

Novinky a změny v imunologických textech (*in vivo, in vitro* zkoušky)

MUDr. Eva Vítková, CSc.

Obsah sdělení:

Metody *in vivo* a *in vitro* – současný stav

- Zkouška cizích agens v humánních virových vakcínách (2.6.16)
- Buněčné substráty pro produkci humánních vakcín (5.2.3)
- Náhrada *in vivo* stanovení kontroly jakosti vakcín *in vitro* metodami (5.2.14)

Současný stav

Metody *in vivo*:

- tradiční techniky používané k hodnocení bezpečnosti, účinnosti a jakosti vakcín
- Modelové zkoušky na zvířatech

Metody *in vitro*:

- Technicky propracované
- Časová úspora
- Finančně zpravidla méně náročné
- Opakovatelnost

Ochrana zvířat v pokusu a vědeckém bádání

 **3R** = Refinement, Reduction, Replacement

 Evropská úmluva o ochraně obratlovců používaných pro pokusné nebo jiné vědecké účely (18. 3. 1986)

 2010/63/EU Směrnice Evropského Parlamentu o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely (22.10.2010/1. 1. 2013)

Zkouška cizích agens v humánních virových vakcínách (2.6.16)


Argumenty pro změny:

- ☉ Současné vědecké poznatky
- ☉ Ph. Eur. – dotazníkové šetření u výrobců vakcín o provádění a výsledcích zkoušky
- ☉ Rebecca Sheets: Systemic evaluation of invitro and in vivo adventitious virus assays for the detection of viral contamination of cell banks and biological products

Vaccine Vol. 32, 2014

Zkouška cizích agens v humánních virových vakcínách (2.6.16)

Nová koncepce textu: Úvod, Metody zkoušení

 Úvod: **posouzení rizika** virové kontaminace v přípravku za použití všech dostupných a vhodných zkoušek, posouzení výrobního procesu, *in vivo* testy na základě zdůvodnění, nové molekulární metody

 Metody zkoušení: tabulka 2.6.16-1


Zkouška cizích agens v humánních virových vakcínách (2.6.16)

tabulka 2.6.16-1

Zkouška	Virové inokulum	Sklizeň viru	Produkce kultivačních substrátů	
			Kontrolní buňky	Kontrolní vejce
bakteriální a houbová kontaminace	+	+	-	-
mykoplazmata	+	+	-	-
spiroplazmata	+	-	-	-
mykobaktérie	+	+	-	-
zkouška na sajících myších	+	-	-	-
ptačí viry	+	+	-	-
zkouška na cizí agens v buněčných kulturách	+	+	+	+
hmyzí viry	+	+	-	-
zkouška na kontrolních buňkách (mikroskopické posouzení)	-	-	+	-
hemadsorbující viry	-	-	+	-
zkouška na kontrolních vejcích (hemaglutinační agens)	-	-	-	+
viry ptačích leukoóz	-	-	+	+
zkouška na specifické viry zkouškou NAT	+	+	-	-
Zkouška na viry za použití molekulárních metod se širokou detekční kapacitou	+	+	-	-

Buněčné substráty pro produkci humánních vakcín (5.2.3)

Sjednocení požadavků na zkoušení s textem 2.6.16

 **posouzení rizika** virové kontaminace v přípravku za použití všech dostupných a vhodných zkoušek, posouzení výrobního procesu, *in vivo* testy na základě zdůvodnění, nové molekulární metody

 Tabulka 5.2.3-1

Buněčné substráty pro produkci humánních vakcín

(5.2.3)

Tabulka 5.2.3-1

Nové:

Zkouška	Buněčné inokulum	Banka základních buněk (MBC)	Banka pracovních buněk (WBC)	Buňky použité pro produkci ve stadiu maximálního zdvojení populace nebo za ním (EOPC/ECP)
zkouška na cizí agens v buněčných kulturách (s intaktními buňkami nebo ekvivalentně s buněčným lyzátem)	-	+	+	+
zkoušky na sajících myších a vejcích	-	-	+	+
zkouška na specifické viry metodou NAT	-	+	+	+
zkouška na viry molekulárními metodami se širokou detekční kapacitou	+	+	+	+
retroviry	-	+	-	+

Náhrada *in vivo* stanovení kontroly jakosti vakcín *in vitro* metodami (5.2.14)

- 👁 Úvod – Cíl: usnadnit zavedení *in vitro* metod (přednostně) v kontrole humánních a veterinárních vakcín
- 👁 Souvislosti – kontrola shodnosti produkce metodami *in vivo* a *in vitro* není shodná

Náhrada *in vivo* stanovení kontroly jakosti vakcín *in vitro* metodami (5.2.14)

- 👁 In vivo – vysoce variabilní výsledky (např. NIH test), nejsou validovány, retrospektivní validace není možná
- 👁 In vitro – přesné, reprodukovatelné, vysoká citlivost, validované....

Náhrada *in vivo* stanovení kontroly jakosti vakcín *in vitro* metodami (5.2.14)

Alternativní přístupy k nahrazení *in vivo* metod

- ☉ Musí být vědecky relevantní
- ☉ Náhrada jedné zkoušky *in vivo* jednou nebo více zkouškami *in vitro*
- ☉ Nové produkty – *in vitro* během vývoje

Náhrada *in vivo* stanovení kontroly jakosti vakcín *in vitro* metodami (5.2.14) metody *in vitro*

ZKOUŠKY ÚČINNOSTI

- 👁 Vědecky doložené
- 👁 Umožní kontrolu obsahu a funkčnosti antigenu/ů
- 👁 Citlivost a specifita, schopnost detekovat malé rozdíly v účinnosti jednotlivých šarží, doložit výsledky u šarží s předpokládanou nižší účinností

Náhrada *in vivo* stanovení kontroly jakosti vakcín *in vitro* metodami (5.2.14)

ZKOUŠKY BEZPEČNOSTI

- ☉ **Specifická toxicita** nejméně tak citlivá jako *in vivo*
 - *in vitro* buněčné systémy,
 - imunologické nebo
 - biochemické zkoušky
- ☉ **Molekulární konzistence hlubokým sekvenováním** oproti zkoušce virulence: atenuované vakcíny
- ☉ **Detekce cizích virových agens novými molekulárními metodami:** detekce genomu/nutnost porovnání s *in vivo*

Děkuji za pozornost

