

گزارش کار پروژه ویروس درمانی (بخش ویروس نیوکاسل)

فاز دو مطالعه: فاز پیش‌بالینی ویروس نیوکاسل

۱) تخلیص و تغلیض ویروس مورد مطالعه (از طریق عقد قرارداد و برون سپاری به مراکز ذیصلاح): این

مرحله با هدف افزایش تیتراژ ویروس مورد استفاده و در صورت نیاز، جداسازی آلبومین، با استفاده از سیستم فیلتراسیون TFF^۱ انجام شد. در نهایت محصول ویروسی تخلیص و تغلیض شده برای انجام مراحل بعدی پروژه در اختیار قرار گرفت.

روش سنتی فیلتراسیون، که به عنوان فیلتراسیون جریان مستقیم یا فیلتراسیون بن بست شناخته می‌شود، شامل جریان عمودی نمونه از طریق غشا است که به مولکول‌های کوچک اجازه عبور و جدا شدن را می‌دهد. با این حال، این روش دارای یک اشکال است زیرا ماکرومولکول‌ها می‌توانند روی سطح غشاء جمع شوند و با افزایش زمان فیلتراسیون، لایه ضخیم‌تر می‌شود که منجر به کاهش راندمان فیلتراسیون و طول عمر کوتاه تر غشاء می‌شود.

در مقابل، فیلتراسیون جریان مماسی با حرکت جریان نمونه به صورت افقی در سطح غشاء با زاویه مماسی عمل می‌کند. جریان نمونه به طور مداوم فیلتر می‌شود و سطح غشاء را در حین گردش آن شستشو می‌دهد و از تجمع ماکرومولکول‌ها جلوگیری می‌کند و قطبش غلظت ناشی از کاهش نرخ جریان را کاهش می‌دهد. این یک نرخ جریان پایدار را تضمین می‌کند و به طور موثر طول عمر غشای فیلتر را افزایش می‌دهد.

فیلتراسیون جریان مماسی مزایای بیشتری را ارائه می‌دهد زیرا امکان تغلیض و تخلیص را به طور همزمان فراهم می‌کند. علاوه بر این، پارامترهای مورد استفاده در تجهیزات در سطح آزمایشی و سطح تولید منسجم هستند و افزایش مقیاس را آسان می‌کنند.

با توجه به این مزایا، فیلتراسیون جریان مماسی به طور فزاینده‌ای نسبت به فیلتراسیون سنتی در زمینه‌های بیوتکنولوژی و مرتبط با زیست پزشکی، مانند بیمارستان‌ها و صنعت داروسازی ترجیح داده می‌شود.

۲) بررسی ایمن بودن ویروس تولید شده: جهت بررسی ایمنی ویروس تولید شده بررسی زیر عمل شد.

✓ تزریق داخل صفاقی ویروس به موش: ویروس نیوکاسل با دوز 10^8 به ده عدد موش تزریق شد و زنده‌مانی موش‌ها به مدت یک ماه مورد بررسی قرار گرفت. هیچ تغییری در کیفیت سلامت و طول عمر موش‌ها نسبت به موش‌های گروه کنترل در مدت یک ماه مشاهده نگردید.

۳) مرحله سترونی (Sterility): جهت تحقق این هدف، اقدامات زیر باید انجام شد.

✓ تست باکتری

✓ تست قارچ

✓ تست آلودگی متقاطع با ویروس‌های شایع تخم‌مرغ مانند برونشیت، انفلوانزا و ...

✓ تست بررسی اندوتوکسین

✓ بررسی آلودگی میکوپلاسمایی

¹ Tangential Flow Filtration

تست‌های مذکور از طریق انعقاد قرارداد همکاری و حفظ محرمانگی با آزمایشگاه مورد تایید آزمایشگاه مرجع سلامت، انجام شد. کلیه‌ی تست‌های فوق منفی شدند.

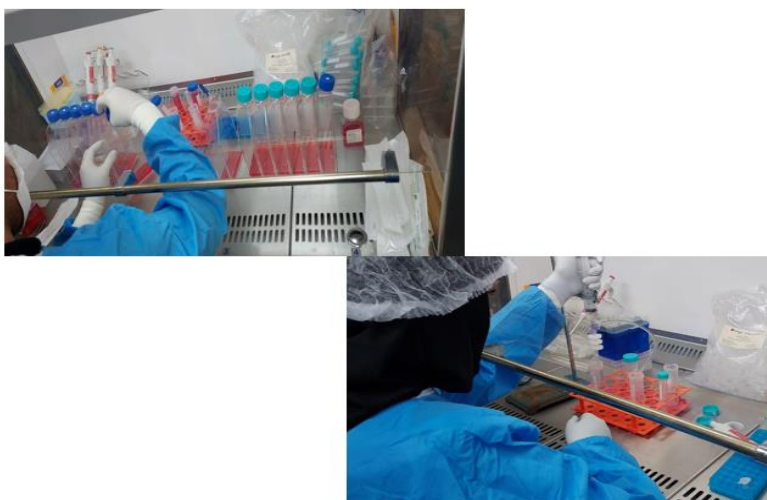
گزارش کار پروژه ویروس درمانی (بخش انکورین)

- فاز دوم : مطالعه پیش بالینی به منظور ارزیابی بررسی ایمنی و کارایی آدنووایروس انکورین

در فاز اول ویروس انکورین تولید شد و پس از تایید هویت ویروس و مشابهت آن با ویروس انکورین، کارایی و ایمنی آن در این مطالعه بررسی شد. در مطالعه پیش بالینی ابتدا ایمنی و سمیت آدنووایروس انکولیتیک (H101) در مدل های حیوانی سالم از طریق تزریق زیرجلدی (یا درون ماهیچه‌ای) و داخل وریدی بررسی شد. برای انجام این مطالعه مطابق با مطالعات قبلی مدل های حیوانی شامل موش BALB/c، رت و خوکچه هندی که در حیوان‌خانه پژوهشکده معتمد جهاد دانشگاهی نگهداری می شوند مورد استفاده قرار گرفتند.

در کارآزمایی بالینی ویروس انکورین بر روی بیماران مبتلا به سرطان سر و گردن و ... ویروس به صورت داخل توموری تزریق شد. بنابراین برای بررسی سمیت ویروس در اثر ورود به جریان خون، ویروس به صورت سیستمیک (معمولاً رگ خونی دم) به موش های BALB/C تزریق شد. به طور کلی به دلیل پذیرش و تکثیر محدود آدنووایروس در تمامی گونه های جانوری از جمله جوندگان مدل حیوانی مطلوبی برای تست‌های کارایی و سمیت ناقل‌های آدنووایروسی وجود ندارد. با این وجود و براساس استانداردهای GLP خوکچه و رت به دلیل پذیرش و تکثیر بهتر و کتورهای آدنووایروسی مدل مناسب‌تری برای ارزیابی سمیت آدنووایروس می باشند.

برای بررسی اثر ویروس تولید شده بر روی گونه های حیوانی، ابتدا ویروس در فلاسک های T175 کشت داده شد (۱۵ فلاسک) و سپس از طریق کیت خالص سازی Add-N-Pure™ Adenovirus Purification Kit ویروس تخلیص شد. (شکل یک)



شکل ۱: خالص سازی ویروس انکورین در آزمایشگاه BSL3 پژوهشکده معتمد جهاد دانشگاهی

پس از خالص سازی ویروس، با دو روش TCID50 و qPCR تیترا نهایی ویروس تعیین شد. تیترا ویروس خالص شده 5×10^{10} vp/mL تخمین زده شد.

برای بررسی سمیت آدنوویروس انکولیتیک بر اساس مطالعات قبلی از سه گونه موش BALB/C، رت و خوکچه استفاده خواهد شد. (برای رعایت اصول اخلاقی از حداقل تعداد حیوان آزمایشگاهی برای ارزیابی های مختلف استفاده خواهد شد.) بر اساس نوع مطالعه از مدل حیوانی مختلف استفاده خواهد شد که جزئیات آن در مورد نوع مطالعه، نحوه تزریق، مدل حیوانی و تعداد حیوان در هر گروه به تفصیل در پروپوزال تهیه شده برای کمیته اخلاق ارائه شده است. نوع حیوان آزمایشگاهی، تعداد تزریق، نحوه تزریق، چگونگی مانیتورینگ همگی بر اساس مطالعات قبلی تعیین شده است. (Liang, 2018)(Su et al., 2008)(Schenk et al., 2014)(Paielli et al., 2000)

۱- در حال حاضر بخش اول این مطالعه به منظور بررسی اثر فارماکولوژیک ویروس H101 بر روی سیستم عصبی انجام شده است.

- بر اساس مطالعات قبلی مدل حیوان برای ارزیابی سمیت ویروس بر روی سیستم عصبی موش است. بنابراین در این تست از موش های BALB/c ۶ تا ۸ هفته ای استفاده خواهد شد.
- ویروس با سه دوز مختلف به سه گروه موشی تزریق خواهد شد و به گروه کنترل PBS یا بافر ذخیره سازی ویروس (GTS) تزریق می شود.
- حداکثر حجم تزریق ۱۰۰ میکرولیتر خواهد بود.
- سه دوز تزریق ویروس شامل 5.0×10^{10} vp/kg, 1.0×10^{11} vp/kg, or 2.0×10^{11} vp/kg خواهد بود.
- تزریق به صورت داخل وریدی از ناحیه دم انجام خواهد شد.
- نحوه مانیتورینگ، گروه بندی و تعداد موش در هر گروه در جدول زیر گفته شده است.

تعداد موش و روز قربانی کردن آنها جهت مانیتورینگ		مانیتورینگ	تعداد موش و دفعات تزریق	دوز تزریق	نام گروه
تعداد موش	روز				
۳	۱	توزیع بافتی (مغز، کبد، قلب و ریه)، تست های بیوشیمیایی، هیستوپاتولوژی و علایم عصبی روزانه	۱/۱۲	5.0×10^10 vp/kg	گروه های تست
۳	۴				
۳	۱۰				
۳	۳۰				
۳	۱	توزیع بافتی (مغز، کبد، قلب و ریه)، تست های بیوشیمیایی، هیستوپاتولوژی و علایم عصبی روزانه	۱/۱۲	1.0×10^11 vp/kg	
۳	۴				
۳	۱۰				
۳	۳۰				
۳	۱	توزیع بافتی (مغز، کبد، قلب و ریه)، تست های بیوشیمیایی، هیستوپاتولوژی و علایم عصبی روزانه	۱/۱۲	2.0×10^11 vp/kg	
۳	۴				
۳	۱۰				
۳	۳۰				
۱	۱	توزیع بافتی (مغز، کبد، قلب و ریه)، تست های بیوشیمیایی، هیستوپاتولوژی و علایم عصبی روزانه	۱/۶	PBS/Storage buffer	گروه کنترل
۲	۴				
۲	۱۰				
۲	۳۰				

همانطور که در جدول نیز ذکر شده است در روز ۱، ۴، ۱۰ و ۳۰ سه موش از هر گروه تست و یک موش از گروه های کنترل جهت جداسازی بافت های مختلف برای انجام تست های پاتولوژی و بررسی توزیع بافتی قربانی شدند ولی قبل از آن به منظور انجام تست های بیوشیمیایی از هر موش خونگیری انجام گرفت.

برای بررسی تغییرات بیوشیمیایی بر اثر تزریق ویروس فاکتورهای بیوشیمیایی شامل ALT, AST, LDH, ALP, ALB, N و K توسط آزمایشگاه پاتوبیولوژی ونک اندازه گیری شد و برای بررسی تغییرات پاتولوژی، بافت های کبد، قلب، ریه، مغز و طحال جداسازی و در فرمالین نگهداری شد و در حال حاضر بافت های استخراج شده در اختیار مرکز پاتوبیولوژی کلینیک ابوریحان جهاد دانشگاهی است. نتایج مربوط به بررسی فاکتورهای بیوشیمیایی تحویل گرفته شده است ولی آنالیز مربوط به آن تا الان انجام نشده است.

از نظر شوک عصبی و زنده مانی تزریق داخل وریدی ویروس هیچ تاثیری بر روی موش های BALB/c نداشت.

- ست‌آپ فرایند پایین دستی تولید آدنووایروس انکولیتیک (این فرایند در دیپارتمان تحقیق و توسعه شرکت همکار طرف قرارداد با پژوهشکده معتمد در حال انجام است.)

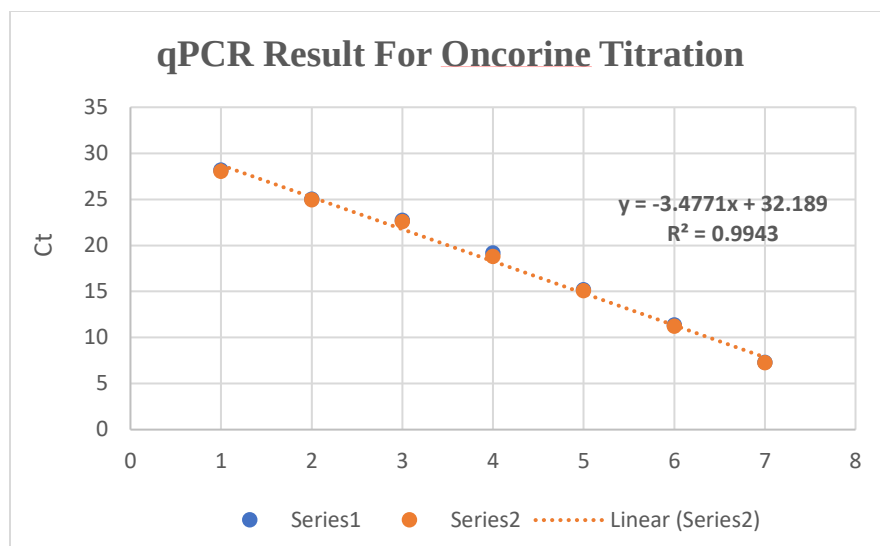
برای انجام کارآزمایی بالینی توسط ویروس تولید شده می بایست ویروس طبق استانداردهای GMP تهیه شود که مراحل پایین دستی آن شامل مراحل متعددی است که هر مرحله نیازمند بهینه سازی برای تولید ویروس با تیتراژ بالا دارد که این مراحل عبارتند از:

- لیز سلول با روش شیمیایی
- رسوب DNA از طریق دومیفن بروماید
- سانتریفوژ یا عبور از فیلتر ۰٫۴
- TFF اولیه
- کروماتوگرافی تعویض یونی (FPLC)
- TFF ثانویه (تعویض بافر)
- فیلتراسیون ۰٫۲ (استریلیزاسیون)

بر اساس تصمیم مجری پروژه (جناب آقای دکتر صرامی) قرار است تا قبل از خرید و نصب دستگاه های لازم برای انجام مراحل پایین دستی در پژوهشکده این فرآیند طبق یک قرارداد انتقال تکنولوژی در مجموعه R&D شرکت داروسازی همکار ست‌آپ شود.

در این راستا و طبق هماهنگی های انجام شده با شرکت همکار، هر بار چهار فلاسک T175 کشت داده می شود که سه فلاسک به مرکز R&D شرکت همکار فرستاده می شود و یک فلاسک به عنوان فلاسک کنترل در پژوهشکده از طریق فریزر-تاو لیز می شود تا تیتراژ آن با تیتراژ ویروس حاصل از لیز شیمیایی مقایسه شود. تا کنون چهار مرحله ابتدایی این فرآیند با کارایی بالا ست‌آپ شده است که نتایج آن در ادامه نشان داده شده است و هم اکنون مرحله کروماتوگرافی در حال بهینه سازی است.

از آنجایی که ممکن است در هر مرحله از فرایند پایین دستی مقدار زیادی از ویروس در اثر عدم لیز مناسب، رسوب همراه با DNA میزبان، عدم اتصال به ستون کروماتوگرافی و یا ... از دست برود از هر مرحله از فرایند پایین دستی نمونه تهیه و تیتراژ آن با روش qPCR تعیین می گردد. برای تخمین تیتراژ ویروس با این روش ابتدا توسط پلاسמיד منحنی استاندارد رسم و سپس تیتراژ ویروس تخمین زده می شود.



منحنی استاندارد که توسط qPCR بر روی سریال دایلوژن پلاسמיד دارنده توالی هگزون آدنووایروس تهیه شده است.

plasmid dilution	Ct		plasmid copy / μ l
10^{-8}	28.2	28.05	5×10^2
10^{-7}	25.03	24.95	5×10^3
10^{-6}	22.74	22.6	5×10^4
10^{-5}	19.2	18.8	5×10^5
10^{-4}	15.2	15.08	5×10^6
10^{-3}	11.35	11.23	5×10^7
10^{-2}	7.3	7.25	5×10^8
Freeze- thaw	9.8	9.88	10^{11}
sample 2 (after lysis)	11.3	11.26	2×10^{10}
sample 3 (after DNA precipitation)	11.3	12	2×10^{10}
sample 4 (after filtration)	11.45	11.9	2×10^{10}
sample 5 (after TFF)	11.9	12.3	2×10^{10}

همانطور که در جدول فوق مشخص است مقدار ویروس نمونه های به دست آمده از چهار مرحله ابتدایی فرایند پایین دستی تغییر محسوسی مشاهده نشد که نشان دهنده بهینه شدن این مراحل بعد از چند مرحله آزمون و خطاست.

Liang, M. (2018) 'Oncorine, the world first oncolytic virus medicine and its update in China', *Current cancer drug targets*, 18(2), pp. 171–176.

Paielli, D. L. *et al.* (2000) 'Evaluation of the biodistribution, persistence, toxicity, and potential of germ-line transmission of a replication-competent human adenovirus following intraprostatic administration in the mouse', *Molecular Therapy*, 1(3), pp. 263–274.

Schenk, E. *et al.* (2014) 'Preclinical safety assessment of Ad [I/PPT-E1A], a novel oncolytic adenovirus for prostate cancer', *Human Gene Therapy Clinical Development*, 25(1), pp. 7–15.

Su, C. *et al.* (2008) 'Toxicology profiles of a novel p53-armed replication-competent oncolytic adenovirus in rodents, felids, and nonhuman primates', *Toxicological sciences*, 106(1), pp. 242–250.