

Vaccin – tillverkning och formulering

Peter Stjärnkvist
Läkemedelsverket
peter.stjarnkvist@mpa.se

Augusti 2021



1

1

Vaccination

- Immunologiskt skydd mot infektion genom tillförsel (nästan alltid parenteralt) av ofarligt antigen från patogen
- Vaccinering = Aktiv immunisering
- Passiv immunisering = tillförsel av antikroppar

2

2

Nedgång i infektionsjukdomar (USA)

Sjukdom	Antal sjuka (topp-år)	Antal sjuka 1998	Nedgång (%)
Smittkoppor	48 164 (1900)	0	100
Difteri	175 885 (1920)	1	100
Kikhosta	147 271 (1922)	6 279	95.7
Stelkramp	1 314 (1922)	34	97.4
Polio	16 316 (1952)	0	100
Mässling	503 282 (1958)	89	99.8
Påssjuka	152 209 (1968)	606	99.6
Röda hund	47 745 (1967)	345	99.3
<i>H. influenzae</i> typ B-infektion	20 000 (1985)	54	99.7

Provisional morbidity for certain infectious diseases in the United States in 1998, compared to peak morbidity prior to 1990, before universal use of vaccines in children

3

3

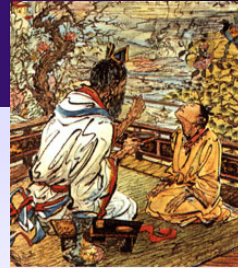
Vaccination

- **Principen för vaccination baseras på två egenskaper hos immunsystemet:**
 - specificitet
 - minne
- **Målet för vaccinproduktion: ofarligt antigen – ge immunitet men inte sjukdom**

4

4

Vaccinhistoria



1000-talet	Variolisation (Kina och Indien)
1700-talet	Variolisation (Europa)
1798	Vaccination med kokoppor - Jenner
1880	Levande försvagade vacciner – Pasteur
1896	Inaktiverade bakterievaccin
1920-talet	Adjuvans, toxoider
1986	Första rDNA-framställda vaccinet (Hep B)

5

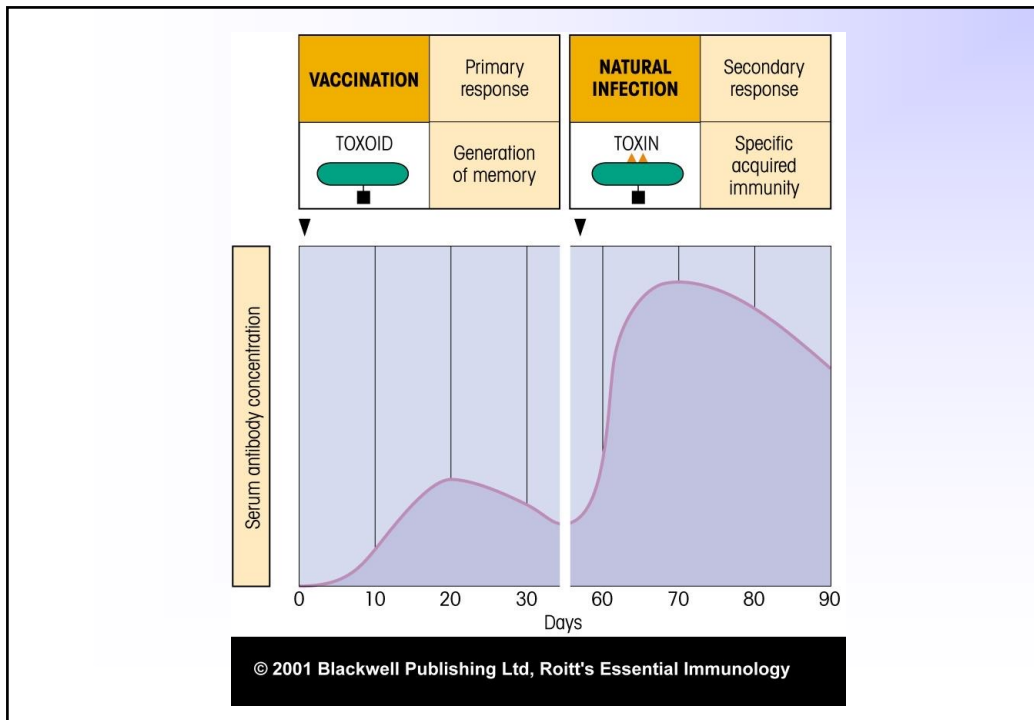
5

Vaccingenerationer



6

6



7

Behövs för immunsvär

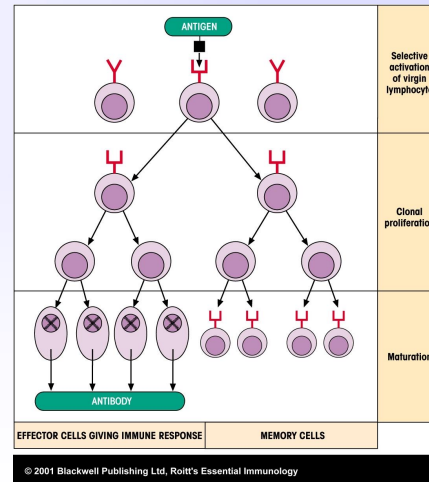
- Främmande protein eller polysackarid
- Minst ca 50 aminosyror stort
- Nedbrytbart
- Polysackarider ger sämre svar, särskilt hos barn

8

8

Immunsvaret

- **Anpassat svar**
 - Klonal selektion
 - Affinitetsmognad
- **Specifikt svar**
 - Antikroppar
 - T-cellsreceptor
- **Minne**
 - Immunitet
- **Två armar:**
 - Antikroppssvar (B-celler)
 - Cellulärt svar (Cytotoxiska T-lymfocyter)



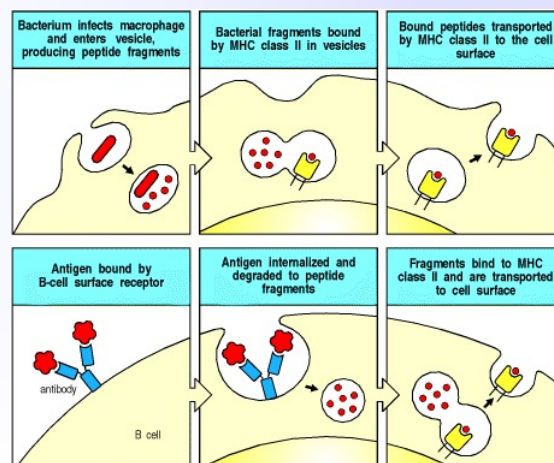
9

9

Antigenpresentation MHC klass II

Partikulära antigen

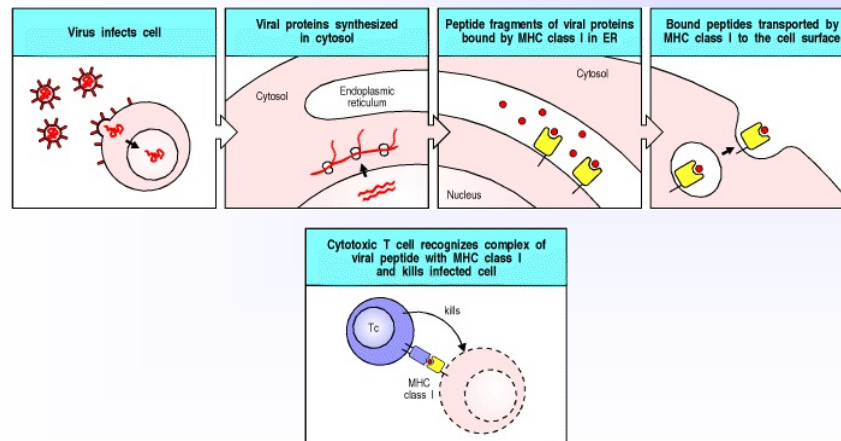
Lösliga antigen



10

10

Antigenpresentation MHC klass I



11

11

Vaccintillverkning och formulering

Unikt för vacciner (traditionella)

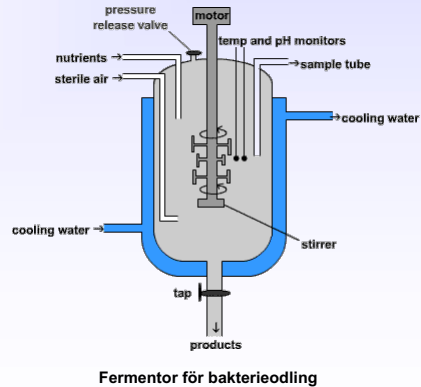
- Vid helcells- eller helvirusvaccin: hela organismer, döda eller levande, ingår
- Adjuvans - ökar immunsvaret
- Seed lot-system (Master seed lot - Working seed lot)
- Ofta komplicerad kvalitetskontroll

12

12

Tillverkningskedja traditionella vaccin

- Ymp (Master seed eller Working seed)
- Odling
 - Bakterier
 - Virus
- Avdödning
- Sönderdelning
- Rening
- Konjugering
- Tillsats av hjälpämnen
- Fyllning
- Eventuell frystorkning



13

13

Traditionella vacciner

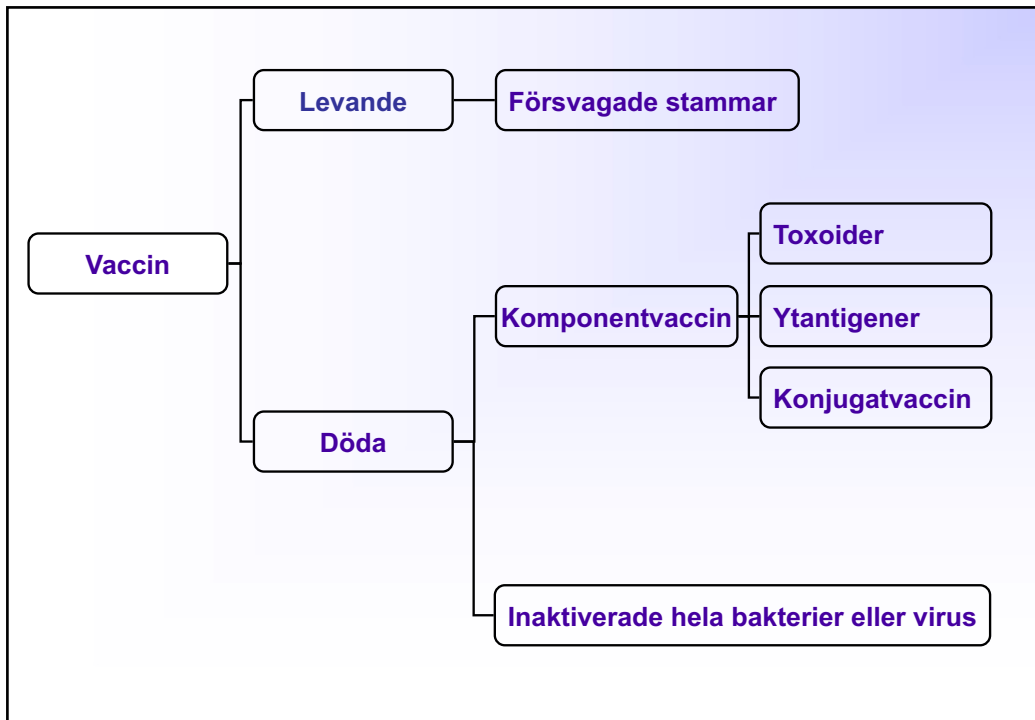
- Vaccin mot bakteriella infektioner
- Vaccin mot virusinfektioner

Olika typer av vaccin:

- Levande försvagade (attenuerade)
- Inaktiverade hela bakterier/virus
- Komponentvaccin (subunit-vaccin)
- Toxoider

14

14



15

Levande försvagade vaccin - allmänt

Jämfört med inaktiverade vaccin

Fördelar:

- Mer immunogent - mer CMI
- Få doser
- Adjuvans behövs inte

Nackdelar:

- Dålig stabilitet
- Kräver frystorkning - viabilitet minskar
- Värmekänsliga - kylkedja krävs
- Tidskrävande och komplexa kontroller för att bekräfta säkerhet hos vaccinet
- Kan förändras och bli virulent

16

16

Metoder för försvagning (attenuering)

- Odling i andra värdjur eller cellkultur, "passeras". Viruset adapteras och muterar.
- Användning av naturligt förekommande försvagad (avirulent) stam

Levande försvagade ger:

- Långvarig immunitet
- Generellt få biverkningar

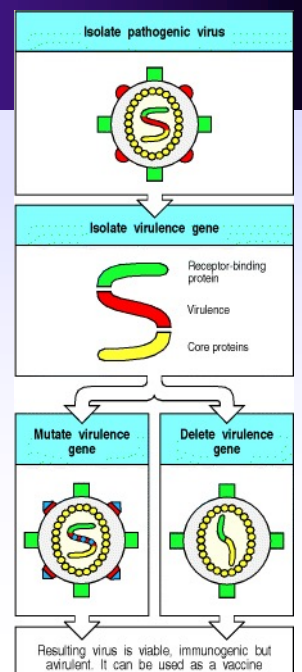
17

17

rDNA-tekniker för attenuering

Tre principer:

- Virala gener isoleras och muteras *in vitro*, och ersätter sedan vildtyps-genen
- Virulensgener identifieras och deleteras
- Gener som kodar för antigen som ger skydd klonas och överförs till etablerad avirulent vaccinstam t.ex. vaccinia. Resultat: rekombinant virus



18

Levande försvagade vaccin - exempel

Virus

- Gula febern
- Polio (OPV, Sabin)
- Mässling
- Påssjuka
- Röda hund
- Influenta (Fluenz®)
- Rotavirus
- Vattkoppor

Bakterier

- BCG
- Tyfoidevaccin (oralt)

19

19

Inaktiverade vaccin

Metoder för inaktivering:

- Formaldehyd
- Värme
- Glutaraldehyd
- beta-Propiolakton

20

20

Inaktiverade hela bakterier/virus - exempel

Virus

- Polio IPV
- Hepatit A-vaccin
- TBE (Fästingburen encefalit)
- Rabies

Bakterier

- Koleravaccin (oralt)

21

21

Komponentvaccin

- Ytantigen från virus
- Polysackarider från bakterier
- Polysackarid-proteinkonjugat
- Toxoider

22

22

Komponentvaccin - exempel

Virus

- Influensavaccin
- Hepatit B
- Humant papillomvirus (HPV)

Bakterier

- Pneumokockvaccin
- *H. Influenzae* typ b (Hib)
- Pertussis (acellulär)
- Difteri och tetanus

23

23

Konjugatvaccin

Barn svarar dåligt på polysackarider - *H. influenzae* polysackarid (PRP) har konjugerats till bärarprotein:

- PRP-T
konjugat till tetanustoxoid
- PRP-D
konjugat till difteritoxoid

Även konjugerat pneumokockvaccin finns –
7 polysackarider från *S. pneumonia* konjugerat till
difteritoxin-mutant (CRM197)

24

24

Tillverkning av toxoidvaccin

Difteri- och tetanusvacciner

Corynebacterium diphtheriae

Clostridium tetani

1. Bakterier odlas i fermentor - toxin utsöndras
2. Centrifugering eller filtrering
3. Eventuell upprening
4. Formaldehyd 4 - 6 veckor i 37°C (detoxifiering)
5. Ultrafiltrering (koncentration)
6. Upprening (utfällning, dialys, gelfiltrering etc.)
7. Adsorption till Al-salter

25

25

Kombinationsvaccin

Enkla kombinationer

Ger skydd mot en sjukdom, orsakad av fler stammar

- 23-valent pneumokockvaccin
- Trivalent poliovaccin

Komplexa kombinationer

Ger skydd mot flera sjukdomar

- DTP
- MPR
- DTP + IPV + Hib
- DTP + IPV + Hib + HepB

26

26

Allmänt barnvaccinationsprogram i Sverige

	Barnhälsovård						Elevhälsa		
	6 veckor	3 mån	5 mån	12 mån	18 mån	5-6 år	Åk 1-2	Åk 5-6	Åk 8-9
Rotavirus*	X	X							
Difteri		X	X	X		X			X**
Stelkramp		X	X	X		X			X**
Kikhosta		X	X	X		X			X**
Polio		X	X	X		X			
Haemophilus influenzae typ B		X	X	X					
Hepatit B***		X	X	X					
Pneumokock-infektioner		X	X	X					
Mässling					X		X		
Påssjuka					X		X		
Röda hund					X		X		
HPV****								X+X	

27

27

Reseprofylax

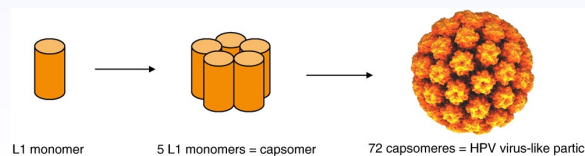
- Hepatit A, Hepatit B, tyfoidfeber, gula febern, kolera, rabies
- BCG: längre tids bosättning i u-länder

28

28

Andra generationens vaccin

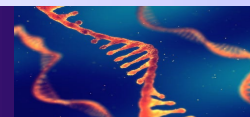
- Antigen producerat med rDNA-teknik
- Odlas i bakterier, jäst, insektceller, mammalieceller och växtceller
- Oftast låg immnogenicitet – adjuvans behövs
- Virala kapsidprotein kan uttrycks – bildar spontant virusliknande partiklar (VLP). Exempel HPV och hepatit B vaccin



29

29

Tredje generationen



- Ny paradigm: nukleotidsekvens kodar för antigenet
- Antigenet produceras i kroppens egna celler
- Typer:
 - DNA-vaccin
 - mRNA-vaccin
 - Virala vektorvaccin

30

30

DNA-vaccin

1992: Visades i musförsök att plasmider gav immunsvär mot det kodade proteinet. Svaret jämförbart med att spruta proteinet.

- Billiga att producera
- Mycket stabila - behöver ej kylförvaras
- Behöver tas upp i cellkärnan
- Inget humant vaccin godkänt

Formulering:

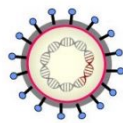
1. Koksaltlösning - i.m. injektion
2. På guldpartiklar - intradermalt med gene gun

31

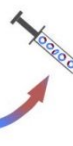
31

DNA-vaccin - princip

Transfer viral protein gene into a plasmid



Deliver plasmid into patient skin or muscle cells



Patient cells produce viral protein, mimicking a viral infection and inducing a strong immune response

32

32

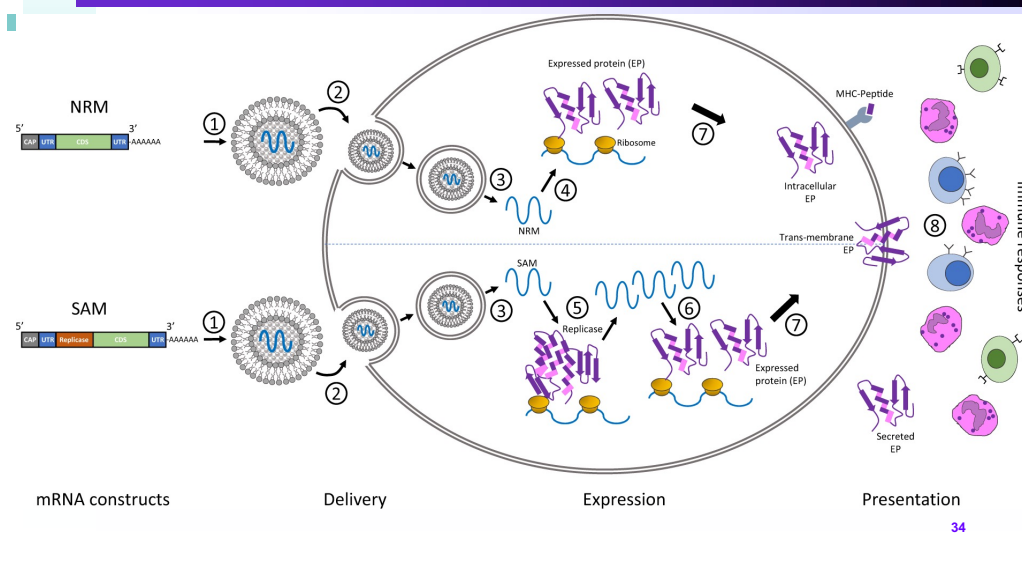
mRNA-vaccin

- In-vitro transkription av pDNA-templat
- Behöver inte komma in i cellkärnan
- Formuleras ofta i lipidpartiklar
- Frysförvaring ofta nödvändig
- Två godkända vaccin finns (covid)
- Modifierade nukleosider, t.ex. pseudouridin:
 - ökad stabilitet
 - minskat immunsvär mot RNA

33

33

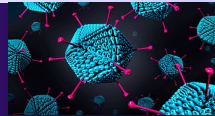
RNA-vaccin mekanism (?)



34

34

Virala vektorvaccin



- DNA kodande för antigenet levereras av försvagat virus
- Inget adjuvans behövs
- Risk för immunsvär mot vektorn
- Risk för integrering i genomet
- Instabilt – frysförvaring krävs ofta
- Vaccin mot Ebola
- Astra Zenecas covid-vaccin

35

35

EU-godkända covidvaccin

Vaccin	Typ	Tillverkare
Comirnaty	mRNA	BioNTech
Spikevax (Moderna)	mRNA	Moderna
Vaxzevria (AstraZeneca)	Viral vektor (adenovirus)	AstraZeneca
COVID-19 Vaccine Janssen	Viral vektor (adenovirus)	Janssen

36

36

Covidvaccin under utvärdering

Vaccin	Typ	Tillverkare
COVID-19 Vaccine (Vero Cell) Inactivated	Inaktiverat virus	Sinovac
CVnCoV	mRNA	CureVac
NVX-CoV2373	Rekombinant protein	Novavax
Sputnik V	Viral vektor (adenovirus)	Gamaleya Institute
Vidprevtyn	Rekombinant protein	Sanofi Pasteur

37

37

Adjuvans

Från latin *adjuvare* = understödja

Ämne som i kombination med antigen ökar immunsvaret mot antigenet

- Immunsvaret snabbare och starkare
- Påverkar balansen mellan humoral och cellmedierad immunitet (ak och CTL)
- Påverkar balansen mellan Th1 och Th2 celler
- Kan ge bredare immunsvaret

Viktigt framför allt vid primärimmunisering

38

38

Adjuvans - mekanismer

- Lokal depå av antigen - längre tid för interaktion med APC
- Omvandlar lösligt protein till partikulärt → ökat upptag i makrofager
- Stimulerar inflöde och tillväxt av makrofager
- Direkt interaktion med receptorer på APC: Toll like receptors (TLR)

39

39

Toll like receptors (TLR)

- Del av det medfödda immunsystemet
- Känner igen konserverade strukturer på mikroorganismer: PAMP (Pathogen-associated molecular patterns)
- LPS: TLR 4
- CpG: TLR 9
- Aktiverar immunsystemet

40

40

Aluminiumsalter I

Godkänt för humant bruk

Suspension med partiklar 3-4 μm .

- Al-hydroxid $\text{Al}(\text{OH})_3$ pos laddat
- Al-fosfat AlPO_4 neg laddat

41

41

Aluminiumsalter II

Två formuleringsmetoder:

- Antigenet blandas med färdig suspension av saltet → adsorption.
- Antigenet löses i fosfatbuffert → Al-klorid tillsättes → adsorption till Al-fosfat
- Viktigt att kontrollera graden av adsorption
- Adsorption påverkas av pH, jonstyrka, temp
- Kan ej frysas eller frystorkas
- Ger framför allt antikroppssvar, ej cellmedierat

42

42

Oljeemulsioner

Olja i vatten-emulsioner (o/v)

Nedbrytbar olja (ofta squalene eller squalane)

Icke-joniska emulgatorer

- Span 85
- Pluronic L121
- Tween 80

Kan göras stabila - droppstorlekar 200-300 nm

Exempel:

- AS03 – ingår i godkänt pandemivaccin (Pandemrix)
- MF-59 – ingår i godkänt influensavaccin (Fluad)

43

43

LPS-derivat

Lipopolysackarid (LPS, endotoxin) huvudbeståndsdel i yttre lagret av cellväggen på gram-negativa bakterier

- Polyklonal B cells-mitogen
- Aktiverar makrofager
- Interagerar med TLR 4

Adjuvans associerad med Lipid A-delen.

MPL (monofosforyl-lipid A): ”Attenuerad” lipid A

Ingår i godkända vacciner (AS04 i Cervarix och AS01 i Mosqirix)

44

44

Experimentella adjuvans

- Muramylpeptider
- Saponiner
- Liposomer
- Bakterie-DNA (CpG)

45

45

Muramylpeptider

Ursprung: Complete Freund's Adjuvans (CFA):

- v/o emulsion (mineralolja + emulgator)
- *Mycobakterium tuberculosis*

MDP - minimala adjuvanta strukturen i CFA (från cellväggen)

MTP - mindre toxiskt derivat

Formuleras i oljeemulsioner (vatten i olja)

46

46

Saponiner I

Triterpenglykosider från barken av *Quillaja saponaria*

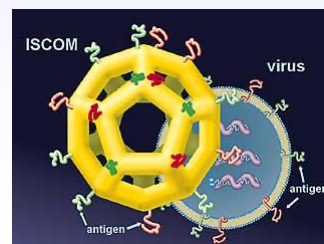
QuilA (Dalsgaard, 1974)

Upprenad blandning av olika saponiner, minst 24 stycken. Används i veterinärvacciner.

ISCOM® Immun Stimulating Complex (Morein, 1983)

Mix av:

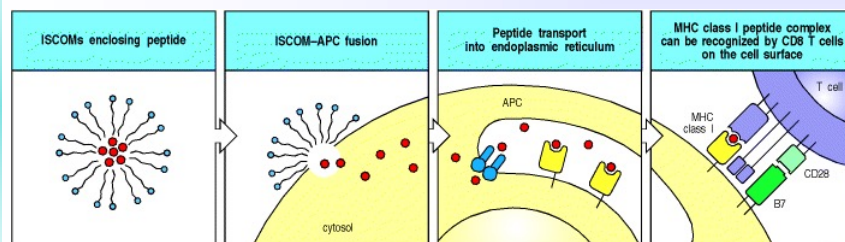
- QuilA
 - kolesterol
 - fosfolipider
 - antigen
- partiklar 40 nm bildas spontant



47

47

Iscom



48

48

Saponiner II

QS-21 (Stimulon®, Cambridge Biotech Corporation)

- En saponin från QuilA är isolerad
- Bildar miceller; 35 Å.
- Blandas med ag i vattenlösning
- Ingår i AS01 (Mosqirix)

49

49

Liposomer

Sfäriska blåsor med dubbelmembran av fosfolipider

- Används som experimentella läkemedelsbärare sen 70-talet
- Äts upp av fagocyter
- *Epaxal* (Berna): Liposomvaccin mot Hepatit A
Formalininaktiverat virus med *IRIV*
(Immunopotentiating Reconstituted Influenza Virosomes)

50

50

Bakterie-DNA som adjuvans

- Bakterie-DNA är effektivt adjuvant
- Innehåller ometylerade CpG-sekvenser - ovanligt i mammalie-DNA
- Ger mest Th1 svar
- TLR 9
- Bidrar till immunogeniciteten hos DNA-vaccin
- Ingår i hepatit-B vaccin (Heplisav, i kliniska prövningar, godkänt i USA)

51

51

Orala vaccin

Fördelar:

- Ger lokalt antikropsvar i tarmen (som ej erhålles vid i.m eller s.c. vaccination)
- Hög säkerhet
- Lätt att administrera

Nackdelar:

- Proteiner kan brytas ned
- Tolerans?

Adjuvans: CT, LT

52

52