

## 18. VAKCINAGYÁRTÁS

A vakcinák vagy más néven az oltóanyagok arra szolgálnak, hogy az immunrendszert támogatva megvédje a szervezetet a kórokozókkal szemben. Az oltóanyagok segítségével a molekuláris immunrendszer hatékonyabban működik, a szervezet könnyebben leküzdí a fertőzéseket. Az immunizálásnak alapvetően két módja van, az aktív és a passzív immunizálás. Az **aktív immunizálás** során antigéneket visznek be a szervezetbe, ezáltal kiváltva az antitest termelést. Ezt a módszert általában megelőzésre (profilaxisra) használják. **Passzív immunizálás** során más élőlény által megtermelt kész antitesteket juttatnak be a szervezetbe, ezek helyettesíthetik a fertőzött személy saját antitesteit. Ez tehát nem megelőzés, hanem fennálló fertőzés kezelése (terápia).

### 18.1. A passzív immunizálás oltóanyagai

Az antitesteket régebben csak vérből lehetett kivonni. Ehhez az antigénnel (lehet virulens vagy attenuált kórokozó, vagy csak egy fehérje) kontrollált körülmények között állatokat fertőznek meg. Beindul az ellenanyag termelés, a vérben egy-két hét múlva megjelennek az antitestek. A vérplazmát levéve izolálható belőle az immunglobulin frakció. Kapacitása korlátozott, idegen fehérjeként emberben immunválaszt válthatnak ki és állatvédelmi okok miatt is kiszorult a gyakorlatból.

Másik forrás a véradásból származó donorvér, aminél megvizsgálják az adott ellenanyag jelenlétét, és a kiválasztott tételekből izolálják az antitest frakciót (anti-RhD+, tetanusz, HBV, Varicella, Covid = plazmaterápia). Ez a folyamat a Vérvételek fejezetéhez tartozik.

Antitesteket előállíthatunk rekombináns fehérjeként is. De ezek alkalmazása nem szorítkozik a passzív immunizálásra, ezért egy külön fejezetben, a Monoklonális antitestek között tárgyaljuk.



Fig. 4  
The production of an antiserum  
bleeding  
gular vein  
immunized horse from the

1. ábra Vérvétel immunizált lótól

### 18.2. Az oltóanyagok története

Szűkebb értelemben az aktív immunizálás céljára készített oltóanyagokat nevezik vakcinának. A feladat ebben az esetben az, hogy olyan készítménnyel oltjuk be az embereket, ami kiváltja az immunválaszt, de ugyanakkor nem okoz fertőzést. A vakcinák evolúciója során megfigyelhető az a tendencia, hogy a vad típusú teljes kórokozótól indulva egyre kifinomultabban módosított élő egységek egyre kisebb részegységeit használták fel.

Az első vakcinákban egész élő vírust vittek át emberről emberre vagy állatról emberre, mint például Edward Jenner tehénhimlő oltása (1796), ami azon a felfedezésen alapult, hogy a tehének himlőjével fertőzött tehenészek nem kapják meg az emberi himlőt. Az oltással az enyhe lefolyású tehénhimlővel immunizálta az embereket a sokkal súlyosabb fekete himlő ellen. A vakcina elnevezés is innen származik (latinul vacca = tehén, vaccinus = tehénnel kapcsolatos).

Ezután a következő termelési módszer az élő attenuált (legyengített) vírusok in vivo vagy in ovo szaporítása volt. Attenuált baktériumokat tartalmazó vakcinákat hozott létre Louis

Pasteur a 1880-as években a csirke kolera és a lépfene (anthrax) ellen. Húsz évvel később Calmette és Guérin szintén legyengített *Mycobacterium* törzsszel készítették tuberkulózis (TBC) elleni vakcinát (*Bacillus Calmette-Guérin*, BCG).

Az 1918-ban engedélyezett szamárköhögés (pertussis) elleni vakcina volt az első teljes sejtes inaktivált bakteriális vakcina. Ezt követően diftéria és tetanusz toxoidokkal kombinálták, így jött létre az első kombinált diftéria, pertussisz és tetanusz vakcina (DiPerTe). A pertussis komponenst később felváltotta az acelluláris alegység vakcina, így ez a vakcina már csak bakteriális fehérjékből áll.

Idővel kifinomultabb módszereket vezettek be, mint például a toxinfhérjék formaldehides inaktiválásával toxoidot képeztek (pl. tetanusz, diftéria).

In vitro elsőként a polio vírust szaporították, előbb nem idegi emberi sejtekben (Enders, 1949), majd elsődleges majom vesesejtekben (Salk, 1955). Ez jelentette a modern ipari sejtenyésztes kezdetét.

A vírusok szaporítása még attenuált esetben is speciális biztonságot igényelt, ezért a tudósok az egyedi kórokozó antigéneken alapuló vakcinákat kezdték létrehozni. Ezek az alegység vakcinák potenciálisan biztonságosabbak, de gyakran kevésbé immunogének.

A poliszacharid vakcinák jellemzően bakteriális kapszid felszínéről származó immunogén poliszacharidokat tartalmaznak (tífusz, pneumococcus, meningococcus).

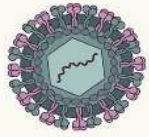

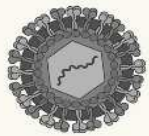



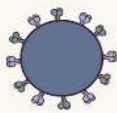


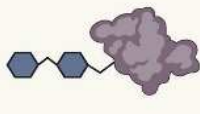

Önmagukban gyakran nem váltanak ki megfelelő hatást, ezért gyakran konjugálják fehérjével.

Év	Esemény
1796	vakcinázás tehénhimlő oltással feketehimlő ellen (Jenner)
1879	Élő attenuált bakteriális vakcina (csirke kolera ellen)
1884	Agyszövetben tenyésztett élő attenuált vírus vakcina (veszettség ellen)
1897	Lószérumból készült vakcina (bubópestis ellen)
1918	Teljes sejtes inaktivált bakteriális vakcina (szamárköhögés/pertussis ellen)
1923	Inaktivált bakteriális toxin (=toxoid) vakcina (torokgyík/diftéria ellen)
1931	Az első jóváhagyott fagyasztva szárított vakcina (himlő ellen)
1949	Kombinált vakcina (diftéria, tetanusz, teljes sejtes pertussis = DiPerTe)
1949	Enders féle, nem neurális emberi sejtekkel in vitro termelt vírusvakcina (gyermekbénulás/poliomielitis ellen)
1954	Collier javította a himlő vakcina fagyasztva szárítását (szállíthatóvá vált)
1955	Inaktivált vírus vakcina előállítása in vitro elsődleges majom vesesejteken (gyermekbénulás ellen)
1962	Emberi diploid sejtvonal (WI-38) létrehozása (Hayflick)
1977	Az utolsó himlő eset laboratóriumon kívül
1986	Élesztőben előállított rekombináns vírusszerű részecske (VLP) vakcina (hepatitis B)
1987	Konjugált poliszacharid-fehérje vakcina ( <i>Haemophilus influenzae</i> b)
1998	Nagy tisztaságú vakcinák előállítása (hepatitis A)
2005	plazmid DNS vakcina (nyugat-nílusi láz)
2020	RNS vakcina (Covid-19)

1. táblázat A vakcinagyártás története

### 18.3. A vakcinák típusai

A vakcinagyártás klasszikus paradigmája a kórokozó izolálása, néha inaktiválása, és a kórokozó vagy kórokozó összetevő bevitele az emberi szervezetbe. Ezt az elvet még ma is eredményesen használják az egész világon.

<b>A Licensed for use</b>				
<b>Vaccine type</b>	<b>PAMP</b>	<b>Examples (route if not IM/ID)</b>	<b>Adjuvant</b>	<b>Booster</b>
Live attenuated 	Endogenous 	Measles Mumps Rubella Rotavirus (oral) Yellow Fever Chicken pox Polio Sabin (oral) Live zoster BCG Influenza (nasal: FluMist)	None None None None None None None None None None	Yes Yes Yes Yes No Yes Yes No No Annual
Killed 	Intrinsic 	Whole cell pertussis Polio Salk	None None	Yes Yes
Split 	Intrinsic 	Seasonal influenza Flud for > 65 yr.	None MF59	Annual Annual
Virus like particles 	Incorporated <sup>#</sup>	HPV <a href="#">Guardasil 9</a> HPV <a href="#">Cervarix</a>	Alum AS04	Yes Yes
Toxoid 	None	Diphtheria Tetanus	Alum Alum	Yes Yes
Recombinant subunit 	None	Hep A <a href="#">Havrix</a> Hep A <a href="#">Vaqta</a> Hep B <a href="#">Engerix-B</a> Hep B <a href="#">Recombivax</a> HepA/Hep B <a href="#">Twinrix</a> Hep B <a href="#">Heplisav-B</a> Acellular pertussis Zoster <a href="#">Shingrix</a> Influenza <a href="#">Flublock</a>	Alum Alum Alum Alum Alum CpG Alum AS01B None	Yes Yes Yes Yes Yes Yes Yes Yes Annual
Conjugate 	None	MenB <a href="#">Bexsero</a> MenB <a href="#">Trumenba</a> Pneumococcal <a href="#">Pneumovax 23</a> HiB	Alum Alum Alum Alum Alum	Yes Yes Yes Yes Yes
Polysaccharide 	None	Pneumococcal polysaccharide <a href="#">PPSV23</a>	None	Yes

2. ábra A vakcinák alaptípusai

Az immunogén hatást hordozó egység nagyon sokféle lehet, a teljes kórokozótól az egyetlen epitópot tartalmazó makromolekuláig (2. ábra).

A vakcinák fejlesztésénél egyszerre van jelen egyfajta konzervativizmus és az új megoldások keresése. Például toxoidon alapuló modern diftéria vagy tetanusz bakteriális vakcinák ma is az 1930-as években kifejlesztett eljárás javított változatával készülnek. A kanyaró, mumpsz és rubeola (MMR) vakcinát több mint 30 évvel ezelőtt alakították ki. A további folyamatfejlesztés a gyártási problémák elhárítására, új kombinációk kialakítására (pl. ProQuad = Varicella + MMR) vagy a formulázás javítására irányult. Ezeket fejlesztéseket általában nem védik szabadalmak, de a gyártás bonyolultsága és a kritikus pontok titkossága megnehezíti a versenytársak piacra lépését. Más vakcinák esetében új megközelítéseket alkalmaztak a biztonságosabb és olcsóbb gyártás érdekében. Például a polio vakcináknál a Salk féle inaktívált vad típusú vírust tartalmazó oltóanyag mellett megjelent a szájon át adható és olcsóbb, attenuált Sabin oltóanyag is. Jelenleg mind a kettő része a gyermekek oltási protokolljának. A vakcinatípusok fejlődésével a gyártási folyamatok is fejlődtek.

### 18.3.1 A teljes kórokozót tartalmazó vakcinák

A hagyományos vakcinák a kórokozó egészét tartalmazzák, de ezek nem okoznak betegséget, mivel legyengített vagy inaktívált formákat hoznak létre. Sok általánosan használt vakcina ezekbe a klasszikus kategóriákba tartozik. Az ilyen teljes kórokozó vakcinák erős immunválaszt válthatnak ki, mivel a kórokozó összes epitópját tartalmazza. Ez az elv azonban nem minden kórokozó esetében működik és biztonsági kockázatok is felmerülnek.

#### 18.3.1.1 Inaktívált vakcinák

Az inaktívált kórokozók immunitást indukáló hatását már a 19. században leírták. Ennek alapján fejlesztették ki az inaktívált vakcinákat, amelyeknél a kórokozót vegyi anyagokkal, hővel vagy sugárzással elpusztítják, de kapott anyag immunogén tulajdonsága megmarad.

Ezesetben probléma lehet, hogy akadhat kis számú olyan mikroba, ami nem pusztult el, így fertőzést okoz. Az inaktíválás történhet például hővel, de ezt ritkán alkalmazzák, mivel ekkor az antigén tulajdonságért felelős fehérjék is denaturálódhatnak. Ehelyett inkább kémiai reagenseket használnak. Olyan szerek jöhetnek számításba, amelyek szelektíven károsítják a DNS-t, ugyanakkor az epitóp fehérjék nem károsodnak. Jellemzően formaldehidet, vagy alkilező szereket, mint az etilénimint és származékait választják.

#### 18.3.1.2 Élő, attenuált vakcinák

A tenyésztési technikák fejlődése lehetővé tette az élő, attenuált ("legyengített") vakcinák kifejlesztését, amelyek a kórokozó élő, szaporodóképes, de laboratóriumban legyengített, azaz betegséget nem okozó változatát tartalmazzák. Ilyen típusú vakcinákat viszonylag egyszerűen létre lehet hozni bizonyos vírusokból, de jóval nehezebb előállítani az összetettebb kórokozók, például baktériumok és paraziták esetében.

Ilyen vakcinának tekinthető a Jenner által empirikusan használt tehénhimlő vírus (*Vaccinia bovis*) is, de ez nem mesterséges fejlesztés eredménye, hanem az evolúcióban spontán jött létre. A mintegy százéves BCG oltás (BCG = *Bacillus Calmette-Guérin*) az emberben és tehénben egyaránt tuberkulózist okozó *Mycobacterium bovis* törzs tizennégy éves laboratóriumi tenyésztéssel létrejött attenuált változata. E vakcina hatékonysága és az immunizáció tartóssága változó, de a keresztimmunitás révén más *Mycobacterium* fajok ellen is véd.

Az attenuált vírusvakcinák között jó példa a kanyaró, mumpsz és rubeola elleni kombinált oltás (MMR). Ezek a vakcinák már egy vagy két adag után erős immunválaszt váltanak ki, és élethosszig tartó immunitást adnak.

Az attenuált törzsek veszélye, hogy reverziók történhetnek, ami betegség kialakulásához vezethet. Ezért a vakcinákat gyakran ellenőrizni kell. Az eljárás előnye viszont, hogy erősen ragályos betegség esetén a legyengített kórokozó spontán szóródhat a populációban, s immunizálhatja az oltásban nem részesülteket is. (Ugyanakkor a spontán szóródás közben is lehet reverzió!).

A teljes kórokozót tartalmazó oltóanyagok közé tartoznak a modern géntechnológiai eljárásokkal létrehozott **kiméravírusok** is. Ezek két vagy több vírus génjeit tartalmazzák, például egy ártalmatlan vírus tokfehérjéit a patogén víruséra cserélik ki.

#### *Toxoid vakcinák*

Más bakteriális betegségeknél, mint például a diftéria és a tetanusz, nem is maga a baktérium okoz kárt, hanem általa szekretált, betegséget okozó fehérjék (toxinek). A védekező emberi szervezet ezek ellen is termel semlegesítő antitesteket. A vakcina célja ilyen antitestek generálása az epitóppal rendelkező, de nem mérgező fehérjékkel. Ezek a **toxoid vakcinák** a baktérium által termelt toxinok kémiai módosításával, inaktíválásával hozhatók létre.

#### 18.3.1.3 Alegység vakcinák

A teljes kórokozó helyett annak csak egy jellegzetes, erőteljes immunreakciót kiváltó felületi fehérjéjét, egy epitópját állítják elő és adják be a megvédendő személynek. Ezt a molekulát rekombináns fehérjeként egy ártalmatlan gazdaszervezet felhasználásával termeltetik. A gyártás és a termék biztonságosabb és egyszerűbb, mert a kórokozó egyáltalán nincs jelen. Az így kapott egy-epitópos antigének viszont nem mindig váltanak ki hosszú távú immunitást.

Ha a vakcina csak a legfontosabb antigén(ek)e)t tartalmazza, akkor sokkal kevesebb lesz a mellékhatás is. Ezt jól szemlélteti az új generációs pertussis (szamárköhögés) vakcinák kifejlesztése. Az 1940-es években bevezetett első pertussis vakcinák inaktívált *Bordetella pertussis* baktériumokból álltak. Bár hatékonyak voltak, az egész sejtes pertussis vakcina gyakran okozott kisebb mellékhatásokat, lázat, illetve az oltás helyének megduzzadását. Emiatt sokan nem oltatták be magukat. Az 1970-es évekre a csökkenő oltási arány a fertőzések gyakoriságának növekedését eredményezte. Ekkor fejlesztették ki az acelluláris (sejtet nem tartalmazó) pertussis vakcinát, amely a *B. pertussis* sejteknek csak egyes izolált és tisztított összetevőit tartalmazta. Ezek az oltóanyagok hasonlóan hatékonyak, mint a teljes sejtes vakcinák, de sokkal ritkábban okoznak mellékhatásokat.

A géntechnológia korszaka az 1970-es években kezdődött. Egy évtizeddel később a rekombináns DNS-technológiát már az első *rekombináns fehérje vakcina*, a hepatitis B vakcina kifejlesztésére használták. A vakcina antigén a hepatitis B vírus egyik fehérjéje, amit a vírus génszakasz élesztő sejtekbe ültetésével termeltetnek.

#### 18.3.1.4 Vírusszerű részecskék (virus-like particle, VLP)

A vírusok burokfehérjéinek "önösszeszerelése" a kristályképződéshez hasonlóan spontán végbemenő, energiacsökkenéssel járó folyamat. A vírus rekombináns fehérjeként megtermelt tokanyagai a gazdaszövetben vagy akár in vitro is képesek összeállni, egy „üres”, nukleinsav nélküli tokot formálni. Ezek a *vírusszerű részecskék (virus-like particle, VLP)* a természetes vírus által kiváltotthoz hasonló immunválaszt váltanak ki, de a nem tudnak szaporodni, mert nem tartalmaznak információt hordozó nukleinsavat. Enélkül pedig nem működik a vírusreplikáció.

Az 1990-es évek elején felfedezték, hogy a humán papilloma vírus (HPV) külső héjából származó fehérjék olyan részecskéket képezhetnek, amelyek nagyon hasonlítanak a kész vírusra. A tokfehérjét rekombináns úton előállítva a spontán létrejött VLPk vakcinaként használható fehérje antigének.

### 18.3.1.5 Poliszacharid vakcinák, konjugált vakcinák

Az immunreakciót kiváltó epitópok nem mindig fehérje mintázatok, részben vagy teljesen poliszacharidokból állhatnak. Jellemzően egyes fertőző baktériumok külső felszínén, a sejtfalhoz kötve találhatóak. Kézenfekvő, hogy ezeket a molekulákat is fel lehet használni a védőoltásokban. Az első engedélyezett ilyen oltóanyag a *Haemophilus influenzae* B típusa (Hib) elleni poliszacharid vakcina volt. Használhatósága azonban korlátozott volt, mivel nem váltott ki elég erős immunválaszt a kisgyermeknél – éppen abban a korcsoportban, ahol a leggyakoribb a Hib-fertőzés. Ez vezetett az úgynevezett *konjugált vakcinák* kifejlesztéséhez, amelyben a Hib-poliszacharidhoz egy fehérje antigént csatoltak, ez kisgyermeknél erősebb immunválaszt és jobb védelmet biztosított. Ma a Hib-en kívül konjugált vakcinákat alkalmaznak a pneumococcus és meningococcus fertőzések elleni védelemre is.

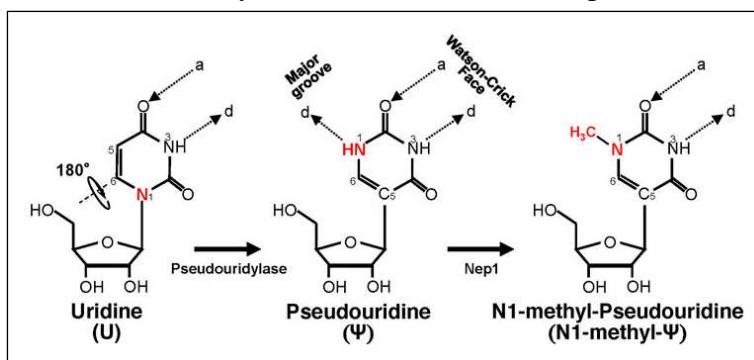
### 18.3.1.5 Nukleinsav vakcinák

A vakcinázás egy másik megközelítése, hogy nem magát az antigént vagy antigéneket visszük be a megvédendő szervezetbe, hanem az azt kódoló genetikai anyagot. A szervezet saját sejtjei ennek alapján maguk állítják elő az antigént. Az immunválasz ugyanolyan erős és tartós, mint az előzőeknél, viszont a vakcina stabilitása kiváló (a nukleinsavak stabilabb vegyületek, mint a fehérjék) és a nagyüzemi gyártás is egyszerűbb.

A **DNS vakcinák** természetben megtalálható plazmidok genetikai átalakításával jönnek létre. Ezeket a prokarióták genetikai manipulációjánál vektorként használjuk, szinte tetszőleges fehérje génjének bevitelére és kifejezésére, expressziójára alkalmasak. Vakcinaként az immunválaszt kiváltó epitóp fehérje génjét építjük be a plazmidba, és ezt bejuttatva átíródik a testi sejtekben. A plazmidok szabás-varrása és gyártása jól ismert, bejáratott technika, emiatt viszonylag gyorsan lehet vakcinát fejleszteni a kialakulóban lévő vagy újra felbukkanó fertőző betegségek ellen. Ilyen elven működő vakcinákat fejlesztettek ki először 2003-ban, majd a H5N1 madárinfluenza ellen 2005-ben, a H1N1 pandémiás influenza ellen 2009-ben és a Zika-vírus ellen 2016-ban. A vakcinába bevonandó vírus gének kiválasztásától az embereken végzett klinikai vizsgálatok megkezdéséig eltelt idő ezalatt 20 hónapról mintegy három hónapra rövidült.

A DNS mellett a **messenger RNS** (mRNS) is alkalmazható vakcinaként. Előnye a DNS-hez képest, hogy a fehérje legyártásában a két lépés (transzkripció, transláció) közül csak a másodikat kell végrehajtani. A molekula gyorsan (1-2 nap alatt) elbomlik, nem marad a sejtben, így nem zavarja meg annak működését.

A nukleinsavak bevitelének megvan az a hátránya, hogy aktiválják a veleszületett (innate) immunrendszert, nem-specifikus, gyulladásos folyamatok indulnak meg. Ez a mellékhatás nagyrészt elmarad, ha az uridin helyett módosított bázisokat építenek be az RNS láncba. Két



3. ábra Az uridin analógok szerkezete

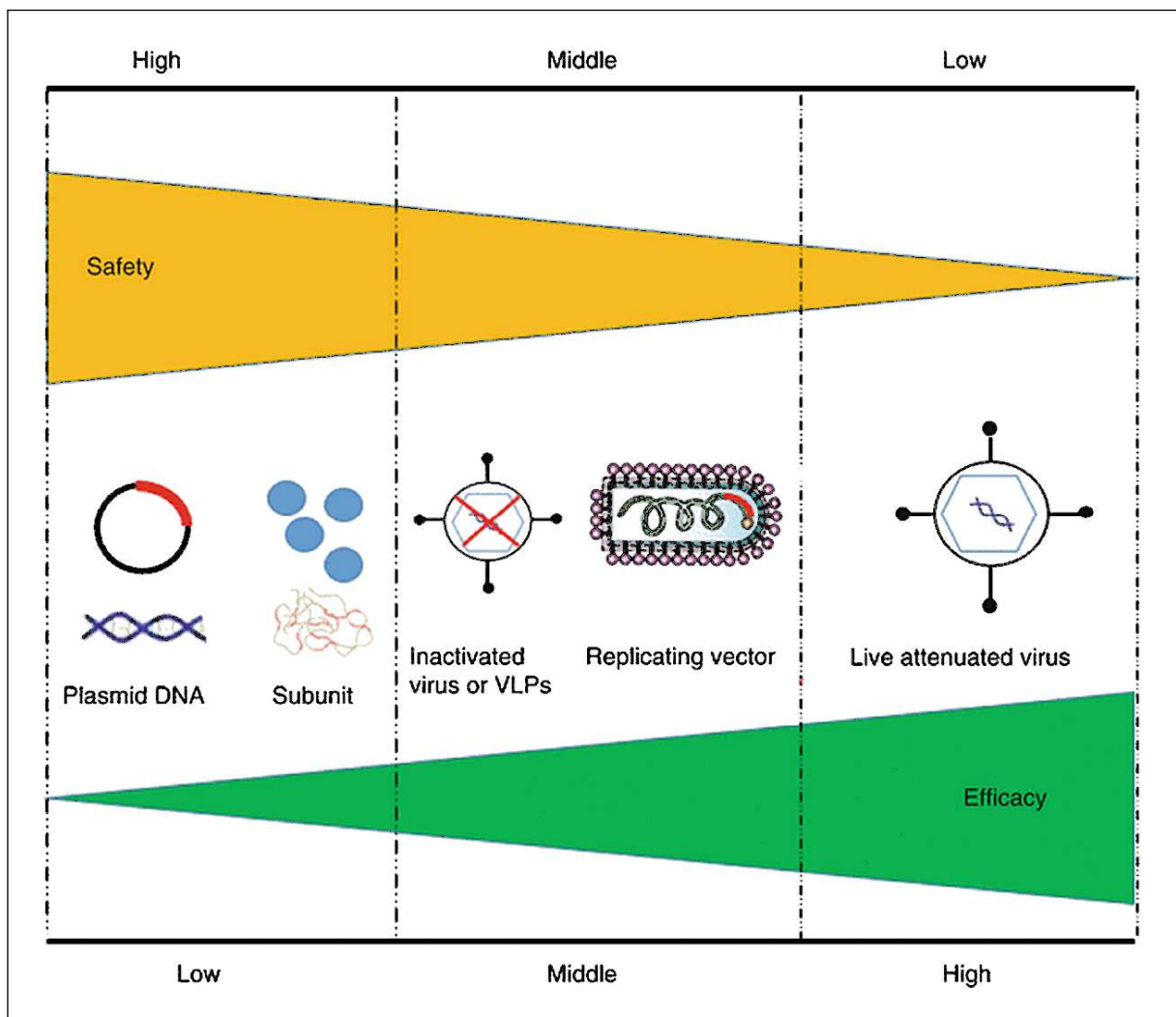
szerkezetanalóg jöhet számításba, a pseudo-uridin és az N1-metil-pseudo-uridin. Ezek alkalmazásával a fehérjeszintézisben betöltött szerep csak kis mértékben változik, viszont a veleszületett immunrendszer szenzorai nem érzékelik az RNS molekulát. Karikó Katalin legnagyobb felismerése abban áll, hogy az analógok alkalmazásával lehetővé tette a mRNS humán alkalmazását.

Ezenkívül a mRNS-ek potenciálisan sem integrálódhatnak a gazdaszervezet genomjába, és az antigén expresszió folyamata során természetes úton lebomlanak. Ezek a jellemzők azt mutatják, hogy az mRNS-vakcinák sokkal biztonságosabbak lehetnek, mint más vakcinák

Más, a génmanipulációban használatos vektorokat is alkalmazhatunk a vakcinák kialakításánál. Egyes vakcinák ártalmatlan vírust vagy baktériumot használnak vektorként vagy hordozóként, hogy a genetikai anyagot bevigyék a sejtekbe. Ezek a **rekombináns vektor vakcinák** előbb az állategészségügyben jelentek meg, később alkalmazták humán célokra is.

További érdekes lehetőség: az emberre ártalmatlan *Vaccinia* vírus genomjába is beültethető a Hepatitis B vírus tokfehérje génje, így ezzel a rekombináns vírussal a Hepatitis B ellen lehet oltani az embereket.

A fehérje alegység antigének bevitelére, az immunrendszer számára történő bemutatására egy új stratégia a **nanorészecskék** (nanoparticles) felépítése. Ehhez megfelelő lehet a például ferritin molekula, amely az emberi szervezet vérében keringő saját anyaga. Ebből akár 24



4. ábra Különböző vakcinák hatékonyságának és biztonságának összehasonlítása

molekula is képes összekapcsolódni és a komplex mérete eléri a 8-12 nm-t. Ebbe lehet beépíteni az antigén fehérjéket. Ilyen típusú vakcinákat az influenza, a MERS vírus és az Epstein-Barr vírus ellen fejlesztenek.

A vakcina hatékonysága és biztonságossága sokszor fordított kapcsolatban van egymással. Amíg az egész kórokozó van jelen inaktivált vagy legyengített formában, addig megvan az esély a reverzióra, a betegség létrejöttére. Ha a kórokozónak csak egy alkotóját használjuk oltóanyagként, akkor ez a veszély nem áll fenn, de az egyetlen építőp miatt a hatékonyság gyakran gyengébb (4.ábra).

## 18.4. Technológiák

Legelső, ősrégi módszer: “testről testre”, Jenner módszerével. a tehénhimlő és a fekete himlő közötti keresztimmunitást kihasználva a tehén testén képződött hólyag váladékát, benne a vírusokat az emberi bőrön ejtett karcolásba dörzsölve vitték be az antigént. Ehhez nem kellett gyártási technológia, a vakcina, mint termék csak addig a néhány percig létezett, amíg a váladékot átvitték egyik testről a másikra.

A feladat végrehajtása szempontjából érdemes kettéosztani a vakcina gyártási technológiáját a baktériumok elleni és a vírusok elleni oltóanyagokra.

### 18.4.1. Baktériumok elleni vakcinák előállítási technológiája:

A baktériumokat hagyományos fermentációs technológiával elszaporítják azzal a különbséggel, hogy igen szigorú biztonsági előírásokat kell betartani a gyártás során. Az attenuált törzsekkel kevesebb a gond, hiszen azok már nem okoznak megbetegedést. Azoknál a patogén törzseknél viszont, amelyekből később inaktiválással készül a vakcina, a teljes zártságot térben és időben mindaddig fenn kell tartani, amíg élő kórokozó előfordulhat. A containment fenntartása a fermentáció során általában nem ütközik nagy nehézségekbe, a fő gondot inkább a feldolgozási technológia okozza. A feldolgozás során minden csővezeték, szerelvényt, berendezést, szabályozó elemet úgy kell kialakítani, hogy onnan semmiféle élő mikroba nem kerülhet ki a rendszerből. Időben a containment-et egy készülékre vagy szakaszra akkor lehet feloldani, ha a belső teret igazolhatóan megtisztították és fertőtlenítették. A helyben tisztításra (CIP = cleaning in place) általában nátrium-hidroxidos vagy formaldehides mosást vagy hosszabb áztatást írnak elő. Az eljárás program szerint végrehajtott mosási és öblítési ciklusok sorozata. A készüléket szétszerelni, pl. szűrőbetétet cserélni csak ilyen tisztítás után lehet. A mosóvizet sokszor nem engedik egyenesen a szennyvíz rendszerbe, hanem egy gyűjtő tartályban felfogják és csak ártalmatlanítás után engedik tovább.

A baktérium sejttömeg inaktiválását rendszerint vegyszeres kezeléssel (formaldehid, etilénimin) hajtják végre.

Minden gyógyszerkészítménynél fontos minőségi követelmény az endotoxin-mentesség. A baktérium alapú termékeknél ez hatványozottan igaz, mivel ezek termelik az endotoxinokat. Ezek kis méretű lipoproteinek amelyek a magasabb rendű szervezetekre károsak. Növeli a veszélyt az, hogy stabil anyagok, a hősterilizálás vagy vegyszeres kezelés során nem bomlanak el, sőt a sejtek pusztulása során kiszabadulva hatásuk még fokozódhat is. Az endotoxinok egy csoportja a pirogének, avagy lázkeltő toxinok. Ezek eliminálására, illetve mérésére külön módszereket írhatnak elő.

Méretük szerint nehéz elkülöníteni őket a számunkra hasznos fehérjéktől, ezért általában adszorpciós megkötést alkalmaznak.



#### 18.4.2. Toxinok, toxoidok

A toxintermelő baktériumok által okozott betegségek egy részénél nem is a baktérium okozza a súlyos tüneteket, hanem a toxin. A szervezet a toxinok ellen termelt ellenanyagokkal veszi fel a küzdelmet, ugyanolyan mechanizmussal, mint a sejtes epitópok esetén. Az ilyen megbetegedések esetén a vakcinálás célja nem a kórokozók, hanem a toxin elleni antitestek termelésének kiváltása. A legismertebb toxintermelő mikroorganizmusok és a kiváltott betegség:

<i>Clostridium tetani</i>	– „merevgörcs”, „nyakszirtmerevedés”
<i>Clostridium botulinum</i>	– izombénulás, „botulizmus”
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	– „torokgyík”



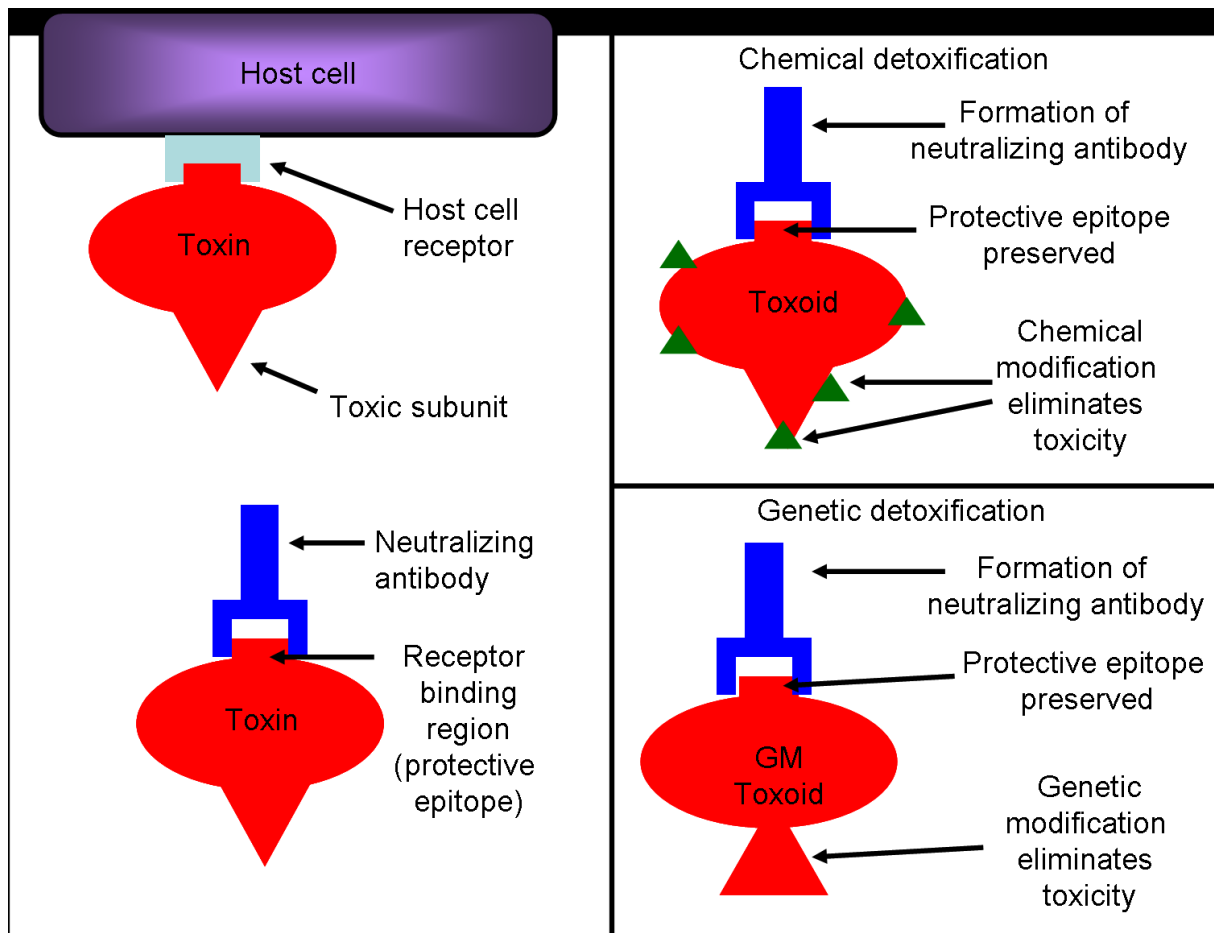
5. ábra Tetanuszos izomgörcsben elhunyt beteg

*Érdekességek: a C. botulinum mérgezés legtöbbször a rosszul hőkezelt élelmiszereknél fordult elő. A Clostridiumok anaerobok, tehát a légmentesen lezárt konzervekben is tudnak szaporodni és toxint termelni. Ráadásul a konzerv kibontása után hiába főzik meg újra az ételt, a hőálló toxin mérgező marad. Manapság a toxint botox néven a szépségipar használja a mimikai izmok bénítására.*

*A torokgyík, mint betegség onnan kapta a nevét, hogy a torokban okoz gyulladást, duzzanatot, és a nyálkahártya nagyobb felületen egyben leválik. Ezt a beteg felköhögi és az összepöndörödött hártya alakja gyíkhöz hasonlítható.*

A védettség kialakításához nem alkalmazhatunk valódi toxint, ehelyett ennek is a „legyengített”, módosított formájával váltják ki az immunválaszt. A módosított, inaktivált toxint **toxoidnak** nevezik. A mikroba által termeltetett toxin inaktiválása megoldható kémiai reakcióval (tipikusan formaldehiddel) vagy hőkezeléssel.

Másik megoldás a törzs genetikai módosítása, a toxin génjét úgy változtatják meg, hogy az ne váltson ki tüneteket, de az epitóp ne változzon.



6. ábra Toxin és toxoid

### 18.4.3. Vírusok elleni vakcinák előállítási technológiája

Akár élő attenuált, akár inaktivált vírusokból készítünk vakcinát, mindenképpen szükséges a vírusok szaporítása. A vírusok viszont táptalajon vagy fermentációval nem szaporíthatók, mivel abszolút paraziták, szükségük van egy gazdaszervezet funkcióira és anyagaira. Szaporításukhoz tehát élő és specifikus sejtek kellenek. A specifitás itt azt jelenti, hogy a vírusok csak bizonyos fajok bizonyos szöveteit fertőzik meg. Az emberre veszélyes vírusok általában szaporíthatók majmokban, némelyik rágcsálókban, sertésben is. A COVID-19 vírus például megbetegíti a menyétféléket (nyérc, vadászgörey) is. A vírusok szaporítása gerinces állatokban laboratóriumi szinten bevett gyakorlat, de ipari léptékű technológiaként nem alkalmazható részben biológiai, technikai, részben állatvédelmi okok miatt. A specializálatlan sejtek viszont széleskörűen használható a vírus szaporításra. Ilyen sejteket az embriókban találhatunk. Ipari szempontból a leginkább elérhető embrió a csirkeembrió, vagyis az előkeltetett tojás. A tojás további előnye, hogy kis egység lévén befertőződése esetén kisebb lesz a kár, továbbá nincs benne immunválasz. Gyógyszeripari célra csak csíramentes tojás használható fel, így ezt egy speciális tojóállomány segítségével állítják elő. Ezek a tyúkok születésüktől kezdve steril körülmények között élnek, védőoltást sem kapnak, hogy az immunrendszerük minél intaktabb legyen. Az ilyen tyúkokat SPF (specific pathogen free) állománynak nevezik és az általuk előállított tojás az **SPF tojás**.

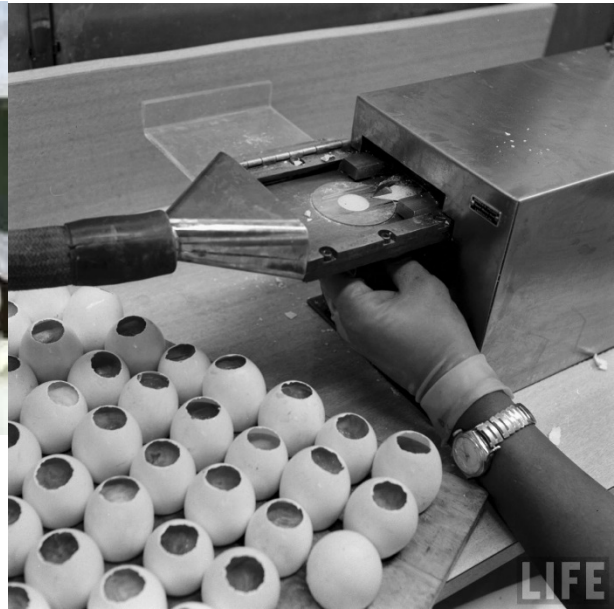
*Érdekesség: Magyarország jelentős exportőr az SPF tojások piacán. Ez jó üzlet, a tojások ára akár hússzorosra is lehet a normál, étkezési tojásnak.*

#### 18.4.3.1 Vakcina gyártás tojásban

Az SPF tojást keltetőgépben előkeltetik 8-11 napig, majd steril körülmények között fogászati fúróhoz hasonló eszközökkel kilyukasztják és meghatározott helyre, például az amnion hártýára fecskendezik a vírust. A nyílást aszeptikusan lezárják, és a tojást 2-3 napra visszateszik a keltetőgépbe. Ezután a tojást megnyitják és az kiszívják a vírustartalmú folyadékot. Ez a módszer sajnos eléggé körülményes és sok kézi munkát igényel.



8. ábra SPF tojások beoltása vírussal

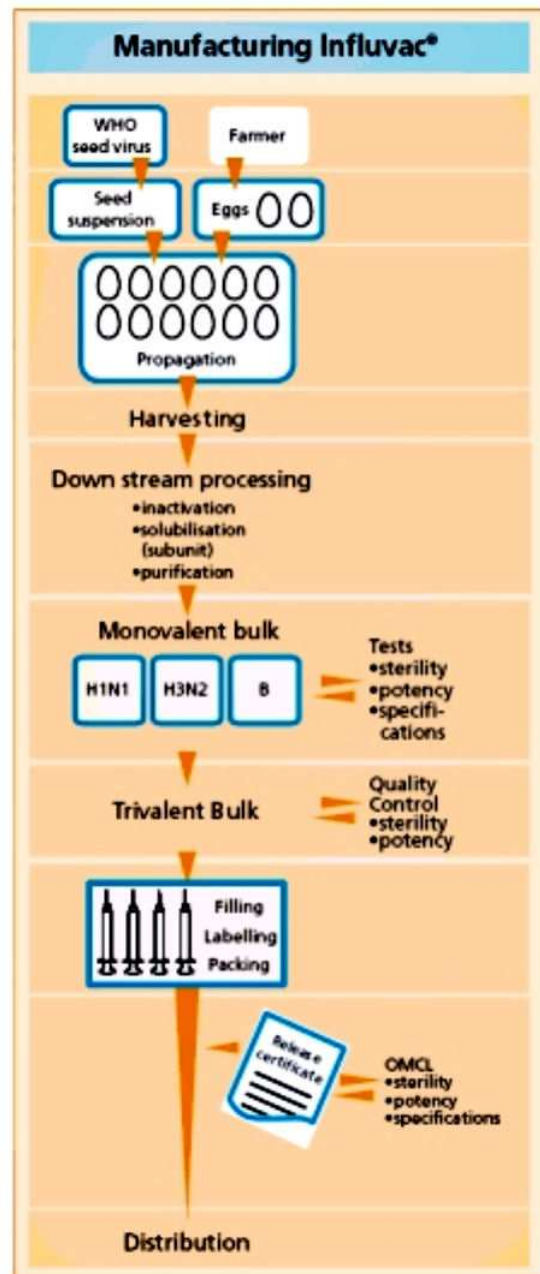


7. ábra SPF tojások megnyitása vírus aratáshoz

*Esettanulmány:* hagyományos influenza vakcina gyártása csirkeembrióban

A legnagyobb tömegben tojásokban készített vakcina az évi rendszeres influenza elleni védőoltás. Az influenza vírus nagyon változékony, legalább negyven altörzse van jelen az emberi populációban. A WHO évente szakértői előrejelzést készít arról, hogy a következő évben melyik három altörzs járványos elterjedése várható. A törzsbankból vírus inokulum tenyészetet adnak ki minden országnak, amelyik igényli. Ezeket az oltóanyaggyárakban tojásokban párhuzamosan szaporítják. Az élő, fertőző vírusokat maximális biztonsági körülmények között formaldehiddel inaktíválják. Az elpusztult vírusok köpenyét detergens kezeléssel alegységeire bontják (split vírus). Tisztítás után a háromféle vírus antigént egyesítik, így trivalens vakcinát kapnak.

A hideg évszak beköszöntével megkezdik a lakosság oltását, ezzel csökkentik a megbetegedések gyakoriságát és súlyosságát.

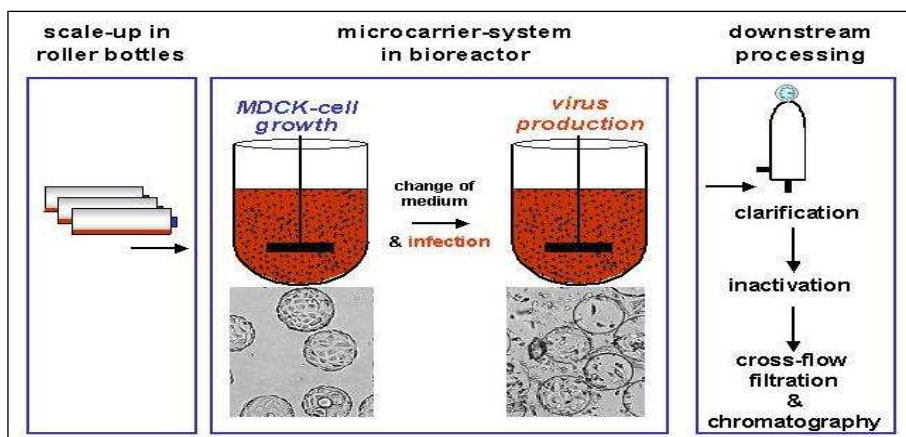


9. ábra Trivalens influenza vakcina termelése tojásban

#### 18.4.3.2 Vakcinagyártás sejtenyészetekben

Nagyobb léptékben és rugalmasabban alkalmazható a **sejtenyészetekben** történő vírus tenyésztés. Az egész gazdaszervezet helyett csak szöveti vagy dedifferenciált sejtvonalon szaporítjuk a vírust. Az állati sejtek tenyésztéséről részletesebb leírás a rekombináns fehérjék gyártásánál olvasható.

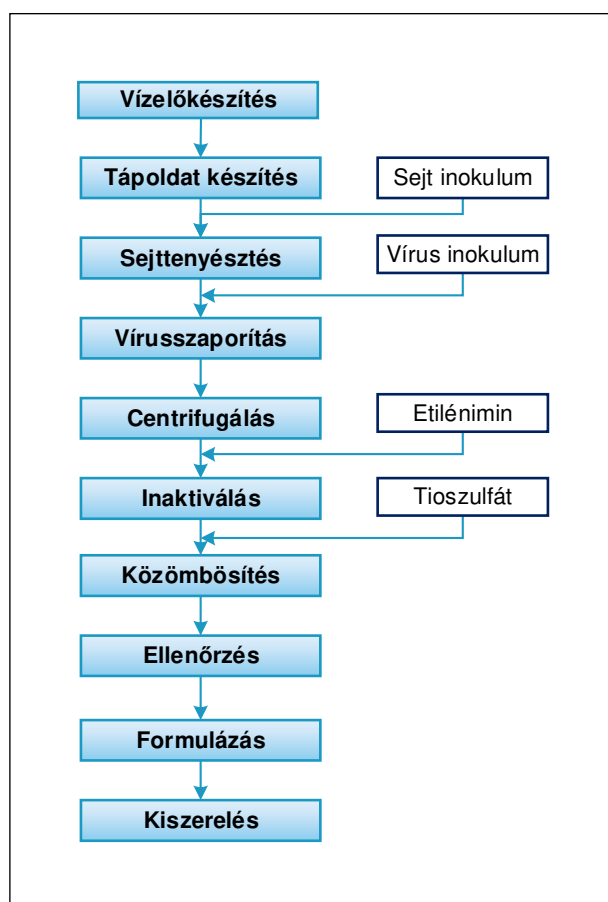
A technológia ebben az esetben is két szakaszra osztható. Előbb a sejteket kell elszaporítani, utána következhet a vírussal történő fertőzés. A sejt szaporítás módja szintén a rekombináns fehérjék gyártásánál található, itt csak annyit jegyzünk meg, hogy más készülékek szükségesek a kitapadó (anchorage-dependent) sejtek és a szuszpenzióban növekedő sejtek esetén. A tenyésztés célja ebben az esetben a nagy sejtkoncentráció, nem egy termelt fehérje. Megfelelő sejtszám elérésénél következik a vírusok ráoltása. A vírusokat is egyfajta working „cell” bankban tárolják, innen veszik elő az oltóanyagot. Ennél a lépésnél fontos paraméter a vírusok száma. Ha kis számú vírussal oltanak (pl. a vírus szám két nagyságrenddel kisebb, mint



10. ábra Inaktivált vírusvakcina gyártása

a sejtek száma), akkor két generációt, két víruszaporodási ciklust kell kivárni. Ha viszont a két szám egy nagyságrendben van (pl. ~2 vírus/sejt), akkor egy ciklusban elérhető a maximális vírus titer. A fertőzés után 10-36 órán keresztül tart a vírusok szaporodása. A tenyésztési paraméterek, pl. a tápoldat optimális összetétele, pH-ja, hőmérséklete eltérő lehet a sejtzaporodási szakaszhoz képest.

A kapott vírus szuszpenzió feldolgozása a szaporítás közegétől függetlenül hasonlóan történik. A vírusok hatására a sejtek a sejtek lizálnak, a sejtörmelékét nagy g-vel, csőcentrifugával választják el. Az attenuált vírusok mehetnek a tisztítás és formulázás irányába, az patogén vírusok viszont inaktiválásra kerülnek. Az inaktiválásnál az a nehézség, hogy a vírusok nukleinsav állományát kell használhatatlanná tenni úgy, hogy közben az epitópopokat alkotó, lényegesen érzékenyebb fehérje molekulák ne változzanak meg. Leginkább szelektív kémiai reagenseket, alkilező szereket használnak (etilénimin, bis-etilénimin). Ezek nagyon reaktív vegyületek, ezért rendszerint az alkalmazás előtt, a helyszínen állítják elő. Mivel a DNS-sel reagálnak, erősen rákkeltőek, emiatt minden lépést elszívó fülkében, különleges védőeszközökkel végeznek. Az inaktiváló oldat bevitele után a reakció vírustól függően 2-24 órán keresztül folyik. Ekkor feleslegben nátrium-tioszulfát oldatot adnak az oldathoz, ez elbontja a maradék etilénimint. A tételből mintát vesznek és ellenőrzik, hogy nem maradt-e benne még élő vírus. Ez a vizsgálat sokszor egy hétig is eltart, addig a folyadékot szigorúan lezárva a hidegszobában +4 °C-on tárolják. A negatív eredmény után lehet a tételt felszabadítani és további feldolgozásra átadni. Az élő, patogén vírusoknál a containment-et eddig a pontig fenn kell tartani. Tehát



11. ábra Inaktivált vírusvakcina gyártásának blokk-sémája

a vírus beadásától a felszabadításig minden berendezést, szerelvényt és csővezetékét végig hermetikusan zártan kell kezelni, tilos megbontani mindaddig, amíg az adott részt nem fertőtlenítik, szanitizálják.

Az eddigi lépések eredménye mind az attenuált, mind az inaktivált vírusok esetében egy ártalmatlan vírus szuszpenzió. Ennek koncentrációját szükség esetén mikroszűréssel lehet növelni, de általában a készítményt inkább hígítani kell a megfelelő hatás beállítása érdekében. A *formulázás* során puffercserével, stabilizátorok hozzáadásával jön létre a vakcina, amit felhasználási tételekbe szerelnek ki. A teljes technológia blokkvázlata a 11. ábrán látható.

#### 18.4.3.3 Alegység vakcina gyártás

A teljes kórokozó helyett annak csak egy jellegzetes, erőteljes immunreakciót kiváltó felületi fehérjéjét, egy epitópját állítják elő és adják be a megvédendő személynek. Ezt a molekulát rekombináns fehérjeként egy ártalmatlan gazdaszervezet felhasználásával termeltetik. A gyártás és a termék biztonságosabb és egyszerűbb, mert a kórokozó egyáltalán nincs jelen. A K+F folyamat lépései ugyanazok, mint bármely más rekombináns fehérje esetében:

1. az antigén fehérjét kódoló gén izolálása, esetleg szintetizálása
2. bevétel egy jól kezelhető gazdaszervezetbe, expresszálas.
3. A fehérje előállítása fermentációval.
4. Feldolgozás, tisztítás
5. Adjuválás

#### Adjuválás

A fehérjéket tartalmazó (toxoid, alegység, konjugált, VLP) vakcinák gyártási technológiájának utolsó művelete mindig az *adjuválás*. (Az elnevezés a latin *adiuvo*, *adiuvat* = segít, támogat, előmozdít szóból származik, mivel a művelet felerősíti az antigén tulajdonságot). Az adjuvánsok olyan anyagok, amelyek nem specifikus immunválaszt váltanak

PRODUCT	ACTIVE COMPONENT	HUMAN VETERINARY EXP. IMM.		
<b>MINERAL ADJUVANTS</b>				
Alhydrogel 1.3%	aluminium hydroxide	+	+	+
Alhydrogel 2.0%	aluminium hydroxide	+	+	+
Alhydrogel "85"	aluminium hydroxide	+	+	+
<hr/>				
Adju-Phos 2%	aluminium phosphate	+	+	+
<hr/>				
Calcium phosphate adjuvant	calcium phosphate	+	+	+
<b>SAPONIN ADJUVANTS</b>				
Quil-A saponin adjuvant	triterpenoid glycoside	-	+	+
<b>OIL EMULSION ADJUVANTS</b>				
Freund's incomplete adjuvant	Mineral oil + emulsifier	-	+	+
<hr/>				
Freund's complete adjuvant	Mineral oil + emulsifier + M tuberculosis	-	-	+

2. táblázat Különböző adjuváns anyagok (katalógus részlet)

ki, mintegy előkészítik a terepet a specifikus hatású antigének elleni immunreakció előtt. Az adjuvánsok önmagukban gyulladásszerű állapotot hoznak létre a kezelés helyén, ezzel felkészítik az immunrendszert. Ettől erősebb/tartósabb immunválasz alakul ki (2-3-szoros növekedés!), azaz kevesebb vakcinát kell alkalmazni és tovább eltartható a készítmény. A teljes (attenuált vagy inaktivált) vakcinák esetében nem szükséges az adjuválás, mert a szilárd részecskék önmaguk is adjuváns hatásúak.

A használt anyagok között vannak szilárd (kolloid méretű alumínium-hidroxid és -foszfát szemcsék) és folyékony (ásványi és növényi olajok) halmazállapotúak is. A folyadékoknál a vakcinát steril olajjal és emulgeáló anyagokkal keverik, majd nagy nyomással keresztül nyomják egy homogenizátor szelepen és ezáltal finom, stabil emulziót hoznak létre.

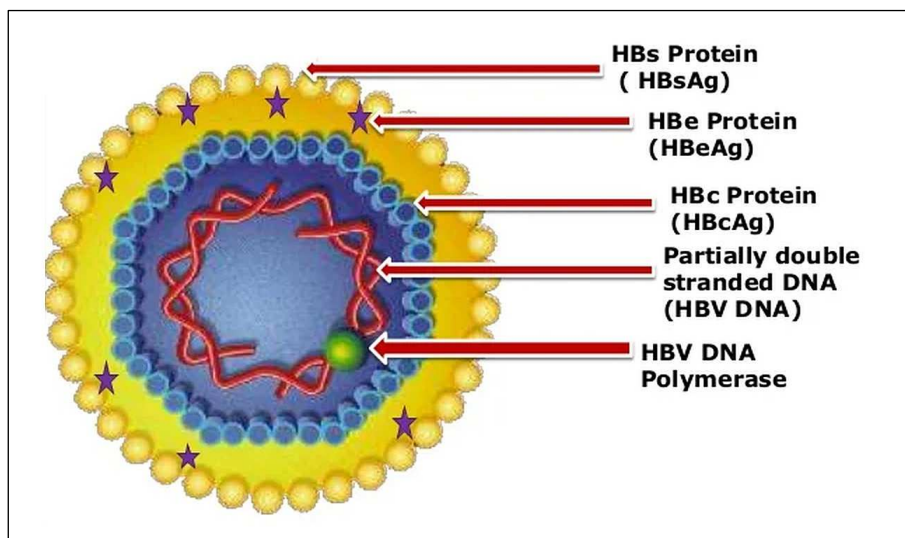
*Érdekesség: ugyanezt a berendezést használják a tartós tej zsírcseppeinek aprítására (homogenizált tej) és sejteltérésre is.*

#### 18.4.3.4. Esettanulmány: a hepatitis B vírus (HBV) vakcina gyártása

A fertőző májgyulladást többféle vírus okozhatja. A sok közös tünet ellenére a különböző vírustörzsek jól elkülöníthetők. Megjelölésükre az ABC betűit használják, A-tól E-ig. A hepatitisz-A viszonylag enyhe lefolyású betegség, nagy eséllyel spontán gyógyul. Járványt a rossz higiéniai körülmények között élő populáció körében okoz, mivel a széklettel terjed. A hepatitis B súlyosabb betegség, a vírus hatására a májsejtek pusztulnak, májgyulladás, májelégtelenség, sárgaság alakul ki. A spontán gyógyulás a gyermekkori fertőzéseknél ritka, a felnőtteknél viszont ez a jellemző. Krónikus formában az évek alatt májszög, és az esetek néhány százalékában carcinoma jöhet létre. A beteg mindvégig fertőző, a vírus vérrel, testnedvekkel, szexuális úton és közös tűhasználattal terjed. Lappangási ideje 1,5-3 hónap, a beteg ezalatt is vírusgazda, megfertőzhet másokat. A fertőzés terjedésének megakadályozása érdekében a vérátömlesztéshez levett vért már húsz éve hepatitisz B és C vírusra is tesztelik.

A WHO adatai szerint világszinten az emberiség mintegy 5%-a fertőzött, ez kb. 350 millió embert jelent. Ez természetesen egy átlagérték, a fejlettebb egészségüggyel rendelkező országokban ez az arány lényegesen alacsonyabb, hazánkban 1% alatti.

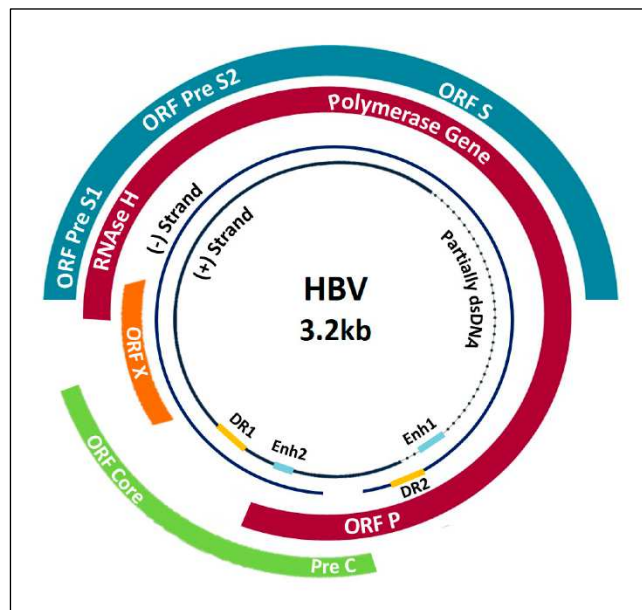
A vírus a májsejtekben szaporodik, az új vírusok a májsejtek szétesésével a vérbe kerülnek. Ez a betegek véréből kimutatható, sőt izolálható. A vírus tokféhéjéi nagy mennyiségben képződnek, a monomer, félkész vagy üres tokok is megjelennek a vérben. Ezekből készült a legelső vakcina, de ez egyrészt korlátozott mennyiségben volt elérhető, másrészt fennállt a vírusátvitel veszélye (nem csak a HBV, de más vérrel terjedő vírusok, pl. a HIV is!), ezért áttértek a rekombináns alegység vakcinára.



12. ábra A hepatitis B vírus felépítése

A vírus 42 nm átmérőjű, kívülről közel gömb alakú. Két összefüggő fehérjeburok borítja. A külső réteget a hepatitisz-B surface (felületi) antigén (HBsAg) alkotja, a belső ikozaéderez elrendezésű „core” antigénekből (HBcAg) áll. A harmadik, „endo” antigén nem alkot összefüggő réteget. A szerkezet legbelsejében található a DNS és a vírus saját DNS-polimeráz enzime.

A HBV DNS szerkezete rendhagyó, nem végig kettős szálú. A (+) szál hiányos. A (-) szál ~3200 nukleotid hosszúságú, a + szál ennek csak 55-75%-a. A kódoló szakaszok átfednek, „néma” szakasz alig van, hét „open reading frame” különíthető el. A vírus replikációja speciális. A DNS-ről először egy RNS kópia (pregenom) készül, erről reverz transzkriptázzal íródik át az új DNS (-) szála. Erre épül rá a (+) szál. Ha a szükséges nukleotidok elfogynak, ez a szál csonka marad. De az összeépülés így is megtörténik, a hiányos vírus is fertőző és szaporodóképes.



13. ábra A HBV genom felépítése

Mindegyik antigén fehérje képes immunreakció kiváltására. A vakcinához célszerűen a surface (felületi) antigént választották, mivel vírusfertőzésnél ezt észleli elsőként a szervezet.

A HBsAg fehérje valójában három doménből áll, amelyek 55, 108 és 226 aminosavból állnak. Ez utóbbit nevezik kicsi (S, small) láncnak. 55 aminosavval hosszabb a közepes (M, medium) forma, és újabb 108 tagú lánc kapcsolódásával alakul ki a nagy (L, large) fehérje.

Ezek hajlamosak a szétesésre, külön is kimutathatók a szervezetben. A molekulában két N-glikozilációs hely található. A kódoló génszakaszok a DNS-ben egymás mellett helyezkednek el (PreS1, PreS2, S), a vakcinához elégséges az S génszakasz termelése.

A felületi antigén génjét először *E. coli*-ba vitték be egy plazmiddal. A fehérje sikeresen expresszáldott, de glikoziláció hiányában nem volt hatékony. A cukormintázatot eukariótákkal kellett kialakítani. Két technológia is eljutott az engedélyezésig. Élesztővel aktív fehérjét kaptak, de az a sejten belül maradt, kinyeréséhez sejtfeltárást kellett végezni. Emlős sejtek tenyésztésével extracelluláris, hatékony fehérjét kaptak, de ez az út költségesebb.

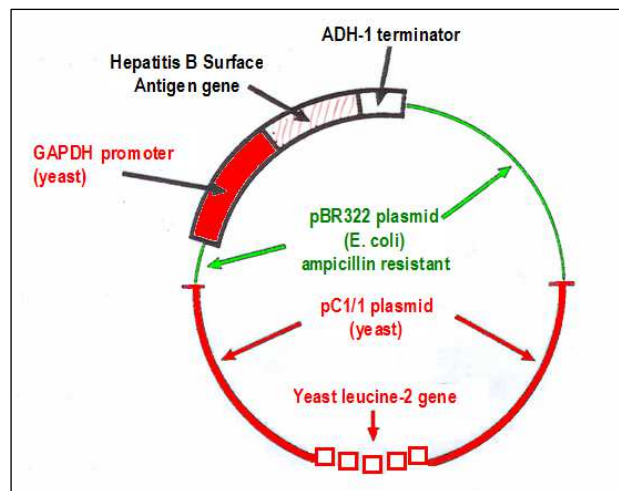
Az élesztő törzs manipulálásához használt ingázó (shuttle) vektor kialakítása azért érdekes, mert hatással van a fermentációs technológiára is. Az ilyen vektorok egyes elemeit meg kell duplázni, hogy prokariótákban (tipikusan *E. coli*-ban) és a kiválasztott eukarióta szervezetben egyaránt működőképesek legyenek. A 14. ábrán bemutatott vektor két plazmidből áll, a coliban működő pBR 322-t és az élesztő PC1 plazmidjét kapcsolták össze. Ebben már benne van a kétféle replikációs origó, és az ampicillin rezisztencia. Az élesztőnél markerként a leucin bioszintézis második enzimének génjét építették be. A sikeres szelekcióhoz a használt



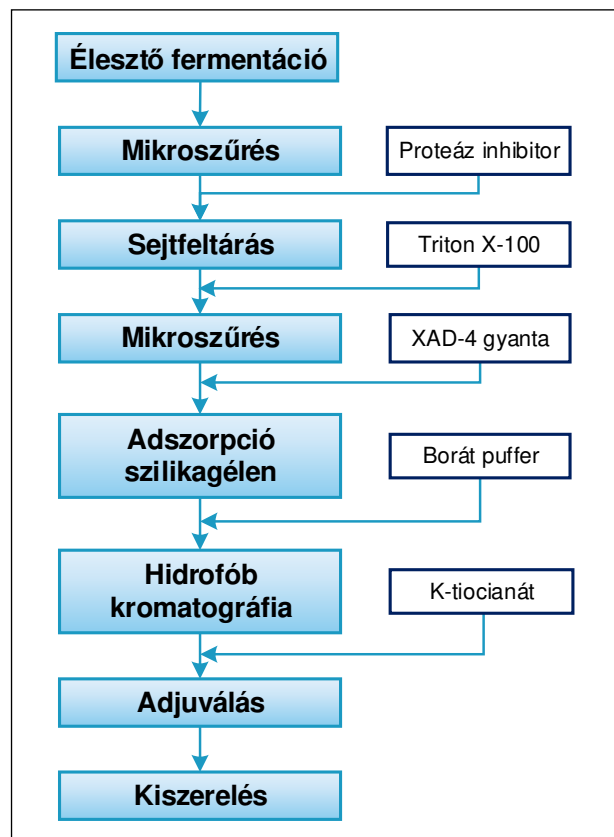
élesztőtörzsben ezt a gént kiütötték. Így leucin-mentes tápoldaton csak a sikeresen transzfektált sejtek nőnek ki. A célgén a *coli* szakaszon található, a kazetta elejére konstitutív promótert kapcsoltak, a végén terminátorral zárták le. Csak az S fehérje génszakaszát építették be, ez is megfelelő immunogenitást biztosított.

A gyártásban kétfázisú szakaszos fermentációs technológiát alkalmaznak. Az első, sejt szaporítási szakaszban leucin-mentes tápoldaton nevelik az élesztőt. Ennek az a célja, hogy a nagy plazmid tartalmú sejtek kerüljenek túlsúlyba. A második, vírus szaporítási szakaszban már komplex tápoldatot adnak, hogy semmi ne limitálja a szintézist.

A feldolgozás első lépése a sejt tömeg elválasztása. Az élesztősejteket centrifugálással és mikroszűréssel egyaránt el lehet távolítani. A sejtekben lévő még aktív fehérje bontó enzimek hatásának kivédésére proteáz inhibitorokat adnak. Az S-fehérje a sejtekben található, ezért sejt feltárást kell alkalmazni. Mechanikai feltáró berendezéssel, például nagy nyomású homogenizátorral detergens jelenlétében roncsolják a sejteket. A sejt törmelékét újabb mikroszűréssel választják el, az antigén fehérje a szűrletbe kerül. A bevitt detergenst apoláris felületű adszorbens gyantával távolítják el. A következő lépésben a fehérjét kötik meg szilikagélen (pl. Aerosil), majd meleg borát pufferrel eluálják. A továbbiakban hidrofób kölcsönhatás kromatográfiával (HIC, butil-agaróz tölteten) tisztítják. A diszulfid hidak megfelelő kialakítására oxidatív közeget hoznak létre kálium-tiocianáttal. A vakcinafehérjét alumínium vegyülettel adjuválják.



14. ábra Az élesztőbe bevitt ingázó vektor (kettős plazmid) szerkezete



15. ábra HBV vakcina feldolgozási lépéssora

A végterméket sokféle ellenőrző vizsgálat után hozzák forgalomba:

- Fehérje tisztaság: max 1-5% HCP (host cell protein = élesztő fehérje)
- Azonosítás: MAb (epitóp analitika)
- DNS tartalom: max 10 pikogram/l (!)
- Hatékonyság: állatkísérletekben (egér, tengerimalac)
- Pirogének: LAL teszt
- Mikrobiális tisztaság
- Stabilitás: 2-3 év +4 fokon

#### 18.4.3.5 Konjugált vakcinák gyártása

A konjugált vakcinák két egységét külön állítják elő, majd kémiai reakcióval kapcsolják össze.

A kapszuláris poliszacharidot (pl. a *Haemophilus influenzae* esetében poliribozil-ribitol-foszfátot) a patogén törzs fermentációjával állítják elő. A sejteket kationos detergenssel kezelik és centrifugálással választják el. A feltárt pasztát pufferrel újra szuszpendálják és a poliszacharidokat az ionerősség növelésével leválasztják a sejtörmelékről. A továbbiakban ultraszűréssel, alkoholos kicsapással tisztítják, vákuumban szárítják, és -35 °C-on tárolják további feldolgozásig.

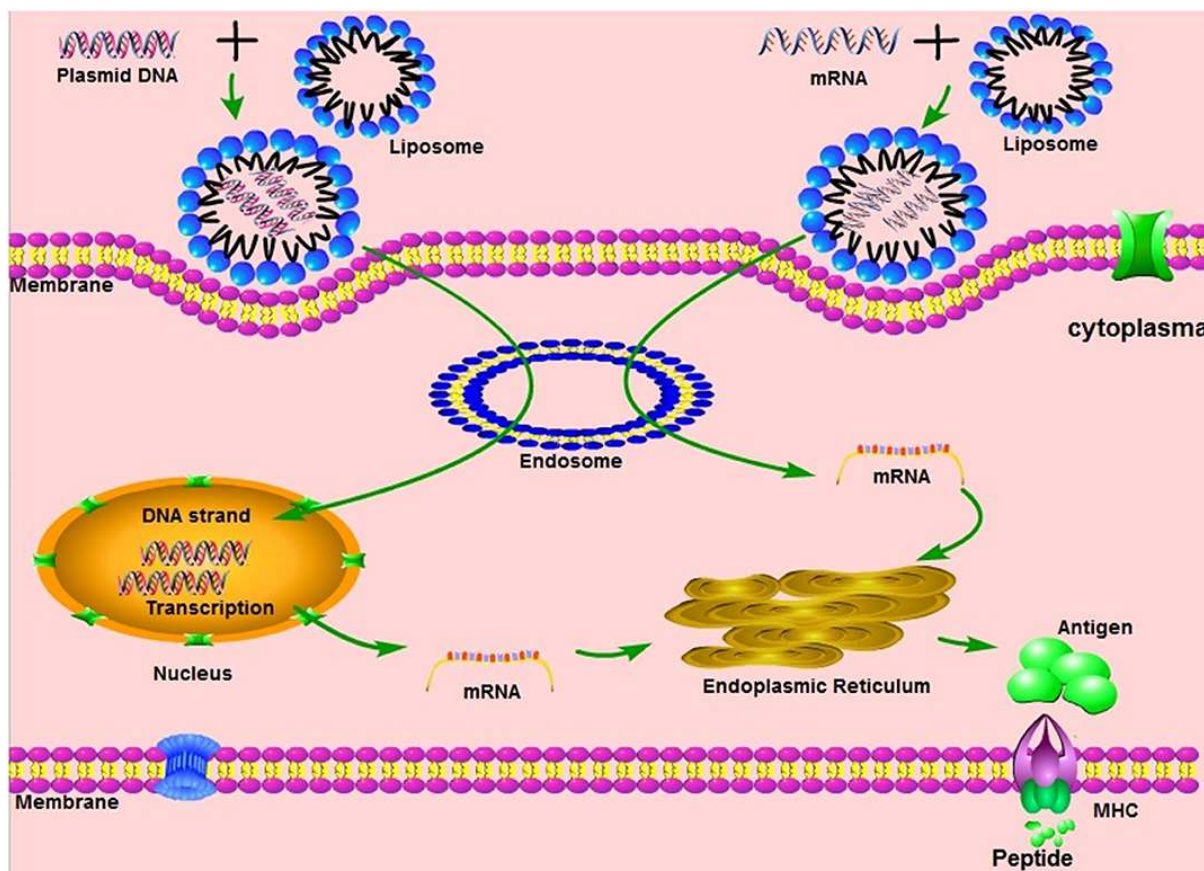
A fehérjerészt külön fermentációval termelik. A klasszikus módszer a tetanusz toxoid alkalmazása volt, amit a jól bevált gyártási technológiával állítottak elő. Gyorsabb és egyszerűbb módszer a toxoidhoz nagyon hasonló rekombináns fehérje (P16) termelése *E. coli* törzssel. A P16 célfehérje a sejtek periplazmás terében lokalizálódik. A sejteket csőcentrifugával betöményítik, nagynyomású homogenizátorral feltárják. A sejteltávolítás során keletkező sejtörmelék eltávolítása is csőcentrifugával történik, de a nagy viszkozitás csökkentésére előbb DNÁzt kell adagolni. A kinyert fehérjét három kromatográfiás lépésben tisztítják.

A szénhidrát és a fehérje egységeket kémiai reakcióval, pl. karbodiimiddel kapcsolják össze. A maradék egységeket elválasztják a nagy molekulájú terméktől.

#### 18.4.3.6 Nukleinsav vakcinák

A nukleinsav vakcinák bevitelét utánozza az élő mikroorganizmusokkal való fertőzés, illetve immunreakció folyamatát.

Ezek gyártása gyorsabb és biztonságosabb, mivel nem kell patogén szervezeteket nagy



16. ábra A DNS és mRNS vakcinák működésének összehasonlítása

léptékben szaporítani. A gyorsabb gyártás pedig lehetővé teszi, hogy járványos betegség megjelenése esetén rövidebb időn belül lehessen nagy tömegeket átoltani. A DNS- és az RNS-vakcinák sejten belüli útvonala különbözik. Az elején és a végén vannak közös lépések, a sejtbe való belépés és a riboszomális fehérjeszintézis, valamint a termelt antigén bemutatása a sejt felszínén azonos. De közben a DNS molekulának be kell lépnie sejtmag membránján, át kell íródnia a mRNS-re, ennek vissza kell térnie a citoplazmába, és csak ezután megy végbe a transzláció. Eközben a DNS ki van téve a sejt nukleáz enzimeinek, amelyek az idegen örökítő anyag lebontásával védik a sejt normális működését. Ugyanakkor felmerül annak kockázata is, hogy az idegen DNS beépül a gazda genomba, megzavarva annak működését.

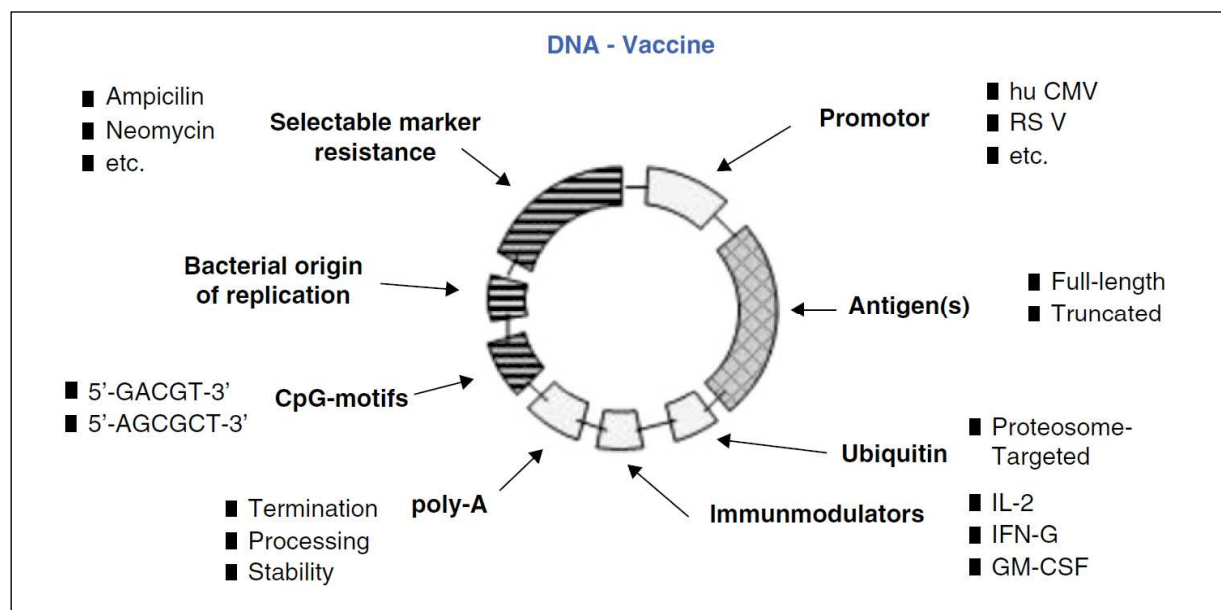
Az RNS molekuláknál ezek a gondok nem jelentkeznek, emiatt sok fejlesztés indult meg a profilaxis (vakcinák) és terápia (tumorellenes szerek) területén.

Gondot jelentett ugyanakkor az, hogy mindkét típus aktiválja a veleszületett (innate) immunrendszert, ami problémákat okozhat.

### DNS vakcinák

A DNS-vakcinák lényegében DNS-alapú vektorok, amelyek gazdasejt helyett közvetlenül az emberi szervezetbe viszik be és expresszálják a patogén fehérje antigén szekvenciáját. A vektorba az antigén mellett más immunmodulátorok génjét is be lehet építeni. Ezeket a plazmidokat baktériumokban (pl. *E. coli*-ban) termelik, kinyerik és tisztítják. A kör alakú kettős szálú DNS plazmidok alkalmasak a vakcinázásra. Mivel a fehérjéket a megvédendő szervezet maga állítja elő, a posztranszlációs módosítások, így a glikozilálás is megfelelő lesz. Az alegység vakcinákhoz hasonlóan a DNS-vakcinákat is adjuválják. A „csupasz” DNS nem működik.

A DNS-vakcinák hatásukban utánozzák az élő, attenuált vakcinákat, de a reverzió kockázata nélkül. A DNS-vakcinák a teljes, humorális és sejtes immunválaszt képesek stimulálni. A plazmid DNS stabil, hűtés nélkül is tárolható. A vakcinázáshoz használt plazmid DNS-konstrukciók jellemző részei (17. ábra):



17. ábra A DNS vakcina (plazmid) jellemző részei

- Erős promoter/enhancer szekvencia a beépített idegen gén kiírásához
- Megfelelő klónozási hely idegen gének behelyezéséhez
- A replikációs origó (a baktérium törzshöz)
- PoliA/terminátor szakasz
- antibiotikumrezisztencia marker a szelekcióhoz
- Immunmodulátorok (pl. CPG-k, interleukinok, ubiquitin stb.)

A DNS-vakcináknak több biológiai barrieren is át kell lépni a sejtmag felé vezető úton. Ahogy a plazmid DNS-t a célszövetbe, például a vázizomba beadják, a szöveti nukleázok megtámadják és elbontják a bevitt DNS nagy részét. A maradéknak is csak kb. 1%-a tud átlépni a sejtmembránon fagocitózissal vagy pinocitózissal. A sejten belül is ki van téve az exo- és endonukleázok hatásának, így csak 0,1% (becsült érték) kerül be a sejtmagba. A kisebb molekulák (<~40 kDa) passzív diffúzióval képesek átjutni a magmembrán pórusain, a nagyobb részecskék viszont csak hordozófehérjék támogatásával tudnak belépni. A rossz hatások teljesen érthető, hiszen minden sejt nukleázokkal védekezik az idegen DNS-sel szemben. A plazmidok megvédésére többféle módszert is alkalmaznak, így például a liposzómába való beágyazást vagy a DNS kötését dendrimerekhez.

A DNS vakcinákat előbb többféle állati betegség megelőzésére fejlesztették ki, csak ezután került sor a humán vakcinákra.

#### *RNS vakcinák*

Az RNS vakcináknak két fő típusa létezik, a (passzív) mRNS és az önmagát amplifikáló RNS (saRNS) vakcinák.

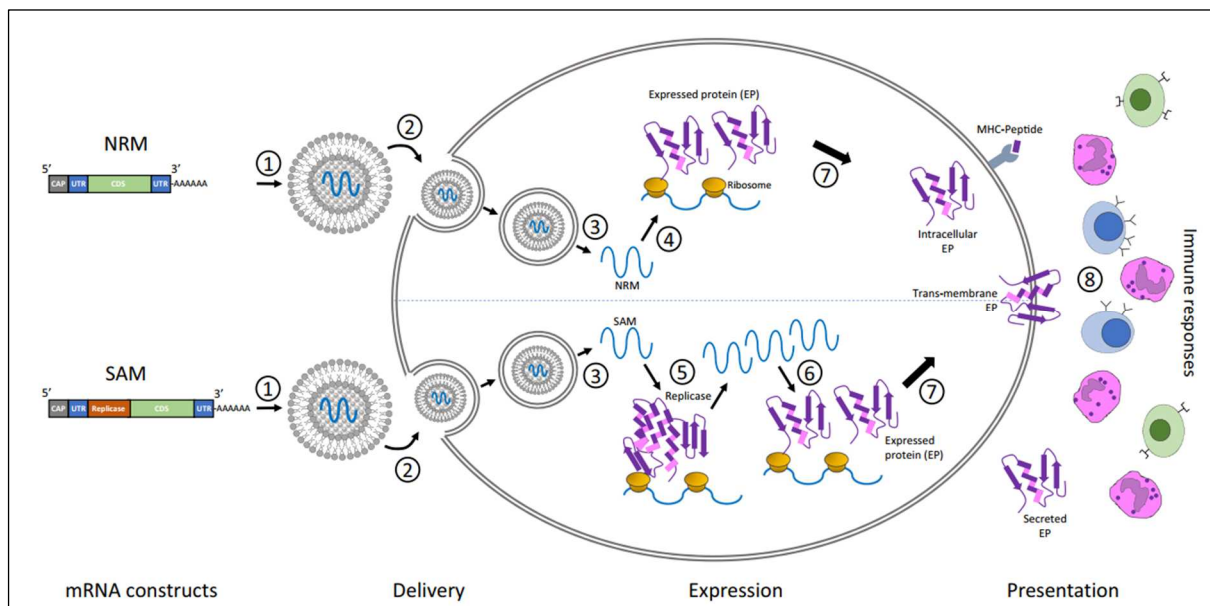
#### *Passzív mRNS vakcina*

A hagyományos vagy passzív mRNS-vakcinák egy genetikai egységet tartalmaznak, a célantigén mRNS-ét, más fehérjét kódoló génszakaszt viszont nem. A mRNS maximum két nap alatt elbomlik, így nem marad a szervezetben. Templát híján a fehérje termelés is leáll.

#### *Önreprodukáló mRNS vakcina*

A mRNS gyors elbomlása miatt fejlesztették ki az önreprodukáló RNS vakcinákat. Ehhez RNS vírusokat alakítanak át. A replikáz egységet megtartják (ez tartalmazza a reverz transzkriptáz enzimet) és a tokfehérjék génjének helyére illesztik be az epitóp génjét. Az így kapott genomokat replikonoknak nevezik. Az emberi sejtekben másolódní kezdenek, mint az eredeti vírus. A genom sok példányban elkészül, és erről rengeteg fehérje is szintetizálódik. De ez idegen antigén fehérje, nem tud a nukleinsavval érett vírussá összeállni. A tok nélküli vírus RNS életképtelen, nem képes más sejteket megfertőzni. A tokfehérjék helyett keletkező epitóp fehérje viszont bemutatásra kerül a sejt felületén és kiváltja a mind a humorális, mind a sejtes immunválaszt.

A sokszorozódásnak köszönhetően dózisonként kisebb mennyiségű oltóanyagra (saRNS-re) van szükség, mint a nem replikálódó mRNS-vakcinák esetében, ami költségmegtakarítást és nagyobb termelékenységet eredményezhet.



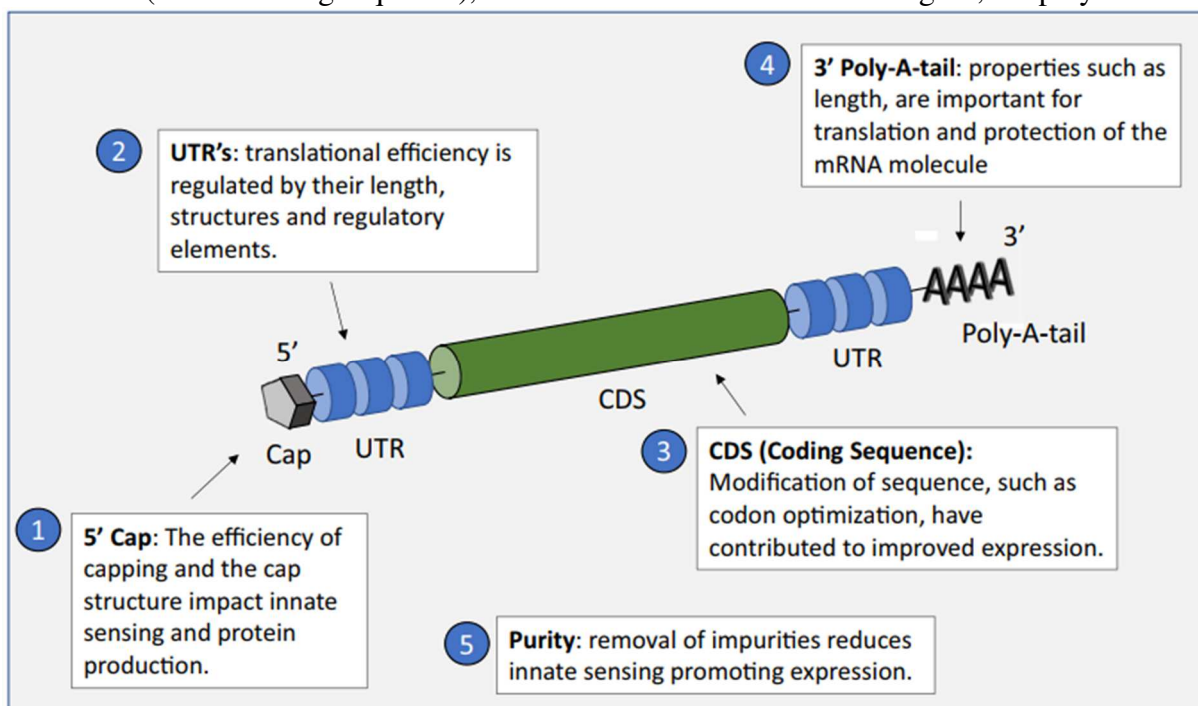
18. ábra A kétféle mRNA vakcina működésének összehasonlítása

#### 18.4.3.7 Nukleinsav vakcinák gyártása

Mindkét RNS vakcina típus gyártási technológiája azonos lépésekből áll.

Az mRNA sejtmentes enzim transzkripcióval in vitro is előállítható. Ehhez szükség van az mRNA vakcinát sablonként kódoló linearizált plazmid DNS-re, egy rekombináns RNS-polimeráz enzimre és a nukleozid-trifoszfátok keverékére. A molekula végére egy természetes vagy analóg szintetikus sapkaszerkezetet kapcsolnak. A lánc másik végére poli(A) terminátort építenek.

Az eukarióta mRNA általános felépítésének megfelelően (19. ábra) középen áll a kódoló szekvencia (CDS – coding sequence), kifelé haladva nem transzlálódó régiók, a 3' poly-A-farok



19. ábra Az érett, transzlációra kész mRNA felépítése

és 5'Cap analóg. A CDS hordozza a translációhoz szükséges információt, valamint a START és STOP kodonokat. Mind a pro-, mind az eukarióta mRNS-ek rendelkeznek 5'UTR és 3'UTR (untranslated, nem transzlálódó) régiókkal. Ezek, ahogy a nevük is jelzi, nem kerülnek translációra, hanem az transláció iniciálásához, a riboszóma kötődéshez szükségesek.

Az RNS típusú vakcina gyártására a már ismert DNS-templátos, enzimes RNS-szintézist alkalmazzák. A gyártás cDNS-templáton, tipikusan plazmid DNS-en (pDNS) in vitro transzkripcióval történik, ezért a folyamat első lépése a pDNS előállítása. A szintetizált plazmidot *E. coli* fermentációval szaporítják el. A sejtfeltárás után a tisztítatlan pDNS tartalmazza baktérium genom DNS nyomait és a pDNS három formáját (szuper tekercselt, relaxált kör és lineáris) is. Emiatt a tiszta és invariáns pDNS reprodukálható előállítása - ami egy vakcinához elengedhetetlen - meglehetősen nehéz feladat.

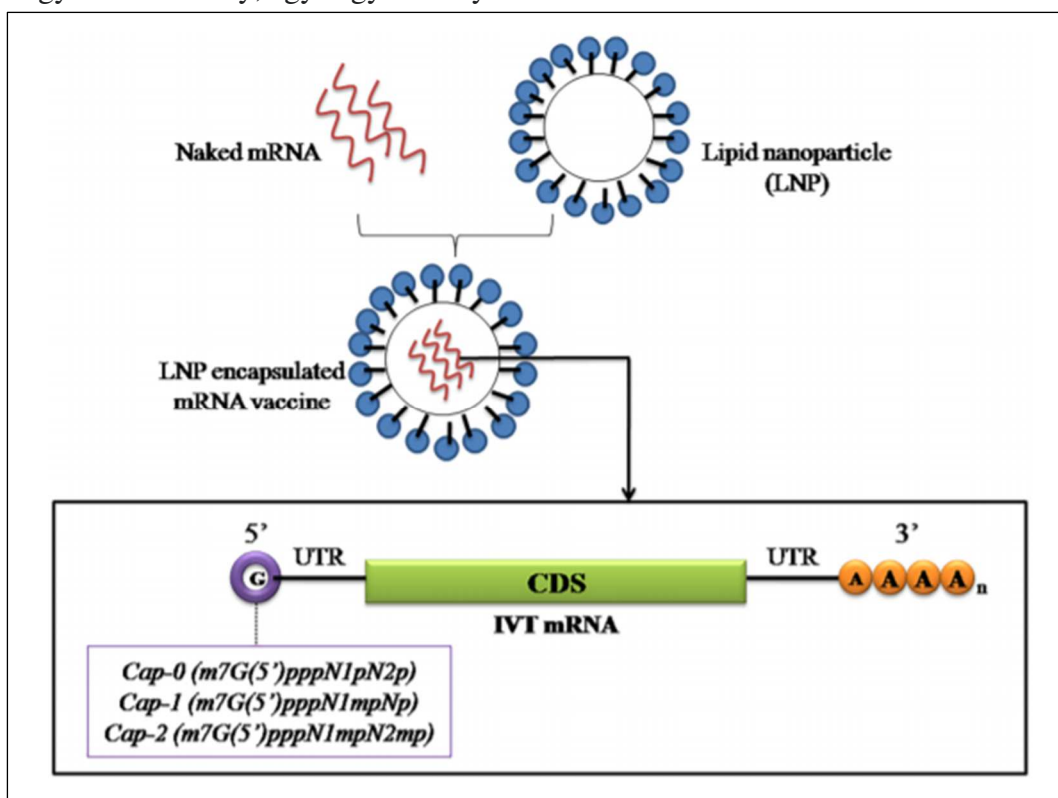
A második lépésben a linearizált pDNS-templátot, rekombináns RNS-polimerázt (T7, T3 vagy SP6) és nukleozid-trifoszfátokat tartalmazó oldatban írják át mRNS-re (37 °C, 2-4 óra).

Alternatív megoldásként a cap, illetve a poli(A) utólag is rákapcsolható az mRNS láncre.

A bakteriális DNS maradványok és a pDNS heterogenitása azonban nem okoz gondot, ha a linearizált pDNS-t már átírták, mert a következő lépésben a szennyező baktérium-DNS, valamint a pDNS-templát DNáz enzim segítségével elemészthető (37 °C, 0,5 óra).

A reakcióelegy azonban szennyező RNS fajtákat tartalmaz, rövidebb és hosszabb transzkriptumokat. Ezeket méret szerinti elválasztással, ultraszűréssel és/vagy kromatográfiával különítik el.

A kész RNS stabilitása függ a formulázás módjától. A tiszta RNS trehalózzal liofilizálva szilárd állapotban szobahőmérsékleten is eláll egy évig. Ez a forma viszont nagyon rossz határfokkal éri el a sejtmagot. Ha viszont a kész RNS hatóanyagot speciális detergenszerekkel lipid nanorészecskébe formulázzák, az megkönnyíti a biológiai membránokba való beoldódást, a citoplazmamembránon, illetve a sejtmagmembránon való átjutást. Ez a gyógyszerforma viszont nagyon bomlékony, egyes gyártmányokat -70-75 °C-on kell tárolni.




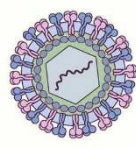
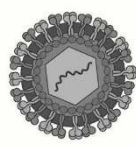
20. ábra mRNS vakcina lipid nanorészecskébe zárva

A terméket steril körülmények között ampullákba töltik és lezárják. Az oltóanyagot felhasználásig az előírt hőmérsékleten kell tartani.

#### 18.4.3.8 A SARS-Covid-19 vakcinák összehasonlítása

A Covid járvány hirtelen megjelenése és rohamos terjedése hihetetlen mértékben fölpörgette és intenzifikálta a vakcinakutatást és gyártást. A különböző kutatóhelyek sokféle elven működő vakcinák kifejlesztésébe fogtak, a klasszikus inaktivált vírustól a legmodernebb RNS vakcináig. A tucatnyi fejlesztés közül versenyelőnye volt az RNS vakcináknak, mivel az egyszerűbb gyártási eljárás megrövidítette a K+F folyamatot, a rekombináns tüskefehérje alapú oltóanyagok lassabb jutnak el az engedélyezésig.

Magyarországon jelenleg hatféle vakcinát engedélyeztek (21. ábra).

mRNA 	Pfizer/ BioNTech  Moderna	A sejtekbe bejutó mRNS hatására a sejtjeink termelni kezdik a SARS-CoV-2 vírus tüskefehérjéjét, ami immunválaszt vált ki
Viral vector 	Oxford/ AstraZeneca  Sputnik V  Johnson & Johnson	Adenovírus vektor A sejtekbe bejutó, ártalmatlan adenovírus tartalmazza a SARS-CoV-2 vírus tüskefehérjéjét kódoló gént, ami átíródva elindítja a tüskefehérje termelődését – ez váltja ki az immunválaszt
Inactivated 	Sinopharm	Inaktivált vírus Inaktivált (azaz nem fertőzőképes) SARS-CoV-2 vírus – megbetegedést nem okoz, de kiváltja az immunválaszt

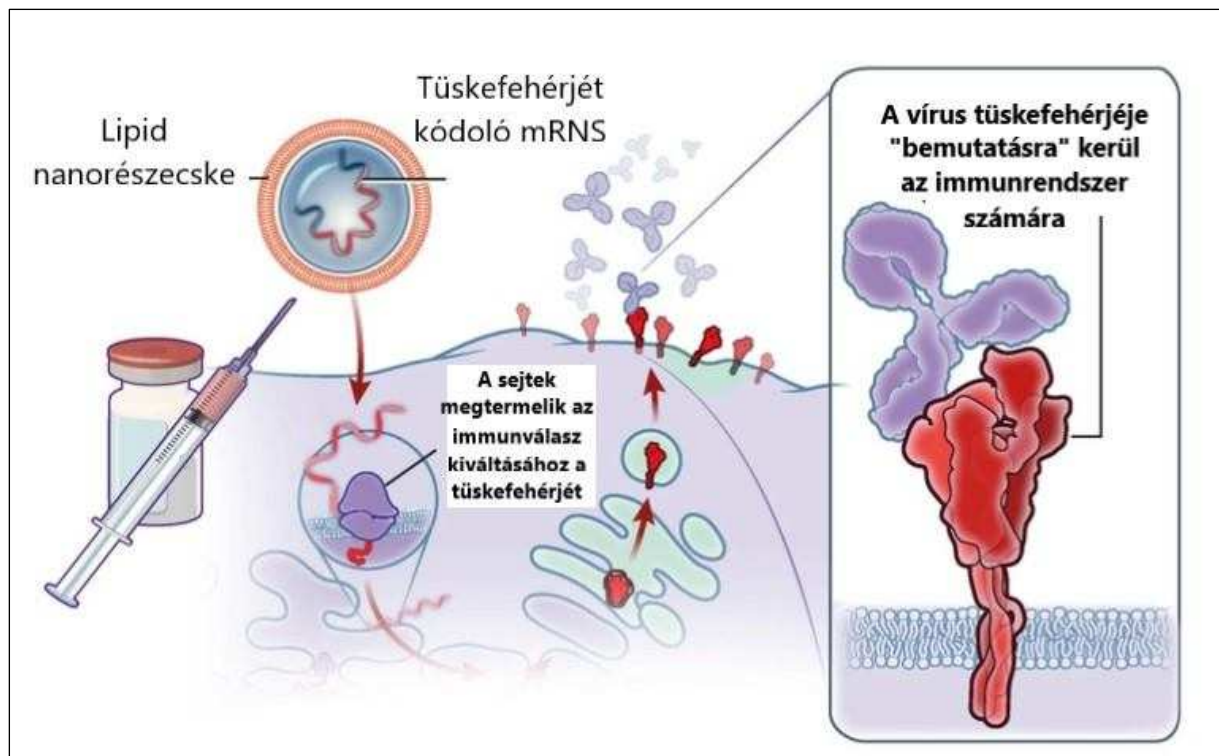
21. ábra A Magyarországon engedélyezett vakcinák működési elve

A Karikó Katalin és munkatársai által kifejlesztett, a Pfizer-BioNTech által gyártott mRNS vakcina nukleotid analógokat tartalmaz, így nem aktiválja a veleszületett immunrendszert. A készítmény hatásmechanizmusa a 22. ábrán látható.

Az RNS molekulákat speciális összetételű (három komponensű) lipid burokba formulázzák. A készítmény összetevői:

- a SARS-CoV-2 spike glikoproteint (S) kódoló nukleozid-módosított hírvivő RNS
- polietilén-glikol 2000-dimirisztoil glicerinnel
- koleszterin
- 1,2-disztearoil-sn-glicero-3-foszfo-kolin
- Trisz-(hidroximetil)-amino-metán = Trisz bázis
- trometamin-hidroklorid = Trisz-HCl
- ecetsav
- nátrium-acetát
- szacharóz

A termék kétféle pufferrendszert is tartalmaz (Tris és acetát puffer). Az ozmózisnyomást szacharózzal állítják be. Az oltóanyagot -75 °C-on tárolják, felolvasztás után 24 órán belül fel kell használni.



22. ábra A Pfizer-BioNTech mRNA vakcina hatásmechanizmusa

### 18.5. Az magyar egészségügy oltási rendszere

Az oltással megszerezhető védelem időtartama változó, ugyanis vannak olyan betegségek, amellyel szemben az oltások életre szóló védelemet adnak (pl. mumpsz, kanyaró), más betegségek esetén rendszeresen ismétlődő oltási program szükséges akkor, ha életre szóló védelemet akarunk elérni.

Magyarországon a lakosság egészének érdekeit figyelembe véve ingyenes oltási rendszert alakítottak ki. Az általános megelőző jellegű oltásokat életkorhoz kötötten, kötelező jelleggel mindenki megkapja:

**BCG**, tuberkulózis ellen, minden csecsemő megkapja három napos korától hat hetes koráig. A védelem időtartam egyénenként változó, de minimum 5-10 évig fennáll. (Ez ellenőrizhető szubkután tuberkulin próbával, vagy tuberkulin tapasszal. Ha bőrpír alakul ki, akkor a védelem fennáll.)

**DPT (DiPerTe)**, diftéria (torokgyík), pertusszis (szamárköhögés), tetanusz (merevgörcs) ellen, három részletben adják négy, harminchat hónapos és hatéves korban.

**SABIN cseppek (OPV: orális poliovakcina)**

**SALK vakcina (IPV: inaktívált poliovakcina)**, járványos gyermekbénulás (poliomyelitis) ellen. A Sabin cseppeket szájon át (orálisan) adják, a Salk vakcinát injekcióban. Három hónaposnál idősebb csecsemők kapják, három alkalommal, hat hetes időközönként, majd hároméves korig évente megismétlik.

**MMR** mumpsz, morbilli (kanyaró), rubeola (rózsahimlő) ellen jó, 1992 óta kötelező jelleggel 15 hónapos korban minden újszülött megkapja.



Az oltások egy másik csoportját csak közvetlen fertőzési veszély esetén adják, bizonyos esetekben kötelező jelleggel. Kötelező pl. a hastífuszos beteg vagy krónikus hordozó környezetében élőket előtt vagy attenuált *Salmonella typhi*t tartalmazó vakcinával oltani, továbbá a kanyarós beteggel érintkezett 15 hónaposnál fiatalabb csecsemőt (aki még nem kapott MMR-t!) attenuált morbillivírussal immunizálni. Passzív védőoltásban kell részesíteni a hepatitis-A-vírus okozta májgyulladásos beteggel. Tetanus ellen emlékeztető toxoidos oltásban kell részesíteni azokat, akik fertőzési veszélynek vannak kitéve (pl. földdel szennyezett sérülés esetén); viszont azoknak, akik tetanus alapimmunizálásban nem részesültek (hazánkban ilyenek az 1941 előtt születettek), antitoxint is kell adni (az aktív és passzív oltás “együttes” alkalmazását szimultán oltásnak nevezzük).

Adható a védőoltás a lakosság egyes veszélyeztetett rétegeinek. Így az influenza vakcina az időseknek és egészségügyi dolgozóknak, ezt évente célszerű megújítani. Kullancs-encephalitis elleni aktív oltást adnak erdészeknek, favágóknak, illetve azoknak, akik sokat kirándulnak. Az egészségügyi dolgozók kérhetik a hepatitisz B elleni védőoltást. A hepatitisz elleni oltás minden orvostanhallgatónak a beiratkozáskor kötelező.

Léteznek még a külföldi utakkal kapcsolatos védőoltások is, ilyenek pl. a kolera és a sárgaláz elleni aktív vakcinák, melyekkel a fertőzött területre utazókat oltják útjuk előtt. A Covid járvány megjelenése óta az egyes országokban eltérő, időben is gyakran változó szabályok érvényesek a beutazók oltottságára. Emiatt utazás előtt célszerű erről érdeklődni.

Az oltások során felléphetnek oltási reakciók, szövődmények, balesetek vagy szérumbetegségek is. Az oltási reakció enyhe betegség tüneteket (pl. láz, bőrpír) jelent, amelyek bizonyos aktív vakcináknál természetes velejárói az oltásnak és épp annak eredményességét jelzik. Az oltási szövődmény már kóros folyamat, amit az egyénnek az átlagosnál erősebb reakciókészsége vált ki. Az oltási baleset azt jelenti, hogy az oltóanyag rossz minősége következtében lép fel valamilyen kóros folyamat (pl. az attenuált törzsek reverziója vagy a toxin nem kielégítő inaktiválása); továbbá ide sorolandó az is, ha az orvos hibásan alkalmazza az oltást (pl. téves technika vagy rossz dózis). A szérumbetegség a fajidegen fehérjét tartalmazó passzív oltóanyagoktól jöhet létre: a tünetek az oltás helyén keletkező enyhe duzzanattól az anafilaxiás sokkig sokfélék lehetnek.

1. ábra Vérvétel immunizált lótól .....	1
1. táblázat A vakcinagyártás története .....	2
2. ábra A vakcinák alaptípusai .....	3
3. ábra Az uridin analógok szerkezete .....	6
4. ábra Különböző vakcinák hatékonyságának és biztonságának összehasonlítása .....	7
5. ábra Tetanuszos izomgörcsben elhunyt beteg .....	9
6. ábra Toxin és toxoid .....	10
7. ábra SPF tojások megnyitása vírus aratáshoz .....	11
8. ábra SPF tojások beoltása vírussal .....	11
9. ábra Trivalens influenza vakcina termelése tojásban .....	12
10. ábra Inaktivált vírusvakcina gyártása .....	13
11. ábra Inaktivált vírusvakcina gyártásának blokk-sémája .....	13
2. táblázat Különböző adjuváns anyagok (katalógus részlet) .....	14
12. ábra A hepatitis B vírus felépítése .....	15
13. ábra A HBV genom felépítése .....	16
14. ábra Az élesztőbe bevitt ingázó vektor (kettős plazmid) szerkezete .....	17
15. ábra HBV vakcina felfolgozási lépéssora .....	17
16. ábra A DNS és mRNS vakcinák működésének összehasonlítása .....	18
17. ábra A DNS vakcina (plazmid) jellemző részei .....	19
18. ábra A kétféle mRNS vakcina működésének összehasonlítása .....	21
19. ábra Az érett, transzlációra kész mRNS felépítése .....	21
20. ábra mRNS vakcina lipid nanorészecskébe zárva .....	22
21. ábra A Magyarországon engedélyezett vakcinák működési elve .....	23
22. ábra A Pfizer-BioNtech mRNS vakcina hatásmechanizmusa .....	24

18. VAKCINAGYÁRTÁS .....	1
18.1. A passzív immunizálás oltóanyagai .....	1
18.2. Az oltóanyagok története .....	1
18.3. A vakcinák típusai .....	2
18.3.1 A teljes kórokozót tartalmazó vakcinák .....	4
18.3.1.1 Inaktivált vakcinák .....	4
18.3.1.2 Élő, attenuált vakcinák .....	4
18.3.1.3 Alegység vakcinák .....	5
18.3.1.4 Vírusszerű részecskék (virus-like particle, VLP) .....	5
18.3.1.5 Poliszacharid vakcinák, konjugált vakcinák .....	6
18.3.1.5 Nukleinsav vakcinák .....	6
18.4. Technológiák .....	8
18.4.1. Baktériumok elleni vakcinák előállítási technológiája: .....	8
18.4.2. Toxinok, toxoidok .....	9
18.4.3. Vírusok elleni vakcinák előállítási technológiája .....	10
18.4.3.1 Vakcina gyártás tojásban .....	11
18.4.3.2 Vakcinagyártás sejtenyészetekben .....	12

18.4.3.3 Alegység vakcina gyártás .....	14
18.4.3.4. Esettanulmány: a hepatitis B vírus (HBV) vakcina gyártása.....	15
18.4.3.5 Konjugált vakcinák gyártása.....	18
18.4.3.6 Nukleinsav vakcinák.....	18
18.4.3.7 Nukleinsav vakcinák gyártása.....	21
18.4.3.8 A SARS-Covid-19 vakcinák összehasonlítása .....	23
18.5. Az magyar egészségügy oltási rendszere.....	24

w