

بسمه تعالی



## گزارش پیشرفت طرح (۱)

طراحی، دستورزی و تولید ویروس‌های انکولایتیک با قابلیت تکثیر  
اختصاصی و هدفمند در سلول‌های سرطانی به منظور ویروس درمانی و ژن  
درمانی سرطان‌های صعب‌العلاج

مسئول اجرای طرح:

دکتر رامین صرامی فروشانی

واحد سازمانی مجری: پژوهشکده سرطان معتمد

گروه پژوهشی: توسعه فناوری درمان‌های پیشرفته در سرطان

ماه و سال اختتام طرح:

۱۴۰۳

مشخصات مسئول و همکاران طرح مطابق پرسشنامه مصوب:

| نام و نام خانوادگی          | مسئولیت در طرح | تخصص          | وابستگی سازمانی                        | جمع کل نفر<br>ساعت همکاری<br>در طرح |
|-----------------------------|----------------|---------------|----------------------------------------|-------------------------------------|
| دکتر رامین صرامی<br>فروشانی | مجری طرح       | فوق دکترا     | رئیس پژوهشکده سرطان معتمد              | 44                                  |
| مریم کدخدازاده<br>برزکی     | همکار طرح      | دکتری تخصصی   | عضو هیئت علمی پژوهشکده<br>سرطان معتمد  | 30                                  |
| دکتر مریم فاضلی             | همکار طرح      | دکتری تخصصی   | عضو هیئت علمی پژوهشکده<br>سرطان معتمد  | 14                                  |
| دکتر زهرا السادات<br>هاشمی  | همکار طرح      | دکتری تخصصی   | عضو هیئت علمی پژوهشکده<br>سرطان معتمد  | 14                                  |
| دکتر مهدی مهدوی             | همکار طرح      | دکتری تخصصی   | عضو هیئت علمی پژوهشکده<br>سرطان معتمد  | 14                                  |
| دکتر سمیه صادقی             | همکار طرح      | دکتری تخصصی   | عضو هیئت علمی پژوهشکده<br>سرطان معتمد  | 14                                  |
| مهدیه شکراللهی              | همکار طرح      | کارشناسی ارشد | کارشناس پژوهشی پژوهشکده<br>سرطان معتمد | 14                                  |
| فاطمه سلیمیان               | همکار طرح      | کارشناسی ارشد | کارشناس پژوهشی پژوهشکده<br>سرطان معتمد | 14                                  |
| حسن صنعتی                   | همکار طرح      | کارشناسی ارشد | کارشناس پژوهشی پژوهشکده<br>سرطان معتمد | 14                                  |
| زینب ظریف منش               | همکار طرح      | کارشناسی ارشد | کارشناس پژوهشی پژوهشکده<br>سرطان معتمد | 30                                  |

علیرغم پیشرفت های چشمگیر در پیشگیری، تشخیص و درمان سرطان، همچنان سرطان از مهم ترین عوامل مرگ و میر انسان به شمار می رود. کند بودن روند درمان سرطان از یک سو و ناکارآمدی روشهای درمانی رایج و عوارض جانبی مضر این درمان ها از سوی دیگر، لزوم یافتن درمان های فناورانه نوین، هدفمند، کارآمد و با عوارض جانبی کمتر را دو چندان می کند. این رویکردهای درمانی نوین شامل سلول درمانی، ویروس درمانی و ژن درمانی می باشند که در حوزه محصولات درمانهای پیشرفته (ATMP) طبقه بندی می شوند. در ویروس درمانی سرطان از ویروس هایی استفاده می شود که توانایی از بین بردن سلول های سرطانی و تحریک سیستم ایمنی علیه تومور را دارند. در پروژه پیش رو از دو روش ویروس درمانی استفاده می شود؛ ویروس های طبیعی (ویروس نیوکاسل) و ویروس های نو ترکیب (آدنوویروس) که با روش مهندسی ژنتیک ساخته شده اند. ویروس نیوکاسل یک RNA ویروس تک رشته ای است که میزبان طبیعی آن پرندگان می باشد. سرعت رشد این ویروس در سلول های سرطانی پستانداران ۱۰ هزار برابر سلول های طبیعی است. آدنوویروس تیپ ۵ مهندسی ژنتیک شده با عنوان تجاری انکورین نیز در حال حاضر در کشور چین دارای مجوز درمان برای سرطان ریه و سر و گردن دارد. مکانیسم عمل این ویروس ها به نحوی است که اختصاصاً سلول های سرطانی را آلوده کرده و از بین می برد و آلودگی سلول های طبیعی در آن ها کم است. هدف از این پروژه، طراحی، دستورزی و تولید ویروس های انکولایتیک با قابلیت تکثیر اختصاصی و هدفمند در سلول های سرطانی به منظور ویروس درمانی و ژن درمانی سرطان های صعب العلاج می باشد. این مطالعه اولین تجربه بالینی ویروس درمانی در ایران است و در صورت موفقیت گام مهمی جهت خودکفایی و جلوگیری از خروج ارز به منظور درمان برداشته خواهد شد.

### در این پروژه، برای تولید ویروس انکورین، ابتدا، نقشه ی ژنتیکی ویروس مهندسی شده انکورین

مورد ارزیابی قرار خواهد گرفت؛ بر این اساس طراحی وکتور و مهندسی سازه مشابه با انکورین با استفاده از وکتور آدنوویروسی غیر تکثیر شونده انجام می شود. سپس براساس سازه ی تولید شده، ویروس نو ترکیب با قابلیت

تکثیر اختصاصی و هدفمند در سلول های سرطانی تولید خواهد شد و ویروس از نظر سلامتی و کارایی در مدل های حیوانی استاندارد بررسی خواهد شد.

یکی دیگر از ویروس های انکولایتیک مورد استفاده در این پروژه ویروس نیوکاسل بوده که دارای قابلیت تکثیر اختصاصی در سلول های سرطانی می باشد. ، جهت تولید ویروس نیوکاسل با کیفیت GMP، آزمون- های آزمایشگاهی و پیش بالینی مربوط به تولید، فرآوری، تخلیص و فرمولاسیون ویروس نیوکاسل کشنده سرطان انجام خواهد شد. همانند ویروس انکورین، ویروس نیوکاسل از نظر سلامتی و کارایی در مدل های حیوانی استاندارد بررسی خواهد شد.

در نهایت، ویروس های انکورین و نیوکاسل در مقیاس نیمه صنعتی تحت پروتکل GMP تولید و فاز صفر و یک کارآزمایی بالینی پس از طی مراحل مذکور و دریافت کد اخلاق انجام خواهد شد.

**کلیدواژه ها:** ویروس درمانی، آدنوویروس، ویروس نیوکاسل، انکولایتیک ویروس ها

|         |                                                                  |
|---------|------------------------------------------------------------------|
| ۳.....  | فصل اول: کلیات پژوهش.....                                        |
| ۴.....  | مقدمه و بیان مسئله.....                                          |
| ۷.....  | تعاریف مفاهیم.....                                               |
| ۱۲..... | فصل دوم: مبانی نظری و پیشینه پژوهش.....                          |
| ۱۸..... | فصل سوم: اهداف.....                                              |
| ۲۰..... | فصل چهارم: روش پژوهش.....                                        |
| ۲۱..... | نوع مطالعه.....                                                  |
| ۲۱..... | جمعیت (واحد) مطالعه.....                                         |
| ۲۱..... | مکان و زمان مطالعه.....                                          |
| ۲۱..... | حجم نمونه.....                                                   |
| ۲۲..... | روش نمونه‌گیری.....                                              |
| ۲۲..... | روش اجرا.....                                                    |
| ۴۱..... | روش تجزیه و تحلیل.....                                           |
| ۴۱..... | ملاحظات اخلاقی طبق راهنماهای عمومی و اختصاصی اخلاق در پژوهش..... |
| ۴۳..... | فصل پنجم: یافته‌های پژوهش.....                                   |
| ۶۳..... | فصل ششم: بحث و نتیجه‌گیری.....                                   |
| ۶۴..... | مروری بر یافته‌های پژوهش.....                                    |
| ۶۴..... | بحث.....                                                         |
| ۶۹..... | محدودیت‌ها.....                                                  |
| ۶۹..... | پیشنهادها.....                                                   |
| ۷۰..... | نتیجه‌گیری.....                                                  |
| ۷۱..... | منابع.....                                                       |



## **۱-۱. مقدمه و بیان مساله**

سرطان از دلایل اصلی مرگ و میر در سراسر جهان است و انتظار می‌رود طی دو دهه آینده بیش از ۷۰٪ رشد داشته باشد. درمان‌های رایج سرطان شامل جراحی و برداشت تومور و به دنبال آن پرتودرمانی یا شیمی درمانی برای تخریب و حذف سلول‌های باقی مانده توموری فاقد اختصاصیت، مداومت و اثربخشی کافی هستند (۱)؛ اما در مورد سرطان‌های بسیار متاستاتیک با پیش آگهی ضعیف درمان جراحی صورت نگرفته و

تنها از طریق دوزهای بالای داروهای شیمیایی که فاقد اختصاصیت کافی برای سلول‌های توموری هستند تلاش می‌شود تا از پیشرفت سرطان جلوگیری شود؛ درحالی که معضل اصلی این درمان، اثرات جانبی داروهای شیمی درمانی است چراکه تمام انواع سلول‌های در حال تقسیم و عملکرد آنها را تحت تاثیر قرار می‌دهد؛ از طرفی در خیلی از سرطان‌ها، سلول‌های توموری نسبت به داروهای شیمی درمانی مقاومت نشان می‌دهند (۲).

برای غلبه بر مشکلات حاصل از درمان‌های رایج سرطان، از راهکارهایی مثل ژن درمانی، درمان‌های بیولوژیک و ایمونولوژیک (ایمونوتراپی) و ویروس درمانی استفاده می‌شود که در پی موفقیت در ایمونوتراپی مدرن، ویروس‌های انکولیتیک یا ویروس‌های لیزکننده سرطان در حال حاضر به عنوان یک گزینه درمانی بالقوه برای بیماران مبتلا به سرطان که پاسخ ایمنی در برابر تومور ایجاد نمی‌کنند یا در رسیدن به پاسخ‌های بادوام پس از درمان با مهارکننده‌های رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی ناتوان هستند مطرح می‌باشند (۳).

اصطلاح "ویروس‌های لیزکننده سرطان" برای ویروس‌هایی به کار می‌رود که قادرند به طور ویژه در درون سلول‌های سرطانی تکثیر و آنها را تخریب کنند و از سوی دیگر اثر ناچیزی بر سلول‌های طبیعی داشته باشند که این توانایی می‌تواند به طور وراثتی با ویروس‌ها همراه باشد و یا به واسطه مهندسی ژنتیک در آنها ایجاد شود. استفاده از ویروس‌ها جهت درمان سرطان به قبل از دهه ۱۹۵۰ بر می‌گردد و تا به امروز گستره‌ای از ویروس‌ها در انسان و حیوانات مختلف شناخته شده‌اند که کارایی ضد توموری آنها و اختصاصیتشان به سرطان و همچنین ایمن بودن آنها مورد آزمایش قرار گرفته است. از این ویروس‌ها می‌توان به آدنوویروس‌ها، ویروس هرپس سیمپلکس، سرخک، رئو ویروس، لنتی ویروس، پاروویروس، ویروس استوماتیت وزیکولار، ویروس اوریون، ویروس بیماری آبله، ویروس واکسینیا، پارامیکسو ویروس‌ها اشاره کرد (۱).

از این ویروس‌ها هم به شکل دست نخورده و هم با دستکاری‌های ژنتیکی جهت درمان سرطان استفاده می‌شود. ویروس‌های انکولیتیک نسبت به داروهای شیمی درمانی متداول دارای مزایای زیادی می‌باشند از جمله داشتن سینرژی با اکثر روش‌های درمانی، توانایی کشتن سلول‌های بنیادی سرطانی<sup>۱</sup>، فارماکوکنتیک

---

<sup>۱</sup> Cancer stem cells

منحصر به فرد و ایجاد تغییرات دلخواه در آنها بر اساس نتایج مطالعات دیگر (۴). از طرفی، انکولیتیک ویروس‌ها یک بستر درمانی چند جانبه را برای سرطان ارائه می‌دهند، چراکه ترجیحاً در سلول‌های تومور تکثیر می‌شوند و آنها را لیز می‌کنند، می‌توانند برای بیان ترانسژن‌هایی با خاصیت سایتوتوکسیک و تحریک‌کننده سیستم ایمنی مهندسی شوند و همچنین محیط ناحیه تومور را برای ریشه‌کنی سلول‌های سرطانی با استفاده از سلول-های سیستم ایمنی بهینه کنند (۵).

بدین ترتیب، مهم‌ترین مزیت استفاده از ویروس‌ها در درمان سرطان، قابلیت جمع کردن استراتژی‌های مختلف درمانی در یکجا و حمله به تومورها در سطوح مختلف است که باعث می‌شود ویروس درمانی مانند یک درمان ترکیبی عمل کند. بر همین اساس در سال‌های اخیر استفاده از ویروس‌ها برای درمان سرطان بسیار مورد توجه قرار گرفته است.

با وجود بیش از دو دهه تلاش در حوزه ویروس درمانی سرطان در حال حاضر صرفاً دو داروی ویروسی موفق به دریافت تاییدیه مصرف درمانی در بیمار مبتلا به سرطان از سمت سازمان‌های نظارتی بهداشتی کشورهای جهان شده‌اند که عبارتند از محصول ویروسی از خانواده آدنوویروس با نام H101 که در سال ۲۰۰۵ از سازمان غذا و داروی چین برای درمان ترکیبی همراه با شیمی درمانی برای بیماران مبتلا به سرطان سر و گردن موفق به دریافت تاییدیه مصرف شد و دیگری محصول ویروسی از جنس هرپس ویروس مهندسی شده با نام T-VEC است که در سال ۲۰۱۵ مجوز مصرف بالینی را از سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) برای درمان ملانوما دریافت کرد.

انکورین با طراحی و مهندسی ژنتیک، یک وکتور آدنوویروسی که برخی از ژن‌های پاتوژن آن حذف و قابلیت تکثیر آن حفظ گردیده ساخته شده است. علی‌رغم وجود مطالعات گسترده و مهم مبنی بر بی‌خطر بودن تزریق ویروس‌های انکولیتیک در بیماران مبتلا به انواع سرطان، و با توجه به زیرساخت‌ها و پتانسیل‌های فنی و علمی کشور، در این زمینه هنوز به جایگاه شایسته جمهوری اسلامی ایران نرسیده ایم و کمبود این دانش نوین در کشور احساس می‌شود.

ویروس نیوکاسل به دلیل خواص منحصر به فردی که دارد به عنوان یکی از گزینه‌های مناسب برای ویروس‌درمانی مطرح است. سرعت رشد این سلول در سلول‌های سرطانی پستانداران ۱۰ هزار برابر سلول‌های طبیعی است. بنابراین اختصاصاً سلول‌های سرطانی را آلوده کرده و از بین می‌برد. سابقه استفاده بالینی از این ویروس به حدود ۵۰ سال قبل برمی‌گردد و مطالعات و کارآزمایی‌های بالینی مختلفی بر روی اثربخشی این ویروس در درمان انواع مختلف سرطان انجام شده است. تا کنون، سویه‌های مختلف این ویروس من جمله ۷۳- T، MTH68 و PV701MK107 مورد مطالعات بالینی متعددی قرار گرفته‌اند اما تا کنون کارآزمایی بالینی بر روی سویه لاسوتا انجام نشده است. ویروس نیوکاسل سویه لاسوتا به عنوان یک سویه لنتوژنیک، نسبت به سایر سویه‌ها بیماری‌زایی کمتری دارد و به همین دلیل تزریق آن ایمن‌تر به نظر می‌رسد.

پژوهشکده سرطان معتمد برای اولین بار پروژه ویروس درمانی در سطح کارآزمایی بالینی در بیماران مبتلا به سرطان را در کشور آغاز نموده است و تلاش دارد این خلا را در کشور پر نماید. پروژه حاضر دارای مراحل طراحی، ساخت و تولید انبوه ویروس‌های نو ترکیب و طبیعی با درجه کیفی GMP برای استفاده در درمان سرطان است که در فازهای سه گانه اجرا خواهد شد. فاز نخست که برای اجرای فاز کارآزمایی بالینی بسیار ضروری است شامل توسعه زیرساخت‌ها و ایجاد فضای کاربردی تحقیقاتی و تولیدی است که با کسب استانداردهای روز کیفیت محصولات نهایی را از نظر مقیاس تولید و کارآمدی تضمین می‌کند. انجام این طرح تحقیقاتی، می‌تواند زمینه را برای استفاده از این روش نوین درمانی در میهن عزیزمان فراهم کند.

## ۱-۲. تعریف مفاهیم

### ۱-۲-۱. آدنوویروس‌های انکولیتیک

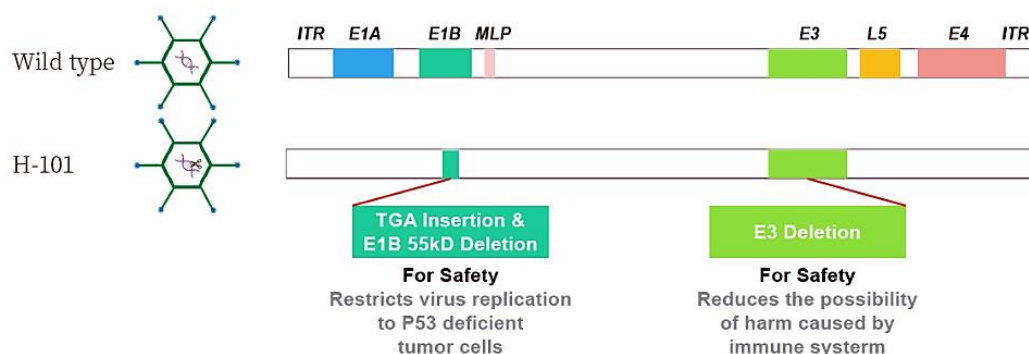
از آنجایی که آدنوویروس‌ها قادر به هدف قرار دادن انتخابی سلول‌های توموری نیستند، اصلاحات مختلفی در سطح ژنوم برای این منظور مورد نیاز است. تا کنون برای ایجاد آدنوویروس‌های انکولیتیک (تکثیر

اختصاصی در تومور) دو اصلاح اصلی در ژنوم Ads اعمال شده است. اولین روش حذف توالی کوتاه از ژن های اصلی ویروس است که برای تکثیر در سلول های نرمال لازم هستند. این تغییرات باعث تکثیر انحصاری آدنووایروس در سلول های سرطانی و عدم توانایی تکثیر آنها در سلول نرمال می شود (۶). از این رویکرد برای اولین بار در سال ۱۹۹۶ برای تولید ویروس انکولیتیک (ONYX-15 (dl1520 استفاده شد. این ویروس فاقد ژن عملکردی E1B-55 kD است و صرفاً در سلول های جهش یافته در ژن p53 قدرت تکثیر دارد. علاوه بر این، حذف اضافی در ناحیه E3، ONYX-15 را در برابر پاسخ های ایمنی ضد ویروسی حساس می کند.

همچنین حذف بخش دیگری از ژن E1B، E1B-19 kD، منجر به تولید دسته دیگری از آدنووایروس های انکولیتیک می شود. از آنجایی که پروتئین E1B-19 kD از آپوپتوز با واسطه FAS جلوگیری می کند و اکثر سلول های سرطانی مسیر آپوپتوز را مسدود کرده اند، ویروس های فاقد E1B-19K صرفاً می توانند در سلول سرطانی تکثیر شوند درحالی که توانایی تکثیر در سلول نرمال را ندارد (۷). روش دیگر در دستیابی به آدنووایروس های انکولیتیک حذف ۲۴ نوکلئوتید از ناحیه E1A می باشد، همانطور که اشاره شد پروتئین E1A برای مهار پروتئین Rb و تکثیر در سلول نرمال ضروری است، بنابراین آدنووایروس delta-24 که در آن اینترکشن E1A و Rb مختل شده است صرفاً می تواند در سلول های سرطانی که مسیر Rb دچار اختلال است تکثیر شود. در بیشتر سلول های سرطانی به دلیل معیوب بودن مسیر Rb/p16 توانایی اتصال به Rb برای E1A غیر ضروری است (۸).

دومین روش برای تولید آدنووایروس انکولیتیک، قرار دادن پروموتورهای خاص بافت یا تومور برای کنترل تکثیر ویروسی است. برای اولین بار در سال ۱۹۹۷ با استفاده از این روش و قرار دادن پروموتور آنتی ژن اختصاصی پروستات (PSA) برای ژن E1A، آدنووایروس انکولیتیک تولید شد. در ادامه از سایر پروموتورهای خاص بافت توموری مانند تیروزیناز برای ملانوما، آلفا-فیتوپروتئین برای سرطان کبد و آنتی ژن (CEA) برای سرطان کولورکتال جهت تولید آدنووایروس انکولیتیک استفاده شد (۹).

۱-۲-۲. H101 (Oncorine)



شکل ۱-۱ تفاوت نقشه ژنتیکی ویروس انکولیتیک انکورین در مقایسه با آدنوویروس وحشی

محصول این طرح یک آدنوویروس با قابلیت تکثیر انتخابی در سلول های سرطانی با نقص p53 است که به لحاظ ساختار ژنتیکی، ایمنی و کارایی مشابه نمونه خارجی آن (انکورین) است. انکورین اولین ویروس انکولیتیک در دنیا است که تاییدیه سازمان غذا و دارو (CFDA) را برای ویروس درمانی بیماران مبتلا به سرطان ( اختصاصا سرطان سر و گردن و کارسینومای مری) را دریافت کرده است. این سویه انکولیتیک با حذف ژن E1B-55kD (۸۲۷ نوکلئوتید) و به دنبال آن عدم بیان ژن E1B-55kD تولید شده است (۱۰). برای اولین بار در سال ۱۹۹۸، در مطالعه‌ای منتشر شده در Science، نشان داده شد که آدنوویروس فاقد ژن E1B-55kD می‌تواند به طور ترجیحی در سلول‌های جهش یافته p53 تکثیر کند و آنها را از بین ببرد و از آنجایی که نقص p53 یک ویژگی رایج در بین سلول‌های سرطانی است، بنابراین انکورین به عنوان یک ویروس انکولیتیک می‌تواند به صورت انتخابی بسیاری از سلول‌های سرطانی با نقص p53 را از بین ببرد (۱۱). البته در مطالعات بعدی نشان داده شد که این ویروس در سلول‌های سرطانی حاوی P53 طبیعی هم قابلیت تکثیر دارد اما در سلول نرمال قدرت تکثیر ندارد. بنابراین به احتمال زیاد سلول‌های توموری دارای نقایص دیگری به غیر از p53 می‌باشند که انکورین را قادر می‌سازد تا بدون مانع در بسیاری از سلول‌های توموری تکثیر شود (۱۲).

اما برخلاف ONYX-015 که ژن‌های ADP۶,۷ و gp متعلق به ناحیه E3 را بیان می‌کند، Oncorine به گونه ای طراحی شده است که ژن ADP در ژنوم ویروس حذف شده است که منجر به ایمنی و کارایی بیشتر

آن در شرایط درون تنی در مقایسه با ONYX-015 شده است (شکل ۱-۱) (۱۳). داروی انکورین برای سرطان ناحیه سر و گردن به صورت ترکیب با داروهای شیمی درمانی ۵ فلوریوراسیل مجوز دریافت کرده است که با دوز  $5 \times 10^{-11}$  vp/day در پنج روز متوالی به بیماران سرطانی تزریق می‌شود. دوره های تزریق وابسته به شرایط بیمار متفاوت است.

### ۱-۲-۳. ویروس نیوکاسل

ویروس‌های غیردست‌ورزی شده چون میزبان اصلی آن‌ها به طور معمول انسان نیست کاندید مناسبی برای این روش درمانی هستند ولی ممکن است سریع‌تر از بدن حذف شوند و یا کارآمدی کافی را نداشته باشند که باید مورد مطالعه قرار گیرند. یکی از ویروس‌های غیردست‌ورزی شده در طبیعت ویروس نیوکاسل است. این ویروس در پرندگان بیماری‌زا بوده و با تلفات بالا، آسیب‌های اقتصادی کلانی را به این صنعت وارد می‌کند. اگرچه ویروس نیوکاسل برای پرندگان بیماری‌زا است اما به دلیل آنکه انسان میزبان طبیعی ویروس بحساب نمی‌آید خطر خاصی برای انسان حتی در صورت آلوده شدن یک فرد با تیپ وحشی ویروس بوجود نمی‌آید. در شرایط طبیعی عفونت انسانی با سویه‌های شدت بیماری‌زا منجر به علائم تحت بالینی اندکی نظیر تب خفیف و سرفه و بیماری شبیه سرماخوردگی می‌گردد. همانگونه که اشاره شد، مطالعات گسترده‌ای بر روی امکان بیماری‌زایی ویروس نیوکاسل برای پستانداران انجام گرفته است و تغییر در نوع تجویز ویروس می‌تواند روی پاتوژنیسیته، ایمنی‌زایی و موثر بودن آن تعیین‌کننده باشد (۱۴).

ویروس نیوکاسل به دلیل خواص منحصر به فردی که دارد به عنوان یکی از گزینه‌های مناسب برای ویروس‌درمانی مطرح است. سابقه استفاده بالینی از این ویروس به حدود ۵۰ سال قبل برمی‌گردد و مطالعات و کارآزمایی‌های بالینی مختلفی بر روی اثربخشی این ویروس در درمان انواع مختلف سرطان انجام شده است (۱۵). در سال ۲۰۱۹ ارزش مالی سرمایه‌گذاری بر روی ویروس درمانی سرطان در آمریکا تقریباً ۶۸,۹ میلیون دلار برآورد شده است (۱۶).

تا کنون، سویه‌های مختلف این ویروس من جمله T-73، MTH68 و PV701MK107 و در مواردی سویه لاسوتا مورد مطالعات آزمایشگاهی و بالینی متعددی قرار گرفته‌اند (۱۷)، اما تا کنون مطالعات کمی از کارآزمایی بالینی بر روی سویه لاسوتا<sup>۱</sup> (LS) منتشر شده است هرچند، تزریق آن ایمن‌تر به نظر می‌رسد. سویه ی لاسوتا یکی از سویه‌های کم حدت ویروس نیوکاسل است که دارای خاصیت انکولیتیک منحصر به فردی است، سویه لنتوزنیک است که ویروس لاسوتا از مهم‌ترین گونه‌های این سویه است. این سویه به عنوان سویه‌ی تخفیف حدت یافته و غیر ویرولانته برای تهیه واکسن طیور مورد استفاده قرار می‌گیرد. تهیه سویه مونووالان امروزه بسیار دشوار است چون در اغلب موارد واکسن‌های تجاری موجود در بازار به صورت پلی والان تهیه می‌شوند که استفاده از آن با کاربرد انکولیتیک امکان پذیر نیست از طرفی این واکسن‌ها غلظت ویروس کمتری دارند و برای کاربردهای درمانی مناسب نیستند. یکی از مزایای استفاده از این ویروس عدم نیاز به دستکاری ژنتیکی است.

سویه ی لاسوتای مورد استفاده در این طرح، به دلیل اینکه بیماری زایی چندانی در انسان ندارد و علائم بعد از دریافت ویروس به واکنش‌های آلرژیک متعادل ختم می‌شود، می‌تواند به عنوان یک کاندید مناسب در درمان سرطان‌ها به شمار رود. نحوه تجویز ویروس در میزان پاسخ بسیار موثر است برای مثال مسیر درون رگی و درون جمجمه‌ای در خرگوش، در خوکچه هندی با روش درون جمجمه‌ای و درون پریتنانی، نوزاد موش یک روزه با روش درون جمجمه‌ای و زیر جلدی، موش بالغ با روش درون جمجمه‌ای و درون پریتنانی، همستر با روش درون جمجمه‌ای متفاوت است گرچه تجویز سویه‌های ولوزنیک برای پرندگان می‌تواند بسیار خطر ایجاد کند ولی مطالعات انجام شده توسط محققینی چون Baron و Buckler بر روی سویه‌های velogenic که در پرندگان شدت بیماری‌زا هستند نشان داد که حتی تجویز مقادیر بسیار بالا بصورت درون رگی در موش علایم بیماری زایی قابل گزارشی در این مدل‌ها ایجاد نکرده است (۱۸). در مطالعه دیگری نتایج نشان دادند که از با تجویز درون رگی حداقل  $10^9 \times 3$  واحد عفونی<sup>۲</sup> (IU) در بیمار مبتلا به لوسمی و حداقل  $10^{12} \times 4$  IU

<sup>۱</sup> LaSota

<sup>۲</sup> infectious units

از مسیرتزریق درون توموری در سرطان های توپر برای انسان قابل تحمل است (۱۹). همچنین مطالعاتی که روی بیماران یا حتی مواردی نظیر کارکنان مراکز دامپزشکی یا آزمایشگاهی و کشاورزان که با سویه های وحشی و نه تخفیف حدت یافته واکسن در تماس بوده اند، بیماری بسیار خفیف را گزارش نمودند برآیند این مطالعات که نشان دهنده بی خطر بودن ویروس نیوکاسل برای انسان است (۲۰).

## فصل دوم:

# مبانی نظری و پیشینه تحقیق

## ۲-۱. کارآزمایی‌های بالینی انجام شده با استفاده از ویروس انکورین

در اولین کارآزمایی بالینی فاز ۳ با استفاده از ویروس انکورین که به صورت چند مرکزی، تصادفی و کنترل‌شده انجام شد در مجموع ۱۲۳ بیمار مبتلا به سرطان SCCHN به دو گروه کنترل (شیمی درمانی به تنهایی) و گروه درمان (انکورین همراه با شیمی درمانی) تقسیم شدند و مورد ارزیابی قرار گرفتند. یک دوره درمان شامل تزریق داخل توموری انکورین به مدت ۲۱ روز، با دوز  $5 \times 10^{11}$  vp/day و در فواصل زمانی ۵ روز متوالی بود. از ۱۲۳ بیمار در مجموع ۱۰۵ بیمار مبتلا به SCCHN (۵۲ بیمار در گروه درمان، ۵۳ بیمار در گروه کنترل) کارآزمایی را تکمیل کردند و با موفقیت مورد ارزیابی قرار گرفتند. پاسخ کامل (CR) در ۶ و ۲ بیمار و پاسخ پارشیال (PR) در ۳۵ و ۱۹ بیمار به ترتیب در گروه درمان و گروه کنترل به دست آمد. تجزیه و تحلیل آماری نشان دهنده نرخ پاسخ بسیار بالاتر بیماران تحت درمان با شیمی درمانی و انکورین (۷۸٫۸٪) در مقایسه با بیمارانی بود که صرفاً تحت درمان با شیمی درمانی (۳۹٫۶٪) قرار داشتند. ( $P < 0.001$ ) (۲۱). از آنجایی که کارسینوم نازوفارنکس (NPC) عامل اصلی سرطان سر و گردن را در چین محسوب می‌شود، در کارآزمایی دیگری اثر ضد توموری انکورین همراه با شیمی درمانی در بیماران NPC ارزیابی شد. میزان پاسخ بیماران NPC (شامل بیماران naive و مقاوم به شیمی درمانی) تحت درمان با شیمی درمانی و انکورین ۷۵٫۶ درصد گزارش

شد بود که به صورت معناداری بیشتر از نرخ پاسخ (۵۷,۱ درصد) در بیمارانی بود که تحت درمان با شیمی‌درمانی صرف بودند (۰,۰۸۱٪). نتایج این دو کارآزمایی سبب شد تا استفاده ترکیبی از انکورین و داروی شیمی‌درمانی ۵ فلوروئوراسیل برای درمان بیماران SCCHN و NPC تاییدیه سازمان غذا و داروی چین را دریافت کند (۲۲). به دنبال کسب نتایج موفقیت آمیز استفاده از وپروس انکورین در ترکیب با شیمی‌درمانی برای درمان بیماران مبتلا به سرطان ناحیه سر و گردن در چین، از این وپروس برای مطالعات بالینی و تحقیقاتی دیگری استفاده شد که از جمله آنها می‌توان به موارد زیر اشاره کرد.

در کارآزمایی مربوط به ارزیابی کارایی انکورین برای کارسینوم کبدی (HCC)، بیماران مبتلا به HCC که امکان جراحی و برداشت غده توموری آنها وجود نداشت، بیماران به دو گروه تقسیم شدند گروه درمان انکورین با TACE (۸۷ نفر) و گروه کنترل TACE به تنهایی (۸۸ نفر). ویژگی‌های کلینیکی پاتولوژی هر دو گروه مشابه بود اما تفاوت معنی‌داری در میزان پاسخ بین دو گروه مشاهده شد ( $P=0/01$ ). در گروه انکورین، ۲۵ بیمار (۲۸٪) پاسخ کامل (CR)، ۲۸ بیمار (۳۲٪) پاسخ پارشیال (PR)، ۲۳ بیمار (۲۶٪) حالت پایدار بیماری را نشان دادند و تنها در ۱۱ بیمار (۱۲٪) پیشرفت سرطان مشاهده شد. در حالی که در گروه کنترل ۱۳ بیمار (۱۴/۸٪) پاسخ کامل (CR)، ۱۹ بیمار (۲۱/۶٪) پاسخ پارشیال (PR)، ۳۴ بیمار (۳۸/۶٪) حالت پایدار بیماری را نشان دادند و در ۲۲ بیمار پیشرفت بیماری مشاهده شد (۲۳).

در کارآزمایی بالینی دیگری که بروی بیماران مبتلا به سرطان pleural effusion انجام شده است، استفاده از انکورین همراه با شیمی‌درمانی (cisplatin) در مقایسه با شیمی‌درمانی به تنهایی نتایج بسیار امیدوارکننده‌ای به همراه داشته است. در یکی از این مطالعات ۵۲ بیمار مبتلا به سرطان pleural effusion به دو گروه درمان (انکورین ۲۶ نفر) و گروه کنترل (سیس پلاتین ۲۶ نفر) تقسیم بندی شدند. بیماران وپروس انکورین را با دوز  $2 \times 10^{12}$  vp و داروی سیس پلاتین را (۵۰ میلی گرم) از طریق تزریق به داخل قفسه سینه دریافت می‌کردند. در گروه انکورین، ۱۰ بیمار پاسخ کامل (CR)، ۸ بیمار پاسخ پارشیال (PR)، ۳ بیمار حالت پایدار بیماری را نشان دادند، به طوری که میزان پاسخ کلی (CR+PR) ۶۹/۲۳٪ درصد بوده است. در حالی که

در گروه شیمی درمانی ۸ بیمار پاسخ کامل (CR)، ۶ بیمار پاسخ پارشیال (PR) و ۵ بیمار حالت پایدار بیماری را نشان دادند که میزان پاسخ کلی معادل ۵۳/۸۴٪ می باشد (۲۱).

## ۲-۲. موارد کاربرد ویروس انکولیتیک انکورین و آینده کاربرد آن

جدول ۱-۲ آزمایشات بالینی در حال انجام با استفاده از ویروس انکورین (H101)

| Trial identifier | Phase | Conditions                       | Virus name      | Additional treatment |
|------------------|-------|----------------------------------|-----------------|----------------------|
| NCT05051696      | N/A   | Genital Neoplasms, Female        | Oncorine (H101) | +/- radiotherapy     |
| NCT04771676      | 2     | Refractory Malignant Ascites     | Oncorine (H101) | None                 |
| NCT05234905      | 2     | Uterine Cervical Neoplasms       | Oncorine (H101) | Camrelizumab         |
| NCT05113290      | 4     | Hepatocellular Carcinoma         | Oncorine (H101) | Sorafenib            |
| NCT05124002      | 4     | Cholangiocarcinoma, Intrahepatic | Oncorine (H101) | HAIC or FOLFOX       |

با توجه به تاییدیه سازمان غذا و داروی چین (CFDA) برای استفاده از داروی انکورین در بیماران مبتلا به سرطان‌های ناحیه سر و گردن (SCCHN) و کارسینوم نازوفارنکس (NPC) بازار هدف این محصول به طور مستقیم بیماران مبتلا به SCCHN و کارسینوم نازوفارنکس (NPC) هستند که در فازهای پیشرفته بیماری می‌باشد. اما همانطور که قبلاً ذکر شد در چندین مطالعه بالینی اثرگذاری این دارو در درمان سایر تومورها از جمله سرطان‌های کبد غیر قابل جراحی، پانکراس و پستان هم نشان داده شده است. اگرچه این دارو در سال ۲۰۰۵ موفق به کسب مجوز برای ورود به بازار دارویی چین جهت ویروس درمانی سرطان شد اما همچنان کارآزمایی‌های بالینی بسیاری با استفاده از این ویروس برای درمان بیماران سرطانی در حال انجام است (جدول ۱). بنابراین در صورت حصول نتایج امیدوارکننده در کارآزمایی بالینی در حال انجام و کسب مجوز از سازمان غذا و دارو می‌توان از این دارو در آینده برای درمان سایر بیماران سرطانی استفاده کرد.

## ۲-۳. ویروس نیوکاسل

ویروس نیوکاسل به دلیل خواص منحصر به فردی که دارد به عنوان یکی از گزینه‌های مناسب برای ویروس درمانی مطرح است. سابقه استفاده بالینی از این ویروس به حدود ۵۰ سال قبل برمی‌گردد و مطالعات و کارآزمایی‌های بالینی مختلفی بر روی اثربخشی این ویروس در درمان انواع مختلف سرطان انجام شده است (۱۵). در سال ۲۰۱۹ ارزش مالی سرمایه‌گذاری بر روی ویروس درمانی سرطان در آمریکا تقریباً ۶۸,۹ میلیون دلار برآورد شده است (۱۶). تا کنون، سویه‌های مختلف این ویروس من جمله T-73، MTH68 و PV701MK107 و در مواردی سویه لاسوتا مورد مطالعات آزمایشگاهی و بالینی متعددی قرار گرفته‌اند (۱۷)، اما تا کنون مطالعات کمی از کارآزمایی بالینی بر روی سویه لاسوتا<sup>۱</sup> (LS) منتشر شده است هرچند، تزریق آن ایمن‌تر به نظر می‌رسد. سویه‌ی لاسوتا یکی از سویه‌های کم‌حدت ویروس نیوکاسل است که دارای خاصیت انکولیتیک منحصر به فردی است، سویه لنتوژنیک است که ویروس لاسوتا از مهم‌ترین گونه‌های این سویه است. این سویه به عنوان سویه‌ی تخفیف حدت یافته و غیر ویروالنت برای تهیه واکسن طیور مورد استفاده قرار می‌گیرد. تهیه سویه مونووالان امروزه بسیار دشوار است چون در اغلب موارد واکسن‌های تجاری موجود در بازار بصورت پلی‌والان تهیه می‌شوند که استفاده از آن با کاربرد انکولیتیک امکان‌پذیر نیست از طرفی این واکسن‌ها غلظت ویروس کمتری دارند و برای کاربردهای درمانی مناسب نیستند. یکی از مزایای استفاده از این ویروس عدم نیاز به دستکاری ژنتیکی است. همچنین سویه‌ی لاسوتای مورد استفاده در این طرح به دلیل اینکه بیماری‌زایی چندانی در انسان ندارد و علائم بعد از دریافت ویروس به واکنش‌های آلرژیک متعادل ختم می‌شود می‌تواند به عنوان یک کاندید مناسب در درمان سرطان‌ها به شمار رود. نحوه تجویز ویروس در میزان پاسخ بسیار موثر است برای مثال مسیر درون رگی و درون جمجمه‌ای در خرگوش، در خوکچه هندی با روش درون جمجمه‌ای و درون پریتنانی، نوزاد موش یک روزه با روش درون جمجمه‌ای و زیر جلدی، موش بالغ با روش درون جمجمه‌ای و درون پریتنانی، همستر با روش درون جمجمه‌ای متفاوت است گرچه تجویز سویه‌های ولوژنیک برای پرندگان می‌تواند بسیار خطر ایجاد کند ولی مطالعات انجام شده توسط محققینی چون Baron و Buckler بر روی سویه‌های velogenic که در پرندگان بشدت بیماری‌زا هستند نشان داد که حتی تجویز مقادیر بسیار

---

<sup>۱</sup> LaSota

بالا بصورت درون رگی در موش علایم بیماری زایی قابل گزارشی در این مدل ها ایجاد نکرده است (۱۸). در مطالعه دیگری نتایج نشان دادند که از با تجویز درون رگی حداقل  $10^9 \times 3$  واحد عفونی ۱ (IU) در بیمار مبتلا به لوسمی و حداقل  $10^{12} \times 4$  IU از مسیرترزریق درون توموری در سرطان های توپر برای انسان قابل تحمل است (۱۹). همچنین مطالعاتی که روی بیماران یا حتی مواردی نظیر کارکنان مراکز دامپزشکی یا آزمایشگاهی و کشاورزان که با سویه های وحشی و نه تخفیف حدت یافته واکسن در تماس بوده اند، بیماری بسیار خفیف را گزارش نمودند برآیند این مطالعات که نشان دهنده بی خطر بودن ویروس نیوکاسل برای انسان است (۲۰).

با توجه به موارد ذکر شده می توان چنین نتیجه گیری کرد که بی خطر بودن این سویه ویروسی برای انسان یک مساله اثبات شده است که استفاده از آن را برای درمان سرطان تسهیل می بخشد. به دلیل تغییرات موجود در ماهیت سلول های سرطانی سرعت رشد این ویروس در سلول های سرطانی بسیار بیشتر از سلول های طبیعی است. بنابراین به طور اختصاصی سلول های سرطانی را آلوده کرده و از بین می برد.

همانطور که اشاره شد ویروس نیوکاسل سویه لاسوتا به عنوان یک سویه لنتوژنیک، نسبت به سایر سویه ها حدت و بیماری زایی کمتری دارد. این ویروس هم در کشت سلول های مختلف مانند سلول های فیبروبلاست جنین جوجه، سلول Vero، سلول BHK هم به سادگی در تخم مرغ های عاری از پاتوژن ۲ (SPF) رشد و تکثیر می یابد. تکثیر در تخم مرغ SPF یکی از روش های معمول برای تولید واکسن نیوکاسل در پرندگان است (۲۴). همچنین امروز از این تخم مرغ ها برای تکثیر ویروس واکسن آنفلوانزا انسانی که هم اکنون در بازار عرضه می شوند نیز استفاده می شود. بسیاری از واکسن های طیور از دیرباز با این روش تولید شده اند و علیرغم اینکه این روش جز روش های ابتدایی تولید ویروس است همچنان در بیشتر کشورهای دنیا برای تهیه ی واکسن های طیور مورد استفاده قرار می گیرد. ویروس کشت شده در تخم مرغ های SPF در بسیاری از موارد

---

<sup>۱</sup> infectious units

<sup>۲</sup> Specific pathogen free

پس از چند پاساژ تیترا بسیار مناسب تری از ویروس نسبت به ویروس کشت شده در کشت‌های سلولی ایجاد می‌کند و به همین دلیل همچنان جز کاندیدهای مناسب برای تولید واکسن به شمار می‌رود (۲۴).

## فصل سوم:

### اهداف

### **۳-۱. هدف اصلی**

کسب دانش فنی و توسعه فناوری ویروس درمانی و ژن درمانی سرطان‌های

### **۳-۲. اهداف کاربردی**

در این پروژه تمرکز اصلی بر روی ساخت و تولید آدنوویروس انکولیتیک انکورین (H101) و تولید ویروس دست‌ورزی نشده نیوکاسل با هدف لیز اختصاصی سلول‌های توموری سرطان‌های توپر متاستاتیک است.

این پروژه در ادامه می‌تواند اهداف زیر را تامین کند:

الف) توسعه زیر ساخت‌های ضروری و چند منظوره جهت تولید محصولات فناورانه در حیطه ویروس

درمانی سرطان با قابلیت استفاده برای ساخت واکسن‌های نسل جدید؛

ب) ایجاد زیرساخت لازم برای تولید وکتور و حامل‌های ویروسی برای انجام پروژه‌های ژن درمانی؛

ج) طراحی و توسعه ویروس‌های انکولایتیک با هدف افزایش بقا و درمان بیماران مبتلا به سرطان؛

د) افزایش اثرات ضد توموری ویروس‌های انکولایتیک از طریق مهندسی ژنتیک و اصلاح ژنوم ویروس؛

ه) جلوگیری از خروج ارز از کشور با ارائه خدمات درمانی با هزینه و قیمت به مراتب پایین تر از مشابه خارج؛

ن) صادرات خدمات به کشورهای همسایه و یا جذب بیمار بصورت توریسم درمانی؛

و) تقویت جایگاه منطقه ای جمهوری اسلامی ایران به عنوان قطب درمان های فناورانه و پیشرفته در حوزه ویروس درمانی سرطان بعنوان یک افتخار ملی.

## فصل چهارم:

## روش پژوهش

#### **۴-۱. نوع مطالعه**

کاربردی: تهیه مشخصات فنی، محاسبات، فرمولاسیون و شبیه سازی و بررسی امکانپذیری فنی

#### **۴-۲. جمعیت (واحد) مطالعه**

در این مطالعه، بیماران مبتلا به سرطان‌های پیشرفته که به خط یک و دو درمان پاسخ نداده اند و یا بیماری آنها مجدداً عود کرده است، پس از کسب رضایت نامه کتبی از بیماران، وارد مطالعه شده و میزان اثر بخشی درمان مطابق با گایدلاین‌های RECIST تعیین خواهد شد.

#### **۴-۳. مکان و زمان مطالعه**

این مطالعه از مهرماه سال ۱۴۰۱ شروع شده است و براساس ارزیابی‌های به عمل آمده به مدت ۳۶ ماه ادامه خواهد داشت.

فاز آزمایشگاهی مطالعه و تولید در محل پژوهشکده سرطان معتمد در حال انجام می‌باشد.

#### ۴-۴. حجم نمونه

فاز صفر مطالعه: ۵ بیمار مبتلا به سرطان سر و گردن مرحله‌ی پیشرفته یا متاستاتیک از نوع سرطان سلول سنگفرشی

فاز یک مطالعه: سه گروه پنج نفره از بیماران مبتلا به سرطان‌های پیشرفته یا متاستاتیک (۱) سرطان سر و گردن از نوع سرطان سلول سنگفرشی، (۲) سرطان پستان و (۳) سرطان ریه NSCLC

#### ۴-۵. روش نمونه‌گیری

در این مطالعه، نمونه‌گیری انجام نخواهد شد.

#### ۴-۶. روش اجرا

این پروژه بر روی دو ویروس انکولایتیک نیوکاسل و انکورین متمرکز می‌باشد که براساس آن آزمایشگاه‌های سطح دو و سه ایمنی زیستی احداث خواهد شد.

##### ۴-۶-۱. توسعه زیرساخت

- فاز یک: آزمایشگاه سطح دو ایمنی زیستی (BSL<sup>۲</sup>)

(۱) خرید تجهیزات برای تولید و فرآوری ویروس در شرایط آزمایشگاهی با سطح ایمنی زیستی ۲

---

<sup>۱</sup> Biological Safety Level 2/3

(۲) طراحی و ساخت آزمایشگاه BSL2

• فاز دو: آزمایشگاه سطح سه ایمنی زیستی (BSL3)

(۱) خرید تجهیزات برای تولید و فرآوری ویروس در شرایط آزمایشگاهی با سطح ایمنی زیستی ۲ و ۳

(۲) طراحی و ساخت آزمایشگاه BSL2/BSL3

الف. تجهیزات اتاق تمیز

✓ ساندویچ پانل سقفی اتاق تمیز

✓ ساندویچ پانل دیواری اتاق تمیز

✓ اگزاست فن

✓ درب اتاق تمیز هم باد<sup>۱</sup>

✓ درب اتاق تمیز غیر هم باد<sup>۲</sup>

✓ پس باکس

✓ پنجره اتاق تمیز

ب. فیلترها

✓ فیلتر هپا فشرده V شکل

✓ فیلتر باکس هپا

---

<sup>۱</sup> Flush System

<sup>۲</sup> Semi Flush System

- ✓ قاب یا فریم فیلتر
- ✓ فیلتر هپا با جدا کننده آلومینیومی
- ✓ فیلتر هپا ظرفیت بالا با کاربرد خاص
- ✓ فیلتر هپا با ظرفیت بالا بدون چین خوردگی
- ✓ فیلتر گازی
- ✓ فیلترهای شیمیایی
- ✓ فیلتر هپا و اولپا با گسکت ژل
- ✓ فیلتر کربن فعال
- ✓ لامینار فلو
- ✓ فیلتر هپا ترمینال هود
- ✓ فیلتر هپا و اولپای سقفی
- ✓ فیلتر ظرفیت بالا هپا V شکل

### ج. قطعات کنترل

- ✓ سنسور رطوبت
- ✓ سنسور دما
- ✓ سنسور فشار DPT
- ✓ رطوبت سنج و رطوبت گیر

۳) ایجاد زیرساخت خط تولید و بسته بندی با درجه کیفی فارماکوپه

۲-۶-۴. کسب دانش فنی ویروس درمانی در درمان سرطان های صعب‌العلاج با استفاده از ویروس  
انکولایتیک نیوکاسل

مطالعات آزمایشگاهی

• فاز یک: تولید ویروس نیوکاسل و تعیین تیترا ویروس

(۱) تهیه بذر ویروس نیوکاسل سویه لاسوتا از موسسه واکسن سازی و سرم سازی رازی

(۲) تولید ویروس: در این مطالعه، تولید ویروس به دو روش انجام می‌پذیرد:

الف) کشت بر روی تخم مرغ SPF جهت استفاده در افرادی که به تخم مرغ حساسیت  
ندارند:

✓ تهیه تخم مرغ SPF دارای شناسنامه جهت تکثیر ویروس نیوکاسل از موسسه سرم و واکسن

سازی رازی

✓ کشت ویروس در تخم مرغ به منظور تکثیر ویروس نیوکاسل سویه لاسوتا، انجام آزمون هم-

آگلوتیناسیون (HA) و برداشت آن در شرایط آزمایشگاهی با سطح ایمنی زیستی ۲

✓ کشت ویروس سازگار شده با تکثیر بر روی تخم مرغ SPF با هدف دستیابی به تیتراهای بالا

✓ انجام تست‌های تیتراسیون با روش استاندارد و قابل قبول EID50 برای ویروس تهیه شده از

کشت تخم مرغ SPF

ب) کشت سلول فیبروبلاست جهت استفاده در افراد حساس به تخم مرغ:

✓ تهیه سلول فیروبلست از جنین جوجه SPF به منظور کشت ویروس (جهت تولید ویروس برای افراد حساس به تخم مرغ و فرآورده های آن) در اتاق تمیز و انجام آزمون هم آگلوتیناسیون (HA)

✓ انجام فرایند سازگاری ویروس تهیه شده بر روی کشت سلول  
✓ تهیه بانک سلولی به منظور جلوگیری از هر گونه آلودگی میکروبی  
✓ انجام دوره های تست های میکوپلازما و sterility روی کشت های سلولی  
✓ کشت ویروس سازگار شده با تکثیر بر روی سلول فیروبلست با هدف دستیابی به تیتراهای بالا

✓ انجام تست های تیتراسیون با روش استاندارد و قابل قبول TCID<sub>50</sub> برای ویروس تهیه شده از کشت سلول

#### • فاز دو مطالعه: فاز پیش بالینی ویروس نیوکاسل

(۱) تعیین میزان دوز مناسب دارو و ویروس برای انهدام رده های مختلف سلول های سرطانی در آزمایشگاه

(۲) بررسی اثرات بالینی ویروس بر روی موش های توموری، انجام تست های پاتولوژی، سی تی اسکن و آزمایشات تاییدی بر روی مدل های موشی و تعیین دوز مناسب دارو و ویروس بر روی مدل های موشی

(۳) انتخاب روش های مناسب تزریق بر روی مدل های موشی

۳-۶-۴. مهندسی ژنتیک و تولید نیمه صنعتی ویروس آدنوی دستورزی شده (انکورین) با قابلیت تکثیر اختصاصی در سلول‌های سرطانی به منظور ژن درمانی و ویروس درمانی سرطان‌های صعب-العلاج

#### مطالعات آزمایشگاهی

• فاز اول: طراحی و ساخت سازه آدنوویروس انکولیتیک با مشابه ویروس انکورین با استفاده از تکنولوژی مهندسی وکتورهای نو ترکیب آدنوویروسی

(۱) مطالعات بیوانفورماتیکی جهت مهندسی وکتور غیرهمانند ساز pAdeasy-1 و طراحی سازه های

ژنتیکی لازم برای ساخت پلاسمید تولید کننده ویروس انکورین (H101)

(۲) سنتز سازه های ژنی لازم برای تبدیل وکتور غیرهمانند ساز pAdeasy-1 به وکتور انکولیتیک

(تکثیر شونده) انکورین (H101)

(۳) تولید پلاسمید نو ترکیب آدنوویروس تیپ ۵ مشابه با انکورین (H101) با استفاده از روش های

نو ترکیبی همولوگ در باکتری BJ5183

(۴) تایید ساخت پلاسمید نهایی تولید کننده آدنوویروس انکولیتیک از طریق تکنیک PCR و هضم

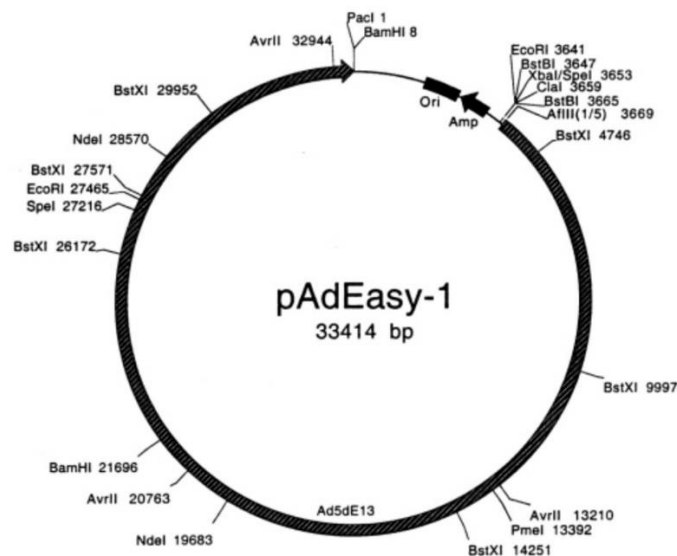
آنزیمی و توالی یابی

❖ ساختار اصلی آدنوویروسی تکثیرشونده (مشابه انکورین) با استفاده از وکتور

غیر تکثیرشونده pAdeasy-1

پلاسمید آدنووایروسی pAdEasy-1 شامل تمام توالی های Ad5 به جز نوکلئوتیدهای ۱-۳۵۳۳ (شامل ژن های E1) و نوکلئوتیدهای ۲۸۱۳۰-۳۰۸۲۰ (شامل E3) است. (شکل ۴-۲) لازم به ذکر است که ویروس انکولیتیک انکورین نیز مبتنی بر سروتیپ ۵ آدنووایروس تولید خواهد شد.

برای انجام نوترکیبی و افزودن توالی مربوط به E1A و E1B به بکبن ویروس از شاتل وکتور pShuttle (16402) استفاده شد (شکل ۴-۲) در این وکتور توالی های آدنووایروسی ("بازو") متناسب با دو طرف ناحیه E1 وجود دارد که امکان نوترکیبی همولوگ با pAdEasy-1 را فراهم می کند. بازوی چپ حاوی نوکلئوتیدهای Ad5 34,931-35,935 است که واسطه نوترکیبی همولوگ با ناقل های pAdEasy در E. Coli، تکرار انتهایی معکوس (ITR) و توالی های سیگنال بسته بندی (نوکلئوتیدهای Ad5 ۴۸۰-۱) مورد نیاز برای تولید ویروس در سلول های پستانداران است. بازوی راست حاوی نوکلئوتیدهای Ad5 3534-5790 است که نوترکیبی همولوگ



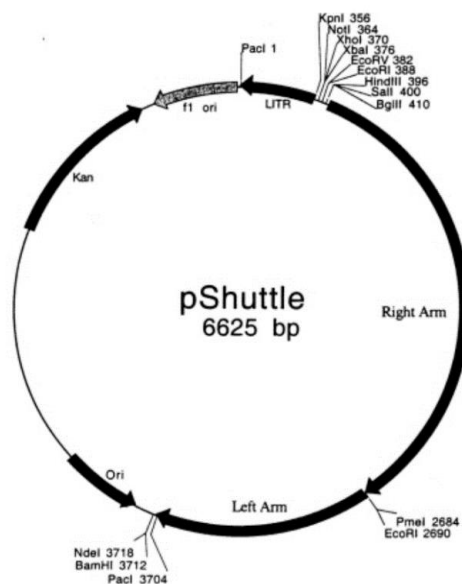
شکل ۴-۲ شکل شماتیک وکتور pAdEasy-1

با وکتور pAdEasy را واسطه می کند.

ویروس انکورین حاوی حذفی بین نوکلئوتیدهای ۲۴۹۶ و ۳۳۲۳ در ناحیه E1B است (۸۲۷ باز) که پروتئین ۵۵ کیلو دالتونی را کد می کند. علاوه بر این، یک جا به جایی C به T در موقعیت ۲۰۲۲ در E1B انجام شده است که یک کدون خاتمه در موقعیت کدون سوم پروتئین ایجاد می کند. این تغییرات بیان ژن E1B 55-kDa را در سلول های آلوده به انکورین حذف می کند.

در این راستا توالی ایی به طول ۲۳۷۹ نوکلئوتید که حاوی توالی کدکننده E1A و E1B-19KD بود و توالی E1B در آن فاقد ۸۲۷ نوکلئوتید بود سنتز و در وکتور pShuttle (16402) کلون شد (شکل ۴-۳). پس از تایید ساخت شاتل وکتور، برای انجام نوترکیبی باید شاتل وکتور از ناحیه بین دو بازوی همولوگ خطی شود که برای اینکار از آنزیم *EcoRI* استفاده شد. در مرحله بعد شاتل وکتور خطی شده به همراه پلاسمید pAdeasy-1 به درون باکتری Bz5183 ترانسفورم شد تا نوترکیبی اتفاق بیفتد.

سپس از بین کلونی های ایجاد شده بر روی پلیت LB Agar حاوی کانامایسین، ۱۰ تا از کوچکترین



شکل ۴-۳ نقشه ژنتیکی شاتل وکتور 16402

کلونی ها انتخاب و از آنها کشت اورنایت تهیه شد تا استخراج پلاسمید و الکتروفورز انجام شود و پلاسمید کاندید

نو ترکیبی انتخاب گردد. در صورتی که نو ترکیبی همولوگ بین شاتل وکتور و پلاسمید pAdeasy-1 انجام شود، در اثر هضم آنزیمی وکتور کاندید نو ترکیبی با *PacI* یک قطعه ۴۵۰۰ بازی از وکتور خارج می شود که این موضوع در این پروژه تایید شد.

همان طور که قبلا ذکر شد در ناحیه E3 توالی بین ۲۸۱۳۰-۳۰۸۲۰ حذف شده است که معادل ۲۶۹۰ باز است. طول ناحیه حذف شده از ژنوم Ad5 در وکتور pAdeasy-1 در ناحیه E3 ۲۶۹۰ نوکلئوتید است که حد فاصل توالی ۲۸۱۳۰-۳۰۸۲۰ ژنوم Ad5 است. با توجه به اینکه ناحیه حذف شده در pAdeasy-1 از نوکلئوتید ۲۸۱۳۰ می باشد و ناحیه ی E3 از ۲۷۵۶۰ در نتیجه ۵۷۰ نوکلئوتید ابتدایی از ناحیه E3 در-Adeasy 1 وجود داشته و در نتیجه می بایست ۱۱۷۷ نوکلئوتید باقی مانده را به این ناحیه اضافه کنیم و بعد از باز ۲۸۱۳۰ قرار بدهیم.

بنابراین توالی که از ناحیه E3 برای تولید ویروس مشابه H101 لازم است معادل ۱۷۴۰ باز است که شامل توالی کدکننده ی پروتئین های ۱۲/۵ ، ۶/۷ و ۱۹ کیلو دالتون است. برای افزودن این توالی به وکتور pAdeasy-1 به شاتل وکتوری نیاز است که دارای بازوی همولوگ با دو طرف ناحیه E3 باشد. در این راستا قطعه ای به طول ۳۶۷۰ نوکلئوتید سنتز شد که علاوه بر توالی ۱۱۷۷ نوکلئوتیدی مورد نیاز برای اضافه شدن به وکتور pAdeasy-1 دارای توالی های همولوگ در دو طرف قطعه ی ۱۱۷۷ بازی بود. برای انجام نو ترکیبی در این مرحله می بایست بک بن آدنوویروسی در نزدیکی توالی E3 خطی شود که برای خطی کردن از آنزیم *SpeI* استفاده شد. پس از خطی شدن وکتور pAdeasy-1 که در مرحله قبل توالی E1A و E1B 19KD به آن اضافه شده بود، نو ترکیبی بین این وکتور و قطعه ۳۶۷۰ بازی در باکتری Bz5183 انجام شد. برای تایید اضافه شدن توالی ۱۱۷۷ بازی ناحیه E3 به وکتور pAdeasy-1 کلونی PCR انجام شد. برای انجام کلونی PCR از جفت پرایمری استفاده شد که یکی از آنها اختصاصی توالی ۱۱۷۷ و دیگری به توالی بک بن متصل می شد. فرایند PCR و در ادامه توالی یابی افزودن توالی های مدنظر به پلاسمید pAdeasy-1 را تایید نمود. پس از ساخت

توالی نهایی به منظور اطمینان از درستی توالی افزوده شده و مشابهت پلاسمید با توالی آنکورین کل توالی پلاسمید سکانس شد و تشابه توالی ناحیه ویروسی پلاسمید pAdEasy-1 با ویروس آنکورین تایید شد.

پلاسمید آدنوویروسی pAdEasy-1 شامل تمام توالی های Ad5 به جز نوکلئوتیدهای ۱-۳۵۳۳ (شامل ژن های E1) و نوکلئوتیدهای ۲۸۱۳۰-۳۰۸۲۰ (شامل E3) است که برای مهندسی آدنوویروس در سیستم پروکاریوتی طراحی و توسعه داده شده است. حذف این دو ژن ویروسی فضایی را برای DNA خارجی ایجاد می کند و قابلیت های خود همانندسازی را از بین می برد. حذف هر دو ژن فضایی را برای ۷,۵ کیلو بایت DNA خارجی ایجاد می کند که می تواند به ژنوم Ad5 وارد شود. ژن E1 که برای تولید ذرات ویروسی ضروری است، به صورت ترانس توسط سلول های AD-293 ارائه می شود. pAdEasy-1 حامل ژن مقاومت آمپی سیلین است که پس از نوترکیبی با شاتل وکتور، ژن مقاومت آمپی سیلین با ژن مقاومت شاتل وکتور که معمولا کانامایسین است جایگزین می شود. برای انجام نوترکیبی با پلاسمید حاوی بک بن آدنوویروس مانند pAdEasy-1 انواع شاتل وکتورها توسعه پیدا کرده اند و طبق آنچه در جواب سوال ۲ گفته شد در این پروژه از شاتل وکتور 16402 استفاده کردیم که فاقد هر گونه پروموتور و دم پلی و... در حد فاصل دو بازوی همولوگ می باشد. بنابراین پس از نوترکیبی صرفا توالی مدنظر ما به بک بن آدنوویروس اضافه خواهد شد. به علاوه پس از انجام نوترکیبی و به منظور تولید ویروس، پلاسمید نوترکیب مشابه با ویروس آنکورین با آنزیم *PacI* بریده می شود. این آنزیم در وکتور نوترکیب pAdEasy-1 دارای ۲ جایگاه برش است که پس از هضم آنزیمی قطعه ی حدود ۴۵۰۰ نوکلئوتید شامل ژن مقاومت به آنتی بیوتیک و ناحیه آغاز همانندسازی باکتریایی از آن حذف می شود و صرفا توالی مربوط به ویروس باقی می ماند، در نتیجه استفاده از این پلاسمید برای مطالعات بالینی هیچ منعی ندارد همانطور که در مطالعات بسیاری در طراحی واکسن و ویروس های انکولیتیک از آن استفاده شده است.

• فاز دوم: تولید آزمایشگاهی ویروس انکورین و انجام مطالعات پیش بالینی مرتبط با یا کارایی و

#### ایمنی ویروس انکولتیک

(۱) بسته بندی و تولید آزمایشگاهی ویروس انکورین از طریق ترانسفکت وکتور نو ترکیب تهیه شده، به

درون سلول HEK-293Ad

(۲) تیمار سلول های A549 به عنوان سلول مستعد آدنوویروس با ذرات ویروسی تغلیظ شده به منظور

بررسی اثر سایتولیتیک ویروس بر روی رده سلولی سرطانی

(۳) تایید انکولیتیک بودن ویروس از طریق مشاهده تکثیر ویروس در رده های سلول سرطانی با نقص

پروتئین p53 مانند HT29, SW480 و...

(۴) ارزیابی تیتراژ موثر ویروس از طریق روش های بیولوژیک و غیر بیولوژیک

(۵) ارزیابی اثر ویروس در کشت سلولی نمونه های توموری بیماران سرطانی و ارزیابی اثر سینرژیک

آن با داروهای شیمی درمانی

(۶) ارزیابی ایمنی ویروس تولید شده در مدل های حیوانی استاندارد شامل موش، رت و خوکچه هندی

(۷) ارزیابی اثر ضد توموری ویروس انکورین بر موش های پیوند زده شده با سلول های توموری 4T1

(رده موشی سرطان پستان)

## فصل پنجم:

یافته های پژوهش

## ۱-۵. ساخت بکبن آدنووایروسی تکثیرشونده (مشابه انکورین) با استفاده از وکتور

### غیرتکثیرشونده Adeasy-1

پلاسمید آدنووایروسی pAdEasy-1 شامل تمام توالی های Ad5 به ۱-۳۵۳۳ (شامل ژن های E1) و نوکلئوتیدهای ۲۸۱۳۰-۳۰۸۲۰ (شامل E3) است.

برای انجام نوترکیبی و افزودن توالی مربوط به E1A و E1B به بکبن ویروس از شاتل وکتور pShuttle (16402) استفاده شد. در این وکتور توالی های آدنووایروسی ("بازو") متناسب با دو طرف ناحیه E1 وجود دارد که امکان نوترکیبی همولوگ با pAdEasy-1 را فراهم می کند. بازوی چپ حاوی نوکلئوتیدهای Ad5 34,931-35,935 است که واسطه نوترکیبی همولوگ با ناقل های pAdEasy در E. Coli، تکرار انتهایی معکوس (ITR) و توالی های سیگنال بسته بندی (نوکلئوتیدهای Ad5 ۴۸۰-۱) مورد نیاز برای تولید ویروس در سلول های پستانداران است. بازوی راست حاوی نوکلئوتیدهای Ad5 3534-5790 است که نوترکیبی همولوگ با وکتور pAdEasy را واسطه می کند.

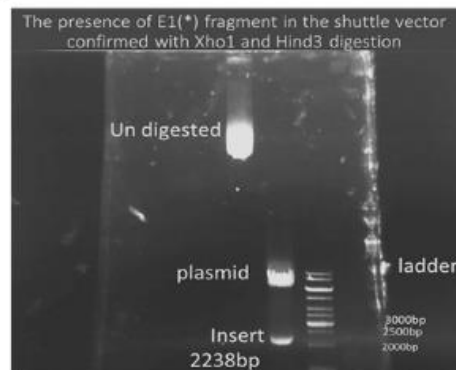
ویروس انکورین حاوی حذفی بین نوکلئوتیدهای ۲۴۹۶ و ۳۳۲۳ در ناحیه E1B است (۸۲۷ باز) که پروتئین ۵۵ کیلو دالتونی را کد می کند. علاوه بر این، یک جا به جایی C به T در موقعیت ۲۰۲۲ در E1B انجام شده است که یک کدون خاتمه در موقعیت کدون سوم پروتئین ایجاد می کند. این تغییرات بیان ژن E1B 55-kDa را در سلول های آلوده به انکورین حذف می کند.

در این راستا توالی ایی به طول ۲۳۷۹ نوکلئوتید که حاوی توالی کدکننده E1A و E1B-19KD بود و توالی E1B در آن فاقد ۸۲۷ نوکلئوتید بود سنتز و در وکتور PUC57 دریافت شد. پس از دریافت سازه ژنی، توالی کدکننده E1A و E1B-19KD در وکتور pShuttle (16402) کلون شد. ساب کلونینگ این توالی به شاتل وکتور از طریق دو آنزیم XhoI و HindIII انجام شد (شکل ۵-۱).

(الف)



(ب)



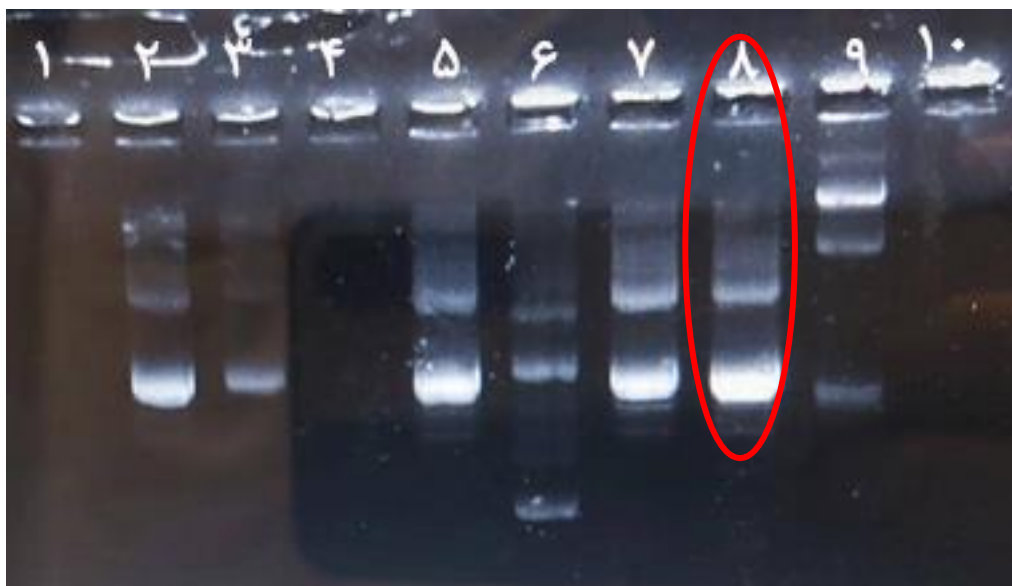
شکل ۵-۱ الف: colony-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ابتدا و انتهای سازه E1A , E1B-19Kd جهت تایید درج در شاتل وکتور. همانطور که در تصویر مشخص است، از ۱۰ کلونی انتخابی جواب colony-PCR تمامی کلون ها مثبت شد. ب: هضم آنزیمی pShuttle-E1A با آنزیم های *XhoI* و *HindIII* جهت تایید درج قطعه E1A و E1B-19KD در شاتل وکتور



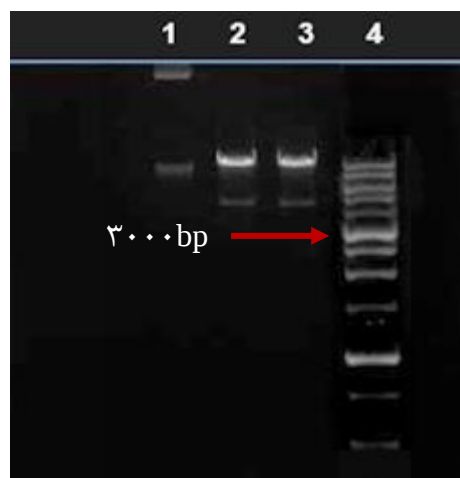
شکل ۵-۲ هضم آنزیمی شاتل وکتور حاوی قطعه E1A و E1B-19KD توسط آنزیم *EcoRI* به منظور نو ترکیبی همولوگ با یک بن آدنوویروسی؛ (۱) شاتل وکتور نو ترکیب هضم شده با آنزیم *EcoRI*، (۲) Ladder 1Kb و (۳) شاتل وکتور هضم نشده.

پس از تایید ساخت شاتل وکتور، برای انجام نوترکیبی باید شاتل وکتور از ناحیه بین دو بازوی همولوگ خطی شود که برای اینکار از آنزیم *EcoRI* استفاده شد (۵-۲). در مرحله بعد شاتل وکتور خطی شده به همراه پلاسمید pAdeasy-1 به درون باکتری Bj5183 ترانسفورم شد تا نوترکیبی اتفاق بیفتد.

سپس از بین کلونی‌های ایجاد شده بر روی پلیت LB Agar حاوی کانامایسین، ۱۰ تا از کوچکترین کلونی‌ها انتخاب و از آنها کشت اورنایت تهیه شد تا استخراج پلاسمید و الکتروفورز انجام شود و پلاسمید کاندید نوترکیبی انتخاب گردد. همان‌طور که در شکل ۵-۳ مشخص است از بین ۱۰ پلاسمید استخراج شده که بر روی ژل آگارز ۰,۷ درصد ران شد، تنها پلاسمید حاصل از کلون شماره ۱۰ سایز و الگوی متفاوتی نسبت به شاتل وکتور داشت که برای تایید قطعی وقوع نوترکیبی، پلاسمید با آنزیم *PacI* هضم گردید. در صورتی که نوترکیبی همولوگ بین شاتل وکتور و پلاسمید pAdeasy-1 انجام شود، در اثر هضم آنزیمی وکتور کاندید نوترکیبی با *PacI* یک قطعه ۴۵۰۰ بازی از وکتور خارج می‌شود که این موضوع همان‌طور که در شکل ۴-۵ مشخص است تایید شد.



شکل ۵-۳ الکتروفورز پلاسمید استخراج شده از ۱۰ کلونی انتخابی پس از انجام الکتروپوریشن باکتری Bj5183



شکل ۵-۴ الکتروفورز محصول هضم آنزیمی پلاسمید کاندید نوترکیبی با *PacI*؛ (۱) پلاسمید نو ترکیب pAdeasy-1 هضم نشده، (۲ و ۳) پلاسمید نو ترکیب pAdeasy-1 هضم شده با آنزیم *PacI* و (۴) Ladder 1Kb

همان طور که قبلا ذکر شد در ناحیه E3 توالی بین ۲۸۱۳۰-۳۰۸۲۰ حذف شده است که معادل ۲۶۹۰ باز است. طول ناحیه حذف شده از ژنوم Ad5 در وکتور pAdeasy-1 در ناحیه E3 ۲۶۹۰ نوکلئوتید است که حد فاصل توالی ۲۸۱۳۰-۳۰۸۲۰ ژنوم Ad5 است. با توجه به اینکه ناحیه حذف شده در pAdeasy-1 از نوکلئوتید ۲۸۱۳۰ می باشد و ناحیه E3 از ۲۷۵۶۰ در نتیجه ۵۷۰ نوکلئوتید ابتدایی از ناحیه E3 در Adeasy-

1 وجود داشته و در نتیجه می بایست ۱۱۷۷ نوکلئوتید باقی مانده را به این ناحیه اضافه کنیم و بعد از باز ۲۸۱۳۰ قرار بدهیم.

بنابراین توالی که از ناحیه E3 برای تولید ویروس مشابه H101 لازم است معادل ۱۷۴۰ باز است که شامل توالی کدکننده‌ی پروتئین‌های ۱۲/۵ ، ۶/۷ و ۱۹ کیلو دالتون است. برای افزودن این توالی به وکتور pAdeasy-1 به شاتل وکتوری نیاز است که دارای بازوی همولوگ با دوطرف ناحیه E3 باشد. در این راستا قطعه‌ای به طول ۳۶۷۰ نوکلئوتید سنتز و در وکتور PUC57 دریافت شد. توالی سنتز شده علاوه بر توالی ۱۱۷۷ نوکلئوتیدی مورد نیاز برای اضافه شدن به وکتور pAdeasy-1 دارای توالی های همولوگ در دو طرف قطعه‌ی ۱۱۷۷ بازی بود. برای انجام نوترکیبی در این مرحله می‌بایست بکبن آدنوویروسی در نزدیکی توالی E3 خطی شود که برای خطی کردن از آنزیم *SpeI* استفاده شد (شکل ۵-۵).



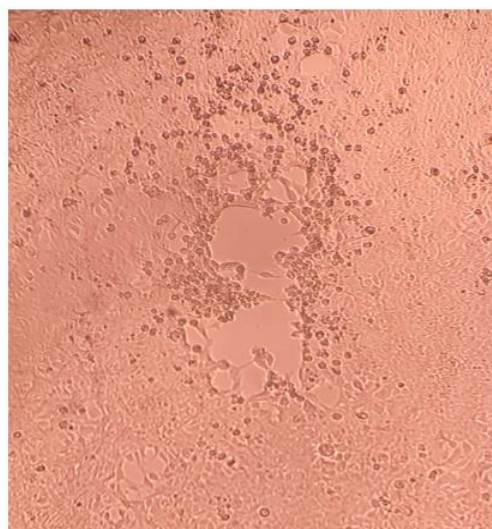
شکل ۵-۵ هضم آنزیمی وکتور pAdeasy-1 با آنزیم *SpeI* به منظور نوترکیبی با وکتور حاوی توالی E3 ۱- وکتور هضم نشده ۲- مارکر ۱Kb ۳ و ۴- وکتور هضم شده



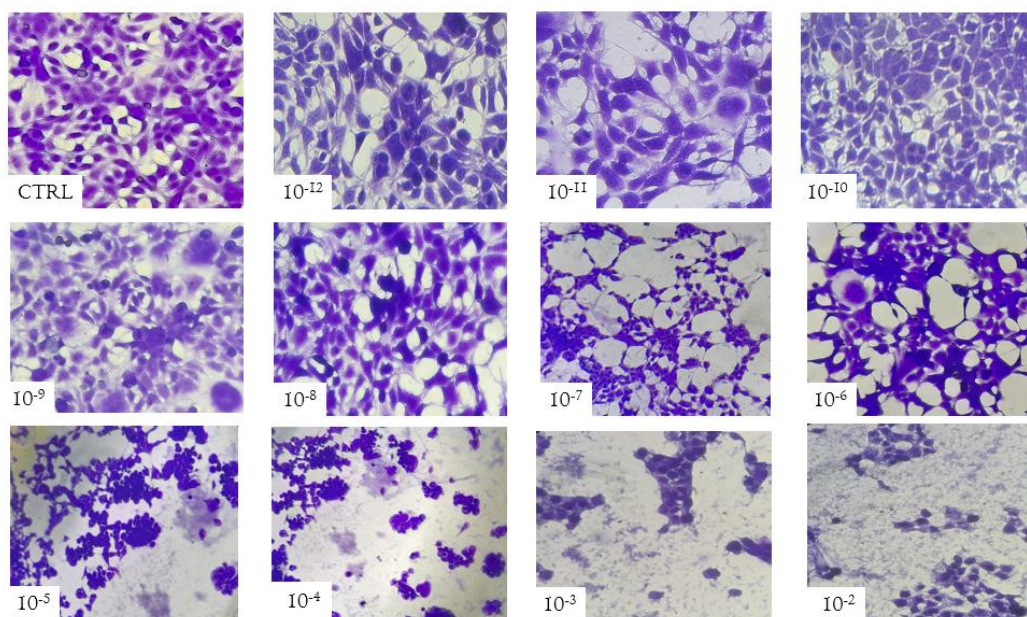
شکل ۵-۶ تاییدی بر روی دو کلون کاندید نوترکیبی در ناحیه E3 توسط پرایمرهای اختصاصی ناحیه ۱۱۷۷ نوکلئوتیدی و بکبن آدنوویروس

پس از خطی شدن وکتور pAdeasy-1 که در مرحله قبل توالی E1A و E1B 19KD به آن اضافه شده بود، نوترکیبی بین این وکتور و قطعه ۳۶۷۰ بازی در باکتری Bz5183 انجام شد. برای تایید اضافه شدن توالی ۱۱۷۷ بازی ناحیه E3 به وکتور pAdeasy-1 کلونی PCR انجام شد. برای انجام کلونی PCR از جفت پرایمری استفاده شد که یکی از آنها اختصاصی توالی ۱۱۷۷ و دیگری به توالی بکبن متصل می شد. همان طور که در تصویر شماره ۵-۶ مشخص است تکثیر قطعات ۳۶۷۰ نوکلئوتیدی و ۲۳۰۰ بازی نشان دهنده درج توالی ۱۱۷۷ بازی ناحیه E3 به وکتور pAdeasy-1 می باشد که این موضوع درمورد کلونی ۹ تایید شد.

پس از تایید وقوع نوترکیبی و و درج توالی های مدنظر در پلاسمید pAdeasy1، پلاسمید نوترکیب به منظور تولید ویروس انکولیتیک به سلول های HEK-AD ترانسفکت شد. ایجاد اثر سایتوپاتیک Comet-shaped در اثر تولید آدنوویروس انکولیتیک بعد از ترانسفکشن سلول های HEK-AD نشان دهنده تولید ویروس می باشد (شکل ۵-۷)



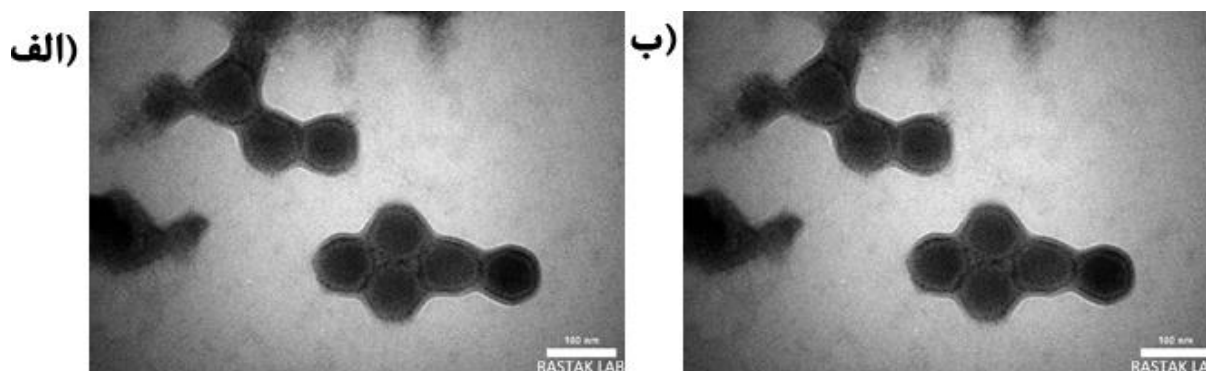
شکل ۵-۷ تشکیل comet-shaped CPE بعد از ترانسفکشن سلول های HEK-AD توسط پلاسمید نو ترکیب تولید کننده ویروس انکورین



شکل ۵-۸ ترنگ آمیزی سلول های HEK-AD با رنگ کریستال ویوله ۱۰ روز پس از آلوده کردن سلول ها با ویروس انکورین سپس به عنوان یکی از روش های تعیین هویت ویروس، از ویروس انکولیتیک خالص شده عکس میکروسکوپ الکترونی تهیه شد.

در مرحله بعد ویروس با تیترا بالا تولید و تعیین تیترا شد. برای تعیین تیترا ویروس از روش TCID<sub>50</sub>

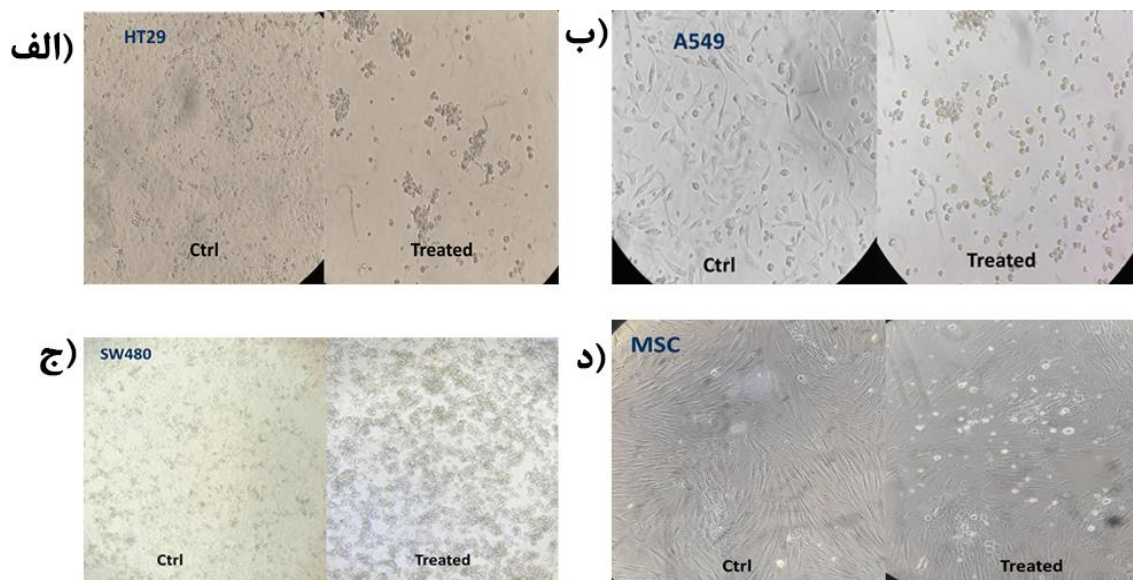
استفاده شد و تیترا ویروس  $5 \times 10^{10}$  تخمین زده شد (شکل های ۵-۸ و ۵-۹). در ادامه به منظور بررسی مشابهت



شکل ۵-۹ عکس میکروسکوپ الکترونی از ویروس انکولیتیک (انکورین) تولید شده در پژوهشکده معتمد که کاملاً منطبق با تصاویر میکروسکوپ الکترونی آدنوویروس می باشد.

توالی ژنی ویروس تولید شده با ویروس انکورین whole genome sequencing انجام شد که نتایج آن تایید کننده مشابهت توالی ویروس تولید شده در پژوهشکده معتمد با ویروس انکورین بود.

در مرحله بعد به منظور بررسی اثر سایتوپاتیک ویروس انکورین بر روی سلول های سرطانی با نقص پروتئین p53 مثل HT29 و SW480 مجموعه ای از سلول های سرطانی کشت داده شدند و توسط ویروس انکورین با  $MOI = 100$  آلوده شدند و بعد ۴۸ و ۷۲ ساعت، اثر ویروس بر روی سلول از طریق مشاهده سلول ها در زیر میکروسکوپ ارزیابی شد. همان طور که در تصاویر زیر (شکل ۵-۱۰) مشخص است ویروس انکورین نه تنها سلول های سرطانی با نقص پروتئین p53 بلکه سلول های سرطانی فاقد نقص p53 را نیز لیز کرد که مطابق با یافته سایر مطالعات بود در حالی که بر روی سلول نرمال تاثیری نداشت که نشان دهنده انکولیتیک بودن ویروس تولیدی می باشد.



شکل ۵-۱۰ ارزیابی اثر ویروس انکورین بر روی ۳ رده سلول سرطانی A549، HT29 و SW480 و سلول MSC مشتق از بافت چربی.

در ادامه این پروژه ایمنی و کارایی ویروس انکولیتیک در فاز پیش بالینی مورد بررسی قرار خواهد گرفت و به صورت همزمان تولید ویروس تحت شرایط GMP آغاز خواهد شد تا در صورت تایید ایمنی در مطالعه پیش بالینی فاز سوم مطالعه (بررسی ایمنی ویروس در فاز صفر و یک) آغاز گردد.

## ۵-۲. نتایج مربوط به تولید ویروس نیوکاسل و تعیین تیر ویروس

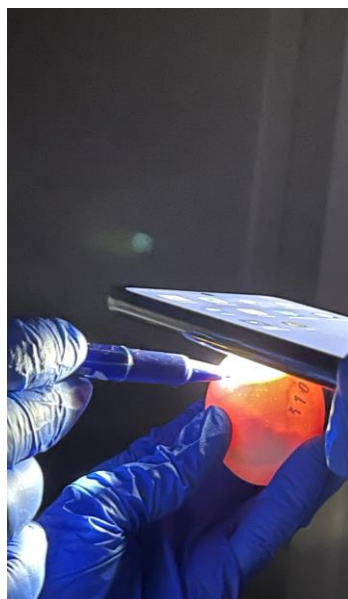
### ۵-۴-۱. تولید ویروس در بستر تخم مرغ SPF

تعداد ۳۰۰ عدد تخم مرغ SPF، سن ۹ روز، از موسسه سرم سازی و واکسن سازی رازی تهیه شد و به آزمایشگاه ویروس شناسی پژوهشکده معتمد انتقال داده شد. تمامی تخم مرغها کندل شدند و زندهمانی آنها بررسی شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

در مرحله‌ی نخست، سطح تخم مرغها با تنتور ید ضد عفونی گردید و به تخم مرغها، واکسن نیوکاسل کلون شرکت ایزوی ایتالیا، با  $10^8$  EID<sub>50</sub> به میزان صد میکرولیتر و با رقت یک دهم تزریق شد (شکل ۵-۱۲). در هر شانه، یک تخم مرغ هم به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. تخم مرغها به انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد

منتقل شدند و به صورت روزانه کندل شدند و در روز چهارم به یخچال انتقال داده شد و در روز پنجم، هاروست از تمام تخم مرغ‌ها صورت گرفت. بعد از هاروست صد میکرولیتر از مایع الانتوئیک تخم‌مرغ برای تست HA ویروس استفاده شد (۵-۱۳).

در مرحله‌ی بعد، از جنین تخم مرغ‌های SPF به منظور تهیه‌ی سلول‌های فیبروبلاست استفاده شد. دو فلاسک به عنوان استوک نگهداری شد و در ارتباط با سه فلاسک دیگر، بعد از کانفلوئنت شدن ۹۰ درصدی، به میزان ۲۰۰ میکرولیتر از واکسن لاسوتای رازی با EID50  $10^8$  بر روی یک فلاسک برده شد و فلاسک دوم به عنوان کنترل سلولی در نظر گرفته شد که به آن ۲۰۰ میکرولیتر PBS استریل اضافه شد.



شکل ۵-۱۲ تزریق ویروس نیوکاسل سویه لاسوتا به تخم مرغ SPF جنین دار.

سلول‌ها بعد از ۲۴ ساعت بررسی شدند؛ در فلاسک‌هایی که به آنها واکسن لاسوتای رازی تلقیح شده بود، CPE مشاهده شد (۵-۱۴). در فلاسک کنترل، هیچگونه اثرات سایتوپاتیکی مشاهده نگردید. فلاسک‌ها مجدداً به مدت ۲۴ ساعت دیگر پایش شدند. در ساعت ۴۸، فلاسک‌ها به فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد منتقل

شدند. بعد از دو ساعت مجدد از فریزر خارج شده و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از آنها برای تست HA استفاده گردید.

## **۵-۴-۲. نتایج مربوط به برداشت ویروس از مایع آلانتوئیک**

قسمت کیسه هوایی را که قبلاً با مداد علامت‌گذاری کرده بودیم، با قیچی برش دادیم. پرده مشاهده شده، پرده‌ی کوریوآلانتوئیک است؛ قسمت تیره‌تر مربوط به سر جنین است.

با سرنگ مخصوص شیشه‌ای که استریل است، بانوک سوزن به کنار پرده آسیب رسانده و با قاشک مخصوصی، جنین را کنار زده و مایع زلال و شفاف (اگر آلوده باشد، کدر می‌شود) را کشیدیم (۵-۱۳).



شکل ۵-۱۳ مرحله‌ی هاروست از تخم مرغ.

(الف)



(ب)



شکل ۵-۱۴ مشاهده‌ی CPE پس از ۲۴ ساعت، در فلاسک‌هایی که به آنها واکسن لاسوتای رازی تلقیح شده بود؛ CPE ایجاد شده در سلول توسط ویروس لاسوتا پس از ۲۴ ساعت شامل تجمع و گرد شدن سلول‌ها می‌باشد. با ادامه عفونت، سلول‌های بزرگ، ستاره‌ای شکل و در نهایت پلاک تشکیل می‌گردد.

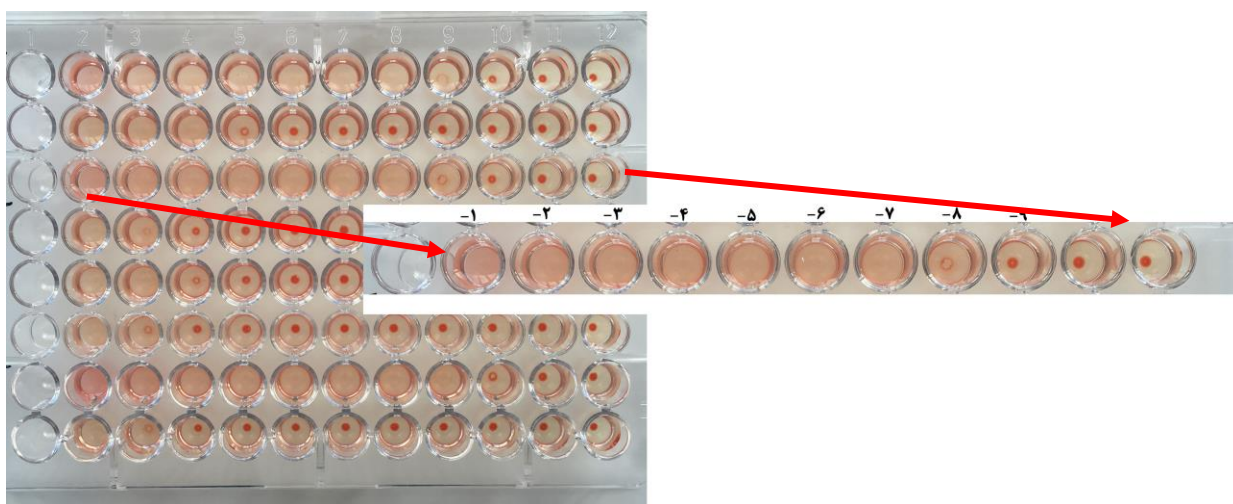
مایع آلانتوئیک که ویروس در آن رشد کرده جهت تست HA بررسی شد. از دو تخم مرغ SPF در سن ۱۸ روزگی مجدداً، سلول فیبروبلاست و سلول کلیه‌ی جنین جوجه کشت داده شد و به عنوان استوک ذخیره گردید.

### ۳-۴-۵. نتایج مربوط به تست HA قبل از تخلیص و تغلیض ویروس نیوکاسل

این آزمون بر اساس این واقعیت انجام می‌شود که حضور ویروس هم‌اگلوتینه کننده از تشکیل نقطه توسط RBCs در ته خانه‌های میکروپلیت جلوگیری می‌نماید.

این روش غربال کردن فعالیت HA می‌باشد، کشت های سلولی مثبت باید خراشیده شده و رنگ آمیزی شوند و با آنتی بادی های اختصاصی برای تشخیص نهایی باید تایید گردند.

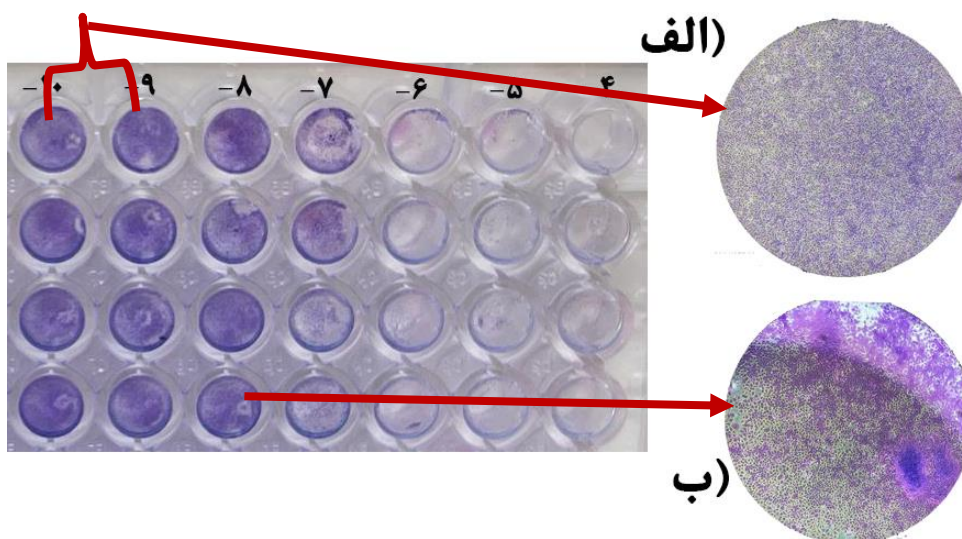
وجود دکمه در ته خانه های پلیت نشانگر منفی بودن کشت سلول است (که موقع سرریز کردن و کج کردن میکروپلیت به صورت قطره اشک درمی آید). نتایج به دست آمده در این تست نشان داد که ویروس فعال و تقریباً با تیتراژ  $\frac{1}{256}$  HA می‌باشد (۵-۱۵).



شکل ۵-۱۵ نتایج تست HA. نتایج نشان داد که ویروس فعال و تقریباً با تیتراژ  $\frac{1}{256}$  می‌باشد؛ وجود دکمه در ته خانه های پلیت نشانگر منفی بودن تست HA (۹- به بعد) است.

#### ۴-۴-۵. نتایج مربوط به تست TCID<sub>50</sub> (تیترو ویروس) قبل از تخلیص و تغلیض ویروس نیوکاسل

دو فلاسکی که به عنوان ذخیره نگهداری شدند به منظور تعیین TCID<sub>50</sub> ویروس واکسن لاسوتا هاروست شده از تخم مرغ مورد استفاده قرار گرفت. سلول‌های فیبروبلاست یک فلاسک تریپسینه شدند. تعداد حدودی سلول‌ها دو میلیون در نظر گرفته شد. به منظور خنثی سازی تریپسین، به میزان ۵۰۰ میکرولیتر سرم به آن اضافه شد و بعد حجم نهایی سلول‌ها با محیط کشت DMEM، به ۱۰ میلی لیتر رسید. در مرحله بعد، داخل هر گوده، ۱۰۰ میکرولیتر از سلول‌های تریپسینه به منظور تعیین TCID<sub>50</sub> کشت داده شد. بعد از ۲۴ ساعت، تمامی چاهک‌ها به میزان یکسان به کانفلوئنسی ۹۰ درصد رسیده بودند. ویروس واکسن لاسوتا با EID<sub>50</sub> ۱۰<sup>۸</sup> با رقت سریالی ۱:۱۰ تا رقت ۱۰<sup>-۱۰</sup> تهیه شد. محیط کشت روی سلول‌ها، تخلیه شد. به میزان ۱۰۰ میکرولیتر درون هر گوده PBS استریل به منظور شستشو و جداسازی سلول‌های مرده و یا نچسبیده اضافه شد. بعد از تخلیه PBS، میزان ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت به صورت چهار تکرار بر روی سلول‌ها تلقیح شد و مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد گذاشته شد. بعد از یک ساعت، مایع رویی سلول‌ها کشیده شده و به هر گوده، ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت DMEM اضافه شد. سپس سلول‌های تلقیح شده با ویروس به منظور مشاهده‌ی اثرات سایتوپاتیک به انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد منتقل شد. نتایج پس از ۲۴ ساعت بررسی شده و نشان داد که تیترو ویروس مورد مطالعه، ۱۰<sup>۸</sup> می باشد (شکل ۵-۱۶).



شکل ۵-۴-۵ نتایج تست TCID50. نتایج نشان داد که تیترو ویروس تقریباً  $10^8$  می‌باشد. کمترین CPE در خانه رقت ۸- مشاهده شد در حالی که تا رقت ۶- تقریباً همه سلول‌ها ریختند؛ (الف) سلول بدون CPE و (ب) سلول با CPE؛ در شکل ب تجمع سلول‌ها و سلول‌های بزرگ شده مشهود می‌باشد.

#### ۵-۴-۵. تخلیص و تغلیض ویروس مورد مطالعه (از طریق عقد قرارداد و برون سپاری به مرکز

ذیصلاح)، نتایج مربوط به تست HA و TCID50 بعد از تخلیص و تغلیض ویروس

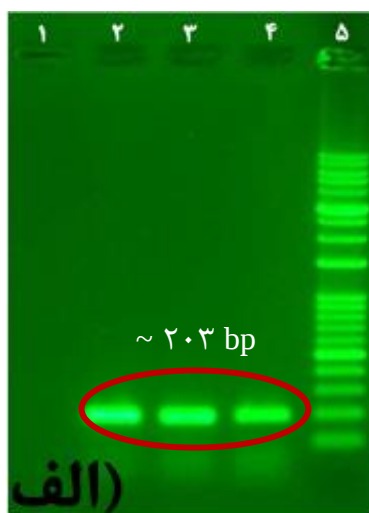
#### نیوکاسل

این مرحله با هدف جداسازی آلبومین و با استفاده از فیلتراسیون جریان مماسی<sup>۱</sup> (TFF) انجام شد؛ ویروس تولیدی در محلول سوکروز-PBS ۵۰ درصد و در دمای ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. نتایج به دست آمده حاصل از تست HA پس از تخلیص و تغلیض ویروس نشان داد که ویروس فعال و تقریباً با تیترو HA  $\frac{1}{128}$  می‌باشد. همچنین تیترو ویروس پس از انجام تست TCID50،  $10^7$  محاسبه شد.

<sup>۱</sup> Tangential flow filtration

## ۶-۴-۵. شناسایی و قطعیت از وجود ویروس

برای این قسمت، پرایمرهای ژن F با استفاده از مقالات، استخراج شد. نتیجه‌ی PCR پس از استخراج از ژل، برای توالی‌یابی ارسال گردید (شکل ۵-۱۷).



TCATCTCTGGAGGGGGGAGACAGGGGCGCCTTATAGG  
CGCCATTATTGGCGGTGTGGCTCTTGGGGTTGCAACT  
GCCGCACAAATAACAGCGGCCGCAGCTCTGATACAAGC  
CAAACAAAATGCTGCCAACATCCTCCGACTTAAAGAGAG  
CATTGCCGCAACCAATGA

ب)

شکل ۵-۱۷ الف) نتایج آزمون PCR؛ ۱) کنترل منفی، ۲) تا ۴) نتیجه PCR بر روی ژن F ویروس نیوکاسل تولید شده و ۵) Ladder 100bp؛ ب) سکانس نتیجه‌ی PCR

فصل ششم:

بحث و نتیجه گیری

## ۱-۶. مروری بر یافته‌های پژوهش

در سال‌های اخیر ویروس درمانی با استفاده از ویروس‌های انکولیتیک به عنوان یک رویکرد درمانی در فاز اول و دوم پروژه ویروس درمانی پژوهشکده معتمد جهاد دانشگاهی تلاش شده است تا ویروس دست‌ورزی نشده نیوکاسل و آدنوویروس انکورین (H101) که بسیار شبیه به ONYX-015 است شبیه‌سازی و در مقیاس آزمایشگاهی تولید شوند.

در این پروژه تاکنون، H101 با حذف هر دو ژن E1B و E3 آدنوویروس نوع ۵ (Ad5) تولید شده است. همچنین ویروس دست‌ورزی نشده نیوکاسل تحت شرایط GMP جهت بررسی‌های بعدی تولید شده است. هر دو ویروس تولید شده، قادر می‌باشند به طور انتخابی سلول‌های تومور را آلوده و از بین می‌برد در حالی که در سلول‌های طبیعی، ویروس فاقد پروتئین E1B برای غیرفعال کردن P53 کارایی ندارد و در نتیجه برای سلول‌های نرمال ایمن است و ادامه ایمنی و کارایی این ویروس در مطالعه پیش بالینی مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

## ۲-۶. بحث

در سال‌های اخیر ویروس درمانی با استفاده از ویروس‌های انکولیتیک به عنوان یک رویکرد درمانی امیدوارکننده برای مبارزه با سرطان پیشنهاد شده است. از انواع ویروس‌های دارای خواص انکولیتیک می‌توان به آدنوویروس‌ها، ویروس هرپس سیمپلکس و ویروس بیماری نیوکاسل اشاره کرد. در میان انواع حامل‌های ویروسی انکولیتیک، آدنوویروس‌های انکولیتیک با قابلیت تکثیر اختصاصی در سلول‌های سرطانی و عدم تاثیر بر روی سلول‌های طبیعی به عنوان عوامل جدیدی برای درمان سرطان توسعه یافته‌اند و کارایی و ایمنی بسیار مناسبی را در آزمایش‌های پیش بالینی و بالینی نشان داده‌اند.

هدف درمان سرطان از بین بردن سلول‌های سرطانی و در عین حال به حداقل رساندن آسیب به سلول‌های طبیعی است که ویژگی‌های انتخابی و ایمنی آن است (۲۵). ویروس بیماری نیوکاسل (NDV)، که دارای ژنوم RNA غیرتکه‌تکه شده، تک رشته‌ای و با سنس منفی است، عضوی از جنس آوولا ویروس، در خانواده

پارامیکسو ویروس‌ها است. سویه های NDV بر اساس بیماری‌زایی در جوجه ها به سه پاتوتیپ اصلی لنتوزنیک، مزوزنیک و ولوزنیک طبقه بندی می شوند. NDV را می توان بر اساس طول ژنوم و توالی ژن F به دو دسته طبقه بندی کرد. ویروس های کلاس I از نظر ژنتیکی تنوع کمتری دارند و کلاس II را می توان بیشتر به ۹ ژنوتیپ تقسیم کرد (۲۶). قبلاً ثابت کرده شده که NDV دارای فعالیت ضد توموری امیدوارکننده با ایمنی بالا در حیوانات آزمایشگاهی است (۲۶). آپوتوز با تعدادی از تغییرات مورفولوژیکی مشخص در ساختار سلول همراه با تعدادی از فرآیندهای بیوشیمیایی وابسته به آنزیم مشخص می شود. عدم توانایی سلول در القای آپوتوز و تجمع سلول های آسیب دیده در بدن می تواند منجر به انواع سرطان شود. بنابراین، درک مسیرها در توسعه درمان های کارآمد مهم است (۲۷). ویروس درمانی انکولیتیک به دو گروه اصلی تقسیم می شود، ویروس های طبیعی وحشی انکولیتیک با تکثیر ترجیحی در سلول های سرطانی انسان و ویروس های اصلاح شده ژنی که برای دستیابی به انکولیز انتخابی مهندسی شده اند (۱۹).

NDV به طور انتخابی در سلول های سرطانی انسان تکثیر می شود و در چندین مسیر سلول های سرطانی مانند گلیکولیز سلول تداخل دارد (۱۴). تکثیر NDV روی سرطان های مختلف انسانی آزمایش شده است (۲۸). هنگامی که NDV یک سلول سرطانی را آلوده می کند، به سرعت تکثیر می شود و سلول های تومور مجاور را از طریق تخلیه ویریون که ۳ ساعت پس از تلقیح قابل توجه هستند، آلوده می کند و پلاک ها در عرض دو روز پس از تلقیح ایجاد می شوند (۲۹). NDV بسیار مورد توجه دانشمندان می باشد زیرا می تواند در سلول های تومور انسانی سریعتر از سلول های طبیعی تکثیر شود و دارای فعالیت انکولیتیک است (۱۹). ویروس بیماری نیوکاسل (NDV) یک ویروس انکولیتیک است که ممکن است همراه با پرتودرمانی برای تقویت درمان در برابر سلول های سرطانی استفاده شود (۳۰). مشخص شده است که عوامل مختلف شیمی درمانی مانند دوکسوروبیسین و ریتوکسیماب را تقویت می کند (۳۱).

در یک تلاش تحقیقاتی مجارستانی، به رهبری Csatory از یک سویه NDV انکولیتیک دامپزشکی استفاده شد. یک کارآزمایی بالینی فاز II کنترل شده با دارونما که شامل ۳۳ بیمار در گروه درمان NDV و ۲۶

بیمار در گروه دارونما بود. بیماران مبتلا به سرطان ریه پیشرفته بودند. مسیر استفاده از ویروس جالب و جدید بود: ویروس از طریق استنشاق به منظور هدف قرار دادن متاستازهای ریه اعمال شد. NDV (۴۰۰۰) واحد در روز) دو بار در هفته به مدت شش ماه استنشاق شد. دوزهای بالای ویروس به خوبی تحمل شد و نتایج بالینی، اگرچه تصادفی نبود، حاکی از کاهش علائم مرتبط با سرطان و بقای بهتر بود. میزان بقای دو ساله در گروه درمان NDV ۲۱ درصد و در گروه دارونما ۰ درصد بود (۳۲).

در مطالعه Freeman و همکاران (۲۰۰۵) از ویروس نیوکاسل تولید شده در بستر تخم مرغ جهت درمان گلیوبلاستوما مولتی فرم استفاده شده است و عوارض جانبی ناخواسته در طول درمان را در بیماران تنها تب گزارش کرده است (۳۳).

در مطالعه‌ای که توسط Dang و همکاران (۲۰۲۲) انجام شده است نشان داده شده که ویروس نیوکاسل استفاده شده به عنوان ناقل اسپایک کروناویروس، با وجود safety بالا، از ایمنی‌زایی بالایی برخوردار بوده و جهت استفاده به عنوان واکسن COVID-19 می‌تواند استفاده شود. با چنین فناوری، واکسن COVID-19 را می‌توان به سرعت و با هزینه کم تولید کرد (۳۴).

در مطالعه‌ای که توسط Schirmacher (۲۰۱۶) بر پایه‌ی ۵۰ سال تحقیقات پایه و بالینی بر روی ویروس ویروس بیماری نیوکاسل، انجام شده است نشان داده شده که این ویروس، دارای خواص ضد نئوپلاستیک و تحریک کننده ایمنی است. همچنین این واقعیت جالب توجه است که این عامل بیولوژیکی باعث مرگ سلولی به واسطه‌ی ایمنی و ایمنی سیستمیک ضد توموری می‌شود. تجربه بالینی نشان دهنده عوارض جانبی کم و ایمنی‌زایی بالا است. این امر به دلیل پاسخ قوی اینترفرون نوع I در پی القا ویروس است. سایر خصوصیات منحصر به فرد ویروسی عدم تعامل با DNA سلول میزبان، عدم وجود نوترکیبی ژنتیکی و تکثیر ویروسی مستقل از تکثیر سلولی است (۲۸).

روش های مختلفی برای دستیابی به تکثیر انتخابی آدنووایروس در سلول های سرطانی مورد استفاده قرار گرفته است. این رویکردها شامل استفاده از پروموتورهای اختصاصی تومور برای بیان ژن E1A و یا حذف ژن E1B است که فعالیت انکولیتیک ویروس را به سلول های تومور با نقص ژن p53 محدود می کند. ONYX-015 اولین وکتور آدنووایروسی بود که در آزمایشات بالینی مورد آزمایش قرار گرفت و خود را به عنوان یک ابزار قابل تحمل، ایمن و عامل درمانی امیدوارکننده در سرطان نشان داد (۳۵).

مطالعات بالینی پتانسیل درمانی این ویروس در درمان انواع تومورها را نشان داده است. یک کارآزمایی بالینی تصادفی چند مرکزی فاز ۳ نشان داد که درمان ترکیبی کارسینوم سلول سنگفرشی سر و گردن و سرطان مری با H101 و شیمی درمانی مبتنی بر فلوئورواوراسیل در مقایسه با شیمی درمانی به تنهایی نرخ پاسخی کلی ۲۷ درصد افزایش یافت. نتایج مربوط به این کارآزمایی باعث شد تا این ویروس توسط سازمان غذا و داروی دولتی چین برای درمان سرطان نازوفارنکس تایید شد (۳۶).

ژن E1b آدنووایروس دو پلی پپتید اصلی ۵۵ کیلو دالتون و ۱۹ کیلو دالتون را کد می کند که هر دو برای ترانسفورماسیون سلول های چوندگان توسط عفونت ویروسی و ترانسفکشن DNA مورد نیاز هستند. پروتئین E1B55K از سلول های آلوده در برابر اثرات p53 ناشی از E1A محافظت می کند. پروتئین E1B55K همچنین انتقال یا تثبیت سیتوپلاسمی mRNA سلول های ویروسی و میزبان را تعدیل می کند (۳۷). پروتئین E1B19K یک همولوگ عملکردی پروتئین سلول Bcl-2 و یک مهارکننده آپوپتوز قوی است. E1B19K از آپوپتوز ناشی از E1A با تداخل در عملکرد پروتئین های پرو آپوپتوز Bak و Bax جلوگیری می کند. اعتقاد بر این است که از طریق عمل این پروتئین های کدگذاری شده توسط ژن E1b، از مرگ زودرس سلولی جلوگیری می شود و تکثیر ویروسی به حداکثر می رسد (۳۸).

حذف ناحیه E1b، از حذف جزئی تا کل ژن (E1b19K و E1b55K) باعث آپوپتوز عمیق تر در مقایسه با نوع وحشی آدنووایروس و ویروس هایی با جهش فقط در E1b55K می شود. با این حال، ویروس حذف شده برای E1b55K و E1b19K هنوز هم می تواند در اکثریت سلول های سرطانی آلوده تکثیر شود که با نتایج ما

در این پروژه هم راستا با این فرضیه بود چرا که ویروس انکورین نه صرفاً در سلول‌های با نقص p53 بلکه در تمامی سلول‌های سرطانی که در این مطالعه استفاده شد قابلیت تکثیر داشت. بنابراین غیرفعال‌سازی p53 و مهار آپوپتوز توسط پروتئین‌های E1B55K و E1B19K در تکثیر ویروس ضروری نیست و این به معناست که پروتئین‌های E1B ممکن است نقش‌های دیگری علاوه بر مهار آپاپتوز داشته باشند (۳۹). در این راستا یک رویکرد مبتنی بر آرایه ژنی در مقیاس بزرگ برای تجزیه و تحلیل بیان ژن‌های سلولی تحت تأثیر ژن E1b استفاده شد. در مجموع ۳۴۵ ژن شناسایی شده است که تغییر بیان آنها در اثر آلودگی با ویروس فاقد E1B دو برابر یا بیشتر از زمان آلودگی با ویروس وحشی بوده است. بنابراین، پروتئین‌های E1B بر بیان طیف متنوعی از ژن‌ها از جمله CDC25A و سیکلین E که در تنظیم چرخه سلولی مهم هستند تأثیر می‌گذارد (۴۰).

تاکنون حداقل سه مکانیسم برای تکثیر ویروس‌های فاقد E1b55K در سلول‌های سرطانی پیشنهاد شده است. فرضیه اصلی این است، از آنجایی که بسیاری از سلول‌های سرطانی فاقد پروتئین عملکردی p53 یا مسیرهای آن هستند، عملکرد E1B55K در مهار p53 به اندازه سلول‌های عادی مهم نیست، و بنابراین، وکتورهای حذف شده با E1b55K می‌توانند به طور انتخابی در سلول‌های سرطانی دارای p53 تکثیر شوند. مکانیسم دوم مبتنی بر این است که سلول‌های سرطانی تمایل به حمایت از انتقال هسته‌ای mRNA‌های دیررس ویروسی در غیاب پروتئین E1B55K دارند و بنابراین امکان تکثیر انکولیتیک وکتورهای حذف شده با E1b55K را فراهم می‌کنند. مکانیسم سوم این است که سلول‌های سرطانی با سیکلین E از تنظیم خارج شده به وکتورهای حذف شده با E1b55K اجازه می‌دهند تا بیان سیکلین E را القا کنند که منجر به تکثیر انکولیتیک در سلول‌های سرطانی می‌شود. به طور کلی پروتئین E1b55K دارای عملکردهای متفاوت است و می‌تواند با اجزای مختلف سلولی اینترکشن نشان دهد که در حال حاضر به طور کامل شناخته نشده است، بنابراین عملکرد ویروس‌های فاقد ژن E1b55K مانند انکورین در سلول‌های سرطانی متفاوت یکسان نخواهد بود و متاثر از ویژگی‌های تومور و نوع سلول سرطانی خواهد بود (۴۱).

### ۳-۶. محدودیت‌ها

- ✓ نبود وکتورهای انکولیتیک در ایران
- ✓ محدودیت خرید مواد در حوزه مهندسی ژنتیک سازه
- ✓ محدودیت در واردات تجهیزات مرتبط با کارهای ویروسی

### ۴-۶. پیشنهادها

از آنجایی که ویروس درمانی مکانیزم‌های مشترک برای از بین بردن سلول‌های سرطانی دارد، این پروژه در صورت پیشرفت و رسیدن به نتایج مناسب می‌تواند جهت درمان دیگر انواع سرطان‌ها مورد بررسی قرار گیرد، با توجه به اینکه انواع مختلفی از بیماری سرطان در سطح جامعه طیف وسیعی سنی را درگیر نموده است لذا جمعیت هدف چشمگیری را جهت درمان دربر خواهد گرفت.

طبیعتاً دستاوردها و موفقیت‌های علمی بازتاب جهانی وسیعی را در پی خواهد داشت و این گونه پیشرفت‌هایی که نتیجه آن به صورت عینی برای عموم قابل لمس باشد تاثیر قابل توجهی در بالا بردن غرور ملی دارند. هر عاملی که برای کشور موفقیت و درخششی در سطح بین‌المللی در پی داشته باشد تاثیر مستقیمی بر تقویت امنیت ملی دارد و به طور کلی می‌توان گفت:

- ✓ ایجاد زیر ساخت‌های درمانی در حوزه نگهداری، کشت و بانک ویروس
- ✓ بی‌نیازی کشور به دیگر کشورها در این حوزه درمانی
- ✓ بالا رفتن توان درمانی کشور و توسعه قابلیت درمانی برای کشورهای دوست و هم‌راستا
- ✓ دسترسی به مرز دانش در این حوزه
- ✓ کاهش خروج ارز و در عین حال ارز آوری برای کشور
- ✓ بالا بردن غرور ملی و خودکفایی

لذا، پیشنهاد می‌شود که به دلیل آماده‌سازی کلیه‌ی زیرساخت‌های مورد نیاز برای ویروس‌درمانی ذیل این پروژه در پژوهشکده سرطان معتمد، کلیه پروژه‌های ویروس‌درمانی با وسعت بیشتر با محوریت این پژوهشکده و زیرنظر اساتید این حوزه انجام پذیرد.

## **۵-۶. نتیجه گیری**

از نتایج به دست آمده در این پروژه، فناوری تولید H101 با حذف هر دو ژن E1B و E3 آدنوویروس نوع ۵ (Ad5) و نیز ویروس دست‌ورزی نشده نیوکاسل تحت شرایط GMP حاصل شد. لازم به ذکر است هر دو ویروس تولید شده، قادر می‌باشند به طور انتخابی سلول‌های تومور را آلوده و از بین می‌برد در حالی که در سلول‌های طبیعی، ویروس فاقد پروتئین E1B برای غیرفعال کردن P53 کارایی ندارد و در نتیجه برای سلول‌های نرمال ایمن است.

## **۶-۶. برنامه های آینده جهت ادامه پروژه**

مهندسی ژنتیک و تولید نیمه‌صنعتی ویروس آدنوی دست‌ورزی شده (انکورین) با قابلیت تکثیر اختصاصی در سلول-

های سرطانی به منظور ژن‌درمانی و ویروس درمانی سرطان‌های صعب‌العلاج

- ادامه فاز دوم: ارزیابی ایمنی و کارایی ویروس دست‌ورزی شده انکورین در مطالعه پیش بالینی
- فاز سوم: تولید ویروس انکولیتیک تحت استاندارد GMP و انجام کارآزمایی های بالینی فاز صفر و یک
- کسب دانش فنی ویروس درمانی در درمان سرطان های صعب‌العلاج با استفاده از ویروس انکولایتیک نیوکاسل
- ادامه فاز سه مطالعه: جهت تایید ویروس نیوکاسل تولیدی تحت شرایط GMP و کارآزمایی بالینی فاز

صفر

## منابع

1. Mondal M, Guo J, He P, Zhou D. Recent advances of oncolytic virus in cancer therapy. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2020;16(10):2389-402.
2. Dennert G, Horneber M. Selenium for alleviating the side effects of chemotherapy, radiotherapy and surgery in cancer patients. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2006(3).
3. Kaufman HL, Kohlhapp FJ, Zloza A. Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. *Nature reviews Drug discovery*. 2015;14(9):642-62.
4. Zeyauallah M, Patro M, Ahmad I, Ibraheem K, Sultan P, Nehal M, et al. Oncolytic viruses in the treatment of cancer: a review of current strategies. *Pathology & Oncology Research*. 2012;18:771-81.
5. Maroun J, Muñoz-Alía M, Ammayappan A, Schulze A, Peng K-W, Russell S. Designing and building oncolytic viruses. *Future virology*. 2017;12(4):193-213.
6. Baker AT, Aguirre-Hernández C, Halldén G, Parker AL. Designer oncolytic adenovirus: coming of age. *Cancers*. 2018;10(6):201.
7. Liu T-C, Hallden G, Wang Y, Brooks G, Francis J, Lemoine N, et al. An E1B-19 kDa gene deletion mutant adenovirus demonstrates tumor necrosis factor-enhanced cancer selectivity and enhanced oncolytic potency. *Molecular therapy*. 2004;9(6):786-803.
8. Ulasov I, Borovjagin A, Schroeder B, Baryshnikov A. Oncolytic adenoviruses: a thorny path to glioma cure. *Genes & diseases*. 2014;1(2):214-26.
9. Goradel NH, Mohajel N, Malekshahi ZV, Jahangiri S, Najafi M, Farhood B, et al. Oncolytic adenovirus: A tool for cancer therapy in combination with other therapeutic approaches. *Journal of cellular physiology*. 2019;234(6):8636-46.
10. Bischoff JR, Kirn DH, Williams A, Heise C, Horn S, Muna M, et al. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science*. 1996;274(5286):373-6.
11. Kirn D. Oncolytic virotherapy for cancer with the adenovirus dl1520 (Onyx-015): results of phase I and II trials. *Expert opinion on biological therapy*. 2001;1(3):525-38.
12. Goodrum FD, Ornelles DA. p53 status does not determine outcome of E1B 55-kilodalton mutant adenovirus lytic infection. *Journal of virology*. 1998;72(12):9479-90.
13. Rothmann T, Hengstermann A, Whitaker NJ, Scheffner M, zur Hausen H. Replication of ONYX-015, a potential anticancer adenovirus, is independent of p53 status in tumor cells. *Journal of virology*. 1998;72(12):9470-8.
14. Fulber JP, Kamen AAJV. Development and Scalable Production of Newcastle Disease Virus-Vectored Vaccines for Human and Veterinary Use. 2022;14(5):975.
15. Fournier P, Schirmacher VJB. Oncolytic Newcastle disease virus as cutting edge between tumor and host. 2013;2(3):936-75.
16. Danhauer SC, Canzona M, Tucker-Seeley RD, Reeve BB, Nightingale CL, Howard DS, et al. Stakeholder-informed conceptual framework for financial burden among adolescents and young adults with cancer. 2022;31(4):597-605.
17. Walter RJ, Attar BM, Rafiq A, Tejaswi S, Delimata MJJP. Newcastle disease virus LaSota strain kills human pancreatic cancer cells in vitro with high selectivity. 2012;13(1):45-53.
18. Su Q, Li Y, Zhang Y, Zhang Z, Meng F, Cui Z, et al. Newcastle disease virus-attenuated vaccine LaSota played a key role in the pathogenicity of contaminated exogenous virus. 2018;49(1):1-11.

19. Lam HY, Yeap SK, Rasoli M, Omar AR, Yusoff K, Suraini AA, et al. Safety and clinical usage of Newcastle disease virus in cancer therapy. 2011;2011.
20. Ayala AJ, Dimitrov KM, Becker CR, Goraichuk IV, Arns CW, Bolotin VI, et al. Presence of vaccine-derived Newcastle disease viruses in wild birds. 2016;11(9):e0162484.
21. Liang M. Oncorine, the world first oncolytic virus medicine and its update in China. Current cancer drug targets. 2018;18(2):171-6.
22. Xia Z-J, Chang J-H, Zhang L, Jiang W-Q, Guan Z-Z, Liu J-W, et al. Phase III randomized clinical trial of intratumoral injection of E1B gene-deleted adenovirus (H101) combined with cisplatin-based chemotherapy in treating squamous cell cancer of head and neck or esophagus. Ai zheng= Aizheng= Chinese journal of cancer. 2004;23(12):1666-70.
23. Lin X-j, Li Q-j, Lao X-m, Yang H, Li S-p. Transarterial injection of recombinant human type-5 adenovirus H101 in combination with transarterial chemoembolization (TACE) improves overall and progressive-free survival in unresectable hepatocellular carcinoma (HCC). BMC cancer. 2015;15(1):1-9.
24. Santry LA, McAusland TM, Susta L, Wood GA, Major PP, Petrik JJ, et al. Production and purification of high-titer Newcastle disease virus for use in preclinical mouse models of cancer. 2018;9:181-91.
25. Adil BH, Al-Shammari AM, Murbat HHJCPM. Breast cancer treatment using cold atmospheric plasma generated by the FE-DBD scheme. 2020;19:100103.
26. Al-Shammari AM, Hamad MA, AL-Mudhafar MA, Raad K, Ahmed AJVM, Science. Clinical, molecular and cytopathological characterization of a Newcastle disease virus from an outbreak in Baghdad, Iraq. 2020;6(3):477-84.
27. S Mohammed M, Al-Taeef MF, Al-Shammari AJJoM, Medicine C. Caspase dependent and independent anti-hematological malignancy activity of AMHA1 attenuated newcastle disease virus. 2019;8(3):211-22.
28. Schirmacher VJB. Fifty years of clinical application of Newcastle disease virus: time to celebrate! 2016;4(3):16.
29. Elankumaran S, Chavan V, Qiao D, Shobana R, Moorkanat G, Biswas M, et al. Type I interferon-sensitive recombinant newcastle disease virus for oncolytic virotherapy. 2010;84(8):3835-44.
30. Vijayakumar G, Palese P, Goff PHJE. Oncolytic Newcastle disease virus expressing a checkpoint inhibitor as a radioenhancing agent for murine melanoma. 2019;49:96-105.
31. Al-Shammari AM, Rameez H, Al-Taeef MFJOv. Newcastle disease virus, rituximab, and doxorubicin combination as anti-hematological malignancy therapy. 2016;5:27.
32. Csatory L, Eckhardt S, Bukosza I, Czegledi F, Fenyvesi C, Gergely P, et al. Attenuated veterinary virus vaccine for the treatment of cancer. 1993;17(6):619-27.
33. Freeman AI, Zakay-Rones Z, Gomori JM, Linetsky E, Rasooly L, Greenbaum E, et al. Phase I/II trial of intravenous NDV-HUJ oncolytic virus in recurrent glioblastoma multiforme. 2006;13(1):221-8.
34. Dang AD, Vu TD, Vu HH, Van Pham AT, Dang MTN, Van Le B, et al. Safety and immunogenicity of an egg-based inactivated Newcastle disease virus vaccine expressing SARS-CoV-2 spike: Interim results of a randomized, placebo-controlled, phase 1/2 trial in Vietnam. 2022.
35. Van den Heuvel S, Van Laar T, Kast W, Melief C, Zantema A, Van der Eb A. Association between the cellular p53 and the adenovirus 5 E1B-55kd proteins reduces the oncogenicity of Ad-transformed cells. The EMBO Journal. 1990;9(8):2621-9.

36. Yu W, Fang H. Clinical trials with oncolytic adenovirus in China. *Current cancer drug targets*. 2007;7(2):141-8.
37. Barker DD, Berk AJ. Adenovirus proteins from both E1B reading frames are required for transformation of rodent cells by viral infection and DNA transfection. *Virology*. 1987;156(1):107-21.
38. Rao L, Debbas M, Sabbatini P, Hockenbery D, Korsmeyer S, White E. The adenovirus E1A proteins induce apoptosis, which is inhibited by the E1B 19-kDa and Bcl-2 proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992;89(16):7742-6.
39. Rao X-M, Tseng MT, Zheng X, Dong Y, Jamshidi-Parsian A, Thompson TC, et al. E1A-induced apoptosis does not prevent replication of adenoviruses with deletion of E1b in majority of infected cancer cells. *Cancer gene therapy*. 2004;11(9):585-93.
40. Rao X-M, Zheng X, Waigel S, Zacharias W, McMasters KM, Zhou HS. Gene expression profiles of normal human lung cells affected by adenoviral E1B. *Virology*. 2006;350(2):418-28.
41. Cheng P-H, Wechman SL, McMasters KM, Zhou HS. Oncolytic replication of E1b-deleted adenoviruses. *Viruses*. 2015;7(11):5767-79.

## **Abstract**

Despite significant advances in cancer prevention, diagnosis and treatment, cancer is still one of the most important causes of human mortality. The slowness of the cancer treatment process on the one hand and the inefficiency of common treatment methods and the harmful side effects of these treatments on the other hand doubles the need to find new, targeted, efficient technological treatments with less side effects. These new treatment approaches include cell therapy, virus therapy and gene therapy, which are classified in the field of advanced therapeutic products (ATMP). Cancer virus therapy uses viruses that have the ability to destroy cancer cells and stimulate the immune system against the tumor. In the upcoming project, two viral treatment methods are used; Natural viruses (Newcastle virus) and recombinant viruses (adenovirus) that are made by genetic engineering. Newcastle virus is a single-stranded RNA virus whose natural host is birds. The growth rate of this virus in mammalian cancer cells is 10 thousand times that of normal cells. Adenovirus type 5 genetically engineered under the trade name Encorin is currently licensed in China for the treatment of lung and head and neck cancer. The mechanism of action of these viruses is in a way that specifically infects and destroys cancer cells, and the contamination of normal cells is low.

In this project, after producing the mentioned viruses with GMP quality, their safety and effectiveness in cancer treatment will be investigated during clinical trials.

This study is the first clinical experience of viral therapy in Iran, and if it is successful, an important step will be taken towards self-sufficiency and preventing the withdrawal of foreign currency for the purpose of treatment.

**Keywords:** virotherapy, adenovirus, Newcastle virus, oncolytic viruses



## **Report (1)**

**Acquisition of technical knowledge and development of virus therapy and gene therapy technology for advanced cancers**

**Code:**

**Ref. No. of Research Ethics Committee:**

**Principal Investigator (BY):**

Ramin Sarrami Forooshani

**Name of Research Institute:**

Motamed Cancer Institute

**Research group:**

Advanced Therapeutic Medicinal Products Department

**Date:** August 2023