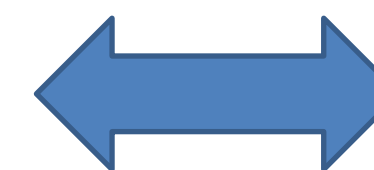


Fragmentarea virusului gripal - reduce reactogenicitatea vaccinului fără reducerea majoră a imunogenității sale.

1. Fragmentare prin îndepărtarea lipidelor cu solvenți organici sau detergenți (tween-dietileter)

2. Metodă alternativă - fragmentarea cu deoxicolat de Na

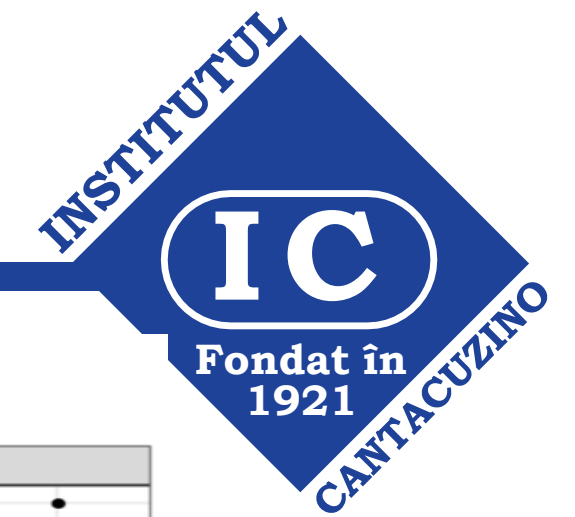
Virus gripal fragmentat cu deoxicolat de Na	Metoda fragmentare	Grad de fragmentare
A/H3N2/NYMC X-223	DEOXICOLAT 0,2%	Test 1: 4% Test 2: 5%
NYMC X-179A (H1N1)	DEOXICOLAT 0,2%	Test 1: 45% Test 2: 41%
NYMC BX-51B	DEOXICOLAT 0,05%	Test 1: 76% Test 2: 76%



**METODE
VALIDABILE
ALTERNATIVE DE
CONTROL AL
GRADULUI DE
FRAGMENTARE**



Studiu comparativ al imunogenității tulpinilor de virus gripal fragmentate cu – tween -dietileter și deoxicolat de Na



Nr. Crt	Lot	Nr. Șoareci	Timp de recoltare
1	AVM H1N1 - Fragmentare 1	7	0 28 zile 42 zile 12 săptămâni
2	AVM H1N1 - Fragmentare 2	7	
3	AVM B - Fragmentare 1	7	
4	AVM B - Fragmentare 2	7	
5	AVM H3N2 - Fragmentare 1	7	
6	AVM H3N2 - Fragmentare 2	7	
7	Control - Diluent	7	

- femele Balb/c female - 6 - 8 săptămâni

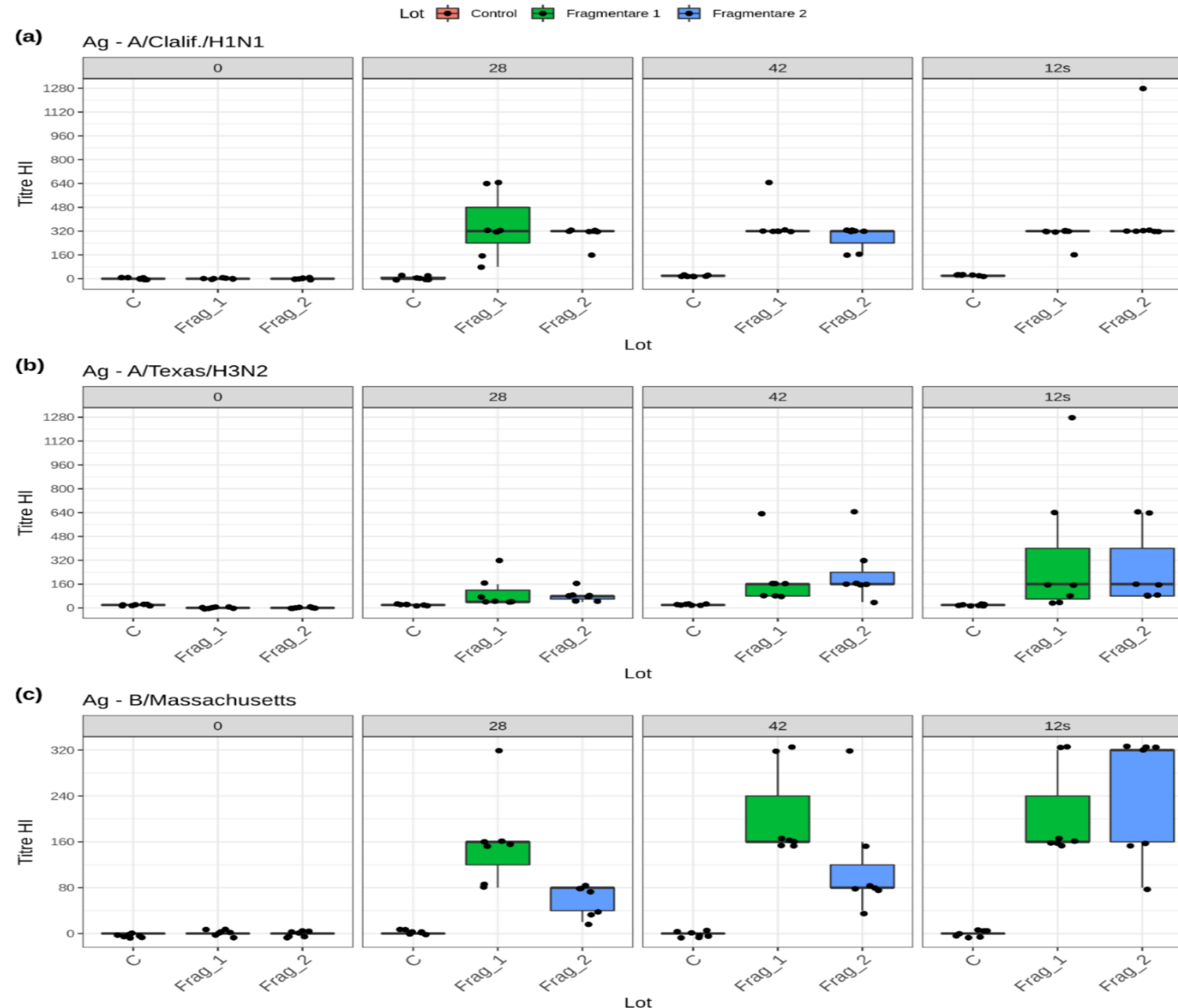
- imunizare intramusculară

- 50μL/doză

- 1 imunizare

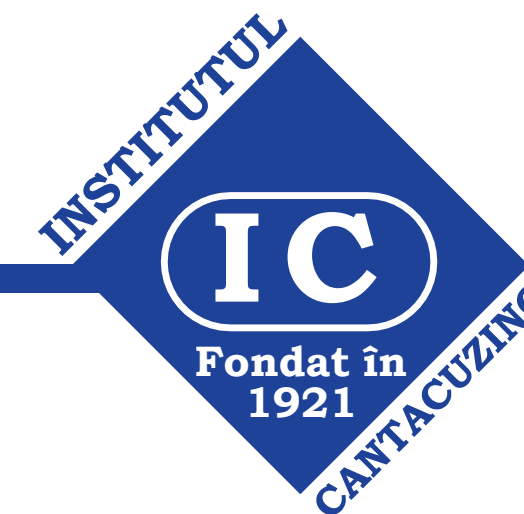
- monitorizare greutate corporală - săptămânal

- serurile colectate se păstrează la -80 °C.





CONCLUZII



- **Proces tehnologic stabilizabil care poate fi controlat și ținut în limitele de calitate impuse**
- **Procesul tehnologic prezintă o robustețe care a permis menținerea în limitele de calitate prin expunere la stresul și riscurile tehnologice apărute (programate și neprogramate)**
- **Stabilitatea amestecului viral monovalent (substanța activă a vaccinului gripal) este determinată până la 14 luni indicând posibilitatea atingerii a cel puțin 18 luni ceea ce ar putea permite utilizarea pe două sezoane succesive de fabricație**
- **Stabilitatea vaccinului gripal trivalent experimental a atins 12 luni – asigură un sezon de vaccinare împotriva tulpinilor virale sezoniere sau pandemice**
- **CONTINUAREA STUDIILOR privind:**
 - **metodele alternative de fragmentare a virusului gripal corelate cu metode validabile de control al parametrilor de calitate**
 - **metode de purificare avansată pentru a permite trecerea la varianta tetravalentă în condiții de siguranță**

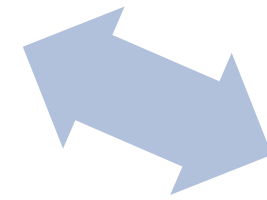


VACCINUL GRIPAL - VIITOR



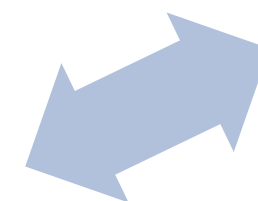
CERCETARE-
DEZVOLTARE,
OPTIMIZARE
CONTINUĂ

PROGRES
ȘTIINȚIFIC



SISTEM DE
CALITATE
EFICIENT

CALITATE
EFICIENȚĂ
SIGURANȚĂ



LEGISLAȚIE/STANDARDE/
REFERINȚE:

- Legislația europeană – EUDRALEX
- Legislația națională – Legea 95/2006 republicată / Titlul XVIII Medicamentul
- Farmacopeea europeană
- Ghiduri OMS
- Ghiduri ICH
- Ghiduri ISPE
- Standarde ISO

ADAPTARE
ȘI APLICARE



**Studii realizate în cadrul proiectului PSCD al MApN
“Studii în vederea dezvoltării și reluării producției de Vaccinuri Gripale”
- VACCIN GRIPAL -
(2020-2024)**

Mulțumiri tuturor colegilor implicați în realizarea studiilor (un număr de peste 130 de persoane):

- **Centrul de Cercetare-Dezvoltare Tehnologică - Dr. Adrian ONU, Dr. Crina STĂVARU și întregului colectiv**
- **Structura de Fabricație – Farm. Floarea DOBOȘERIU și secțiilor de producție Vaccinuri și Formulare-Ambalare**
- **Structura de Calitate – Bioch. Monica IONESCU, Biol. Mariana BUCUR și întregului colectiv**
- **Structura Tehnică – Ing. Dorel ȘOIMU, Ing. Cornel NICA și întregului colectiv**
- **Structura Administrativă – Col. Sorin PANCU și întregului colectiv**

VĂ MULȚUMESC!