

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 طرح در	تخصص	وابستگی سازمانی	جمع کل نفر ساعت همکاری در طرح
دکتر رامین صرامی فروشانی	مجری طرح	فوق دکترا	رئیس پژوهشکده سرطان معتمد	44
مریم کدخدازاده برزکی	همکار طرح	دکتری تخصصی	عضو هیئت علمی پژوهشکده سرطان معتمد	30
دکتر مریم فاضلی	همکار طرح	دکتری تخصصی	عضو هیئت علمی پژوهشکده سرطان معتمد	14
دکتر زهراالسادات هاشمی	همکار طرح	دکتری تخصصی	عضو هیئت علمی پژوهشکده سرطان معتمد	14
دکتر مهدی مهدوی	همکار طرح	دکتری تخصصی	عضو هیئت علمی پژوهشکده سرطان معتمد	14
مهدیه شکراللهی	همکار طرح	کارشناسی ارشد	کارشناس پژوهشی پژوهشکده سرطان معتمد	14
فاطمه سلیمیان	همکار طرح	کارشناسی ارشد	کارشناس پژوهشی پژوهشکده سرطان معتمد	14
حسن صنعتی	همکار طرح	کارشناسی ارشد	کارشناس پژوهشی پژوهشکده سرطان معتمد	14
زینب ظریف منش	همکار طرح	کارشناسی ارشد	کارشناس پژوهشی پژوهشکده سرطان معتمد	30

چکیده فارسی

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 قرار بر اینست تا یک آدنوویروس مهندسی شده مشابه با ویروس انکورین (H101) ساخته شود و برای ویروس درمانی بیماران مبتلا به سرطان های توپر با اولویت سرطان سرو گردن استفاده شود. آدنوویروس تیپ ۵ مهندسی ژنتیک شده با عنوان تجاری انکورین در حال حاضر در کشور چین دارای مجوز درمان برای سرطان سر و گردن است. هدف از این پروژه، طراحی، دستورزی و تولید آدنوویروس 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.

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 ویروس انکورین با استفاده از وکتور آدنوویروسی غیرتکثیرشونده 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.

در نهایت، ویروس انکورین در مقیاس نیمه صنعتی تحت استانداردهای قابل قبول برای مراجع نظارتی 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، انکولایتیک ویروس ها، انکورین

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول: کلیات پژوهش.....	۳
مقدمه و بیان مسئله.....	۴
تعاریف مفاهیم.....	۷
فصل دوم: مبانی نظری و پیشینه پژوهش.....	۱۲
فصل سوم: اهداف.....	۱۸
فصل چهارم: روش پژوهش.....	۲۰
نوع مطالعه.....	۲۱
جمعیت (واحد) مطالعه.....	۲۱
مکان و زمان مطالعه.....	۲۱
حجم نمونه.....	۲۱
روش نمونه‌گیری.....	۲۲
روش اجرا.....	۲۲
روش تجزیه و تحلیل.....	۴۱
ملاحظات اخلاقی طبق راهنماهای عمومی و اختصاصی اخلاق در پژوهش.....	۴۱
فصل پنجم: یافته‌های پژوهش.....	۴۳
فصل ششم: بحث و نتیجه‌گیری.....	۶۳
مروری بر یافته‌های پژوهش.....	۶۴
بحث.....	۶۴
محدودیت‌ها.....	۶۹
پیشنهادهای.....	۶۹
نتیجه‌گیری.....	۷۰
منابع.....	۷۱
چکیده انگلیسی.....	۷۴

فصل اول:

کلیات پژوهش

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 سرطان ها، سلول های توموری نسبت به داروهای شیمی درمانی مقاومت نشان می‌دهند (۲).

برای غلبه بر مشکلات حاصل از درمان‌های رایج سرطان، از راهکارهایی مثل ژن درمانی، درمان های بیولوژیک و ایمونولوژیک (ایمونوتراپی) و ویروس درمانی استفاده می شود که در پی موفقیت در ایمونوتراپی مدرن، ویروس های انکولیتیک یا ویروس های لیزکننده سرطان در حال حاضر به عنوان یک گزینه درمانی بالقوه برای بیماران مبتلا به سرطان که پاسخ ایمنی در برابر تومور ایجاد نمی کنند یا در رسیدن به پاسخ های بادوام پس از درمان با مهار کننده های رشد و تکثیر سلول های سرطانی ناتوان هستند مطرح می باشند (۳).

اصطلاح "ویروس‌های لیزکننده سرطان" برای ویروس‌هایی به کار می‌رود که قادرند به طور ویژه در درون سلول های سرطانی تکثیر و آنها را تخریب کنند و از سوی دیگر اثر ناچیزی بر سلول های طبیعی داشته باشند که این توانایی می تواند به طور وراثتی با ویروس ها همراه باشد و یا به واسطه مهندسی ژنتیک در آن ها ایجاد شود. استفاده از ویروس‌ها جهت درمان سرطان به قبل از دهه ۱۹۵۰ بر می‌گردد و تا به امروز گستره‌ای از ویروس ها در انسان و حیوانات مختلف شناخته شده اند که کارایی ضد توموری آنها و اختصاصیتشان به سرطان و همچنین ایمن بودن آنها مورد آزمایش قرار گرفته است. از این ویروس‌ها می توان به آدنوویروس‌ها، ویروس هرپس

سیمپلکس، سرخک، رئو ویروس، لنتی ویروس، پاروویروس، ویروس استوماتیت وزیکولار، ویروس اوریون، ویروس بیماری آبله، ویروس واکسینیا، پارامیکسو ویروس ها اشاره کرد (۱).

از این ویروس ها هم به شکل دست نخورده و هم با دستکاری های ژنتیکی جهت درمان سرطان استفاده می شود. ویروس های انکولیتیک نسبت به داروهای شیمی درمانی متداول دارای مزایای زیادی می باشند از جمله داشتن سینرژی با اکثر روش های درمانی، توانایی کشتن سلول های بنیادی سرطانی^۱، فارماکوکنتیک منحصر به فرد و ایجاد تغییرات دلخواه در آنها بر اساس نتایج مطالعات دیگر (۴). از طرفی، انکولیتیک ویروس ها یک بستر درمانی چند جانبه را برای سرطان ارائه می دهند، چراکه ترجیحاً در سلول های تومور تکثیر می شوند و آنها را لیز می کنند، می توانند برای بیان ترانسژن های با خاصیت سایتوتوکسیک و تحریک کننده سیستم ایمنی مهندسی شوند و همچنین محیط ناحیه تومور را برای ریشه کنی سلول های سرطانی با استفاده از سلول های سیستم ایمنی بهینه کنند (۵).

بدین ترتیب، مهم ترین مزیت استفاده از ویروس ها در درمان سرطان، قابلیت جمع کردن استراتژی های مختلف درمانی در یکجا و حمله به تومورها در سطوح مختلف است که باعث می شود ویروس درمانی مانند یک درمان ترکیبی عمل کند. بر همین اساس در سال های اخیر استفاده از ویروس ها 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 ۳ داروی ویروسی موفق به دریافت تاییدیه مصرف درمانی در بیمار مبتلا به سرطان از سمت سازمان های نظارتی بهداشتی کشورهای جهان شده اند 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

^۱ Cancer stem cells

ملانوما دریافت کرد. سومین محصول ویروسی در سال ۲۰۲۱ موفق به کسب مجوز جهت درمان بیماران مبتلا به سرطان گلیوبلاستوما در ژاپن شد که DELYTACT® (teserpaturev/G47Δ) نام دارد. این ویروس انکولیتیک متعلق به هرپس سیمپلکس نوع ۱ (HSV-1) است.

انکورین، یک وکتور آدنوویروسی متعلق به سروتیپ ۵ است که برخی از ژن های آن به منظور افزایش safety و اختصاصیت تکثیر در سلول های سرطانی حذف شده است. علی رغم وجود مطالعات گسترده و مهم مبنی بر بی خطر بودن تزریق ویروس های انکولیتیک در بیماران مبتلا به انواع سرطان، و با توجه به زیرساخت ها و پتاسیل های فنی و علمی کشور، در این زمینه هنوز به جایگاه شایسته جمهوری اسلامی ایران نرسیده ایم و کمبود این دانش نوین در کشور احساس می شود.

پژوهشکده سرطان معتمد برای اولین بار در کشور پروژه ویروس درمانی با هدف انجام کارآزمایی بالینی در بیماران مبتلا به سرطان را آغاز نموده است و تلاش دارد این خلا را در کشور پر نماید. پروژه حاضر دارای مراحل طراحی، ساخت و تولید نیمه صنعتی ویروس های انکولیتیک با کیفیت مناسب برای استفاده در درمان سرطان است که در فازهای سه گانه اجرا خواهد شد. انجام این طرح تحقیقاتی، می تواند زمینه مناسبی را برای استفاده از روش های پیشرفته و نوین پزشکی جهت درمان بیماران مبتلا به سرطان در میهن عزیزمان فراهم کند.

۲-۱. تعریف مفاهیم

۱-۲-۱. آدنوویروس های انکولیتیک

از آنجایی که آدنوویروس ها قادر به هدف قرار دادن انتخابی سلول های توموری نیستند، اصلاحات مختلفی در سطح ژنوم برای این منظور مورد نیاز است. تا کنون برای ایجاد آدنوویروس های 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 آدنوویروس 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 سلول‌های جهش یافته در ژن p53 قدرت تکثیر دارد. علاوه بر این، حذف اضافی در ناحیه E3، ONYX-15 را در برابر پاسخ‌های ایمنی ضد ویروسی حساس می‌کند.

همچنین حذف بخش دیگری از ژن E1B، E1B-19 kD، منجر به تولید دسته دیگری از آدنوویروس‌های انکولیتیک می‌شود. از آنجایی که پروتئین E1B-19 kD از آپوپتوز با واسطه FAS جلوگیری می‌کند و اکثر سلول‌های سرطانی مسیر آپوپتوز را مسدود کرده‌اند، ویروس‌های فاقد E1B-19K صرفاً می‌توانند در سلول سرطانی تکثیر شوند درحالی‌که توانایی تکثیر در سلول نرمال را ندارد (۷). روش دیگر در دستیابی به آدنوویروس-های انکولیتیک حذف ۲۴ نوکلئوتید از ناحیه E1A می‌باشد، همانطور که اشاره شد پروتئین E1A برای مهار پروتئین Rb و تکثیر در سلول نرمال ضروری است، بنابراین آدنوویروس delta-24 که در آن اینترکشن E1A و Rb مختل شده است صرفاً می‌تواند در سلول‌های سرطانی که مسیر Rb دچار اختلال است تکثیر شود. در بیشتر سلول‌های سرطانی به دلیل معیوب بودن مسیر Rb/p16 توانایی اتصال به Rb برای E1A غیرضروری است (۸).

دومین روش برای تولید آدنوویروس 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، آدنوویروس 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 آدنوویروس انکولیتیک استفاده شد (۹).



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 دنیاست 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 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 سلول های توموری تکثیر شود (۱۲).

اما برخلاف ONYX-015 که ژن‌های ADP و gp 6.7 متعلق به ناحیه E3 را بیان می‌کند، Oncorine به گونه‌ای 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 5×10^{-11} vp/day در پنج روز متوالی به بیماران سرطانی تزریق می‌شود. دوره‌های تزریق وابسته به شرایط بیمار متفاوت است.

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 5×10^{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. ($P < 0.001$) (۱۴). 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 شیمی درمانی صرف بودند (۰٫۰۸۱٪). نتایج این دو کارآزمایی سبب شد تا استفاده ترکیبی از انکورین و داروی شیمی درمانی ۵ فلوروپوراسیل برای درمان بیماران SCCHN و NPC تاییدیه سازمان غذا و داروی چین را دریافت کند (۱۵). به دنبال کسب نتایج موفقیت آمیز استفاده از ویروس انکورین در ترکیب با شیمی درمانی برای درمان بیماران مبتلا به سرطان ناحیه سر و گردن در چین، از این ویروس 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، به دو گروه تقسیم شدند گروه دریافت کننده درمان

ترکیبی انکورین و TACE (۸۷ نفر) و گروه کنترل، دریافت کننده TACE به تنهایی (۸۸ نفر). ویژگی های کلینیکوپاتولوژی هر دو گروه مشابه بود اما تفاوت معنی داری 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 (۱۶٪).

در کارآزمایی بالینی دیگری که بروی بیماران مبتلا به سرطان pleural effusion انجام شده است، استفاده از انکورین همراه با داروی شیمی درمانی (cisplatin) در مقایسه با شیمی درمانی به تنهایی نتایج بسیار امیدوارکننده ای 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 ویروس انکورین را با دوز 2×10^{12} vp و داروی سیس پلاتین را (۵۰ میلی گرم) از طریق تزریق به داخل قفسه سینه دریافت می کردند. 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 (۱۴).

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

با توجه به تاییدیه سازمان غذا و داروی چین (CFDA) برای استفاده از داروی انکورین در بیماران مبتلا به سرطان های 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 می باشد. اما همانطور که قبلا ذکر شد در چندین مطالعه بالینی اثرگذاری این دارو در درمان سایر تومورها از جمله سرطان های 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 کارآزمایی های بالینی بسیاری با استفاده 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 می توان از این دارو در آینده برای درمان سایر بیماران سرطانی استفاده کرد.

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

فصل سوم:

اهداف

۳-۱. هدف اصلی

کسب دانش فنی و توسعه فناوری های مرتبط با ویروس درمانی و ژن درمانی بیماران سرطانی

۳-۲. اهداف کاربردی

در این پروژه تمرکز اصلی بر روی شبیه سازی و تولید آدنووایروس انکولیتیک انکورین (H101) با هدف لیز اختصاصی سلول های توموری در سرطان های توپر است.

در این پروژه در کنار هدف اصلی می توان به اهداف زیر دستیافت:

الف) توسعه زیرساخت های ضروری و چند منظوره جهت تولید محصولات فناورانه در حیطه ویروس درمانی سرطان با قابلیت استفاده برای سایر محصولات ویروسی؛

ب) طراحی و توسعه آدنووایروس های انکولیتیک با هدف افزایش بقا و درمان بیماران مبتلا به سرطان؛

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

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

ه) 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، شبیه سازی و بررسی امکانپذیری فنی

۴-۲. جمعیت (واحد) مطالعه

در این مطالعه و پس از انجام مطالعات پیش بالینی، بیماران مبتلا به سرطان‌های پیشرفته با اولویت سرطان سر و گردن که به خط یک و دو درمان پاسخ نداده اند و یا بیماری آنها مجدداً عود کرده است، پس از کسب رضایت نامه کتبی، وارد مطالعه شده و میزان ایمن و بی خطر بودن (Safety) و اثر بخشی درمان مطابق با گایدلاین‌های RECIST تعیین خواهد شد.

۴-۳. مکان و زمان مطالعه

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

فاز آزمایشگاهی مطالعه، مرحله پیش بالینی و تولید وپروس در مقیاس نیمه صنعتی در محل پژوهشکده سرطان معتمد انجام خواهد شد. فاز صفر و یک کارآزمایی بالینی نیز در بیمارستان‌های تخصصی همکار با پژوهشکده انجام خواهد شد.

۴-۴. حجم نمونه

فاز صفر مطالعه: ۵ بیمار مبتلا به سرطان‌های توپر که در مرحله‌ی پیشرفته یا متاستاتیک بیماری هستند و نسبت به درمان‌های رایج مقاوم نشان داده‌اند.

فاز یک مطالعه: ۲۰ نفر از بیماران مبتلا به سرطان‌های پیشرفته یا متاستاتیک با اولویت سرطان سر و گردن از نوع سرطان سلول سنگفرشی و سرطان ریه NSCLC و سرطان پستان

۴-۵. روش نمونه‌گیری

در این مطالعه، نمونه‌گیری انجام نخواهد شد.

۴-۶. روش اجرا

این پروژه بر روی طراحی و شبیه‌سازی آدنووایروس انکولیتیک با نام تجاری انکورین متمرکز می‌باشد که برای رسیدن به این هدف ابتدا آزمایشگاه‌های سطح دو و سه ایمنی زیستی احداث خواهد شد.

۱-۶-۴. توسعه زیرساخت

- فاز یک: آزمایشگاه سطح دو ایمنی زیستی (BSL2^۱) و 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^۲
- ✓ درب اتاق تمیز غیر هم باد^۳
- ✓ پس باکس
- ✓ پنجره اتاق تمیز

ب. فیلترها

- ✓ فیلتر هپا فشرده V شکل
- ✓ فیلتر باکس هپا
- ✓ قاب یا فریم فیلتر
- ✓ فیلتر هپا با جدا کننده آلومینیومی

^۱ Biological Safety Level 2/3

^۲ Flush System

^۳ Semi Flush System

- ✓ 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
مشابه با انکورین

فاز اول: طراحی و ساخت سازه آدنووایروس انکولیتیک مشابه ویروس انکورین با استفاده از تکنولوژی
مهندسی ژنتیک

(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)

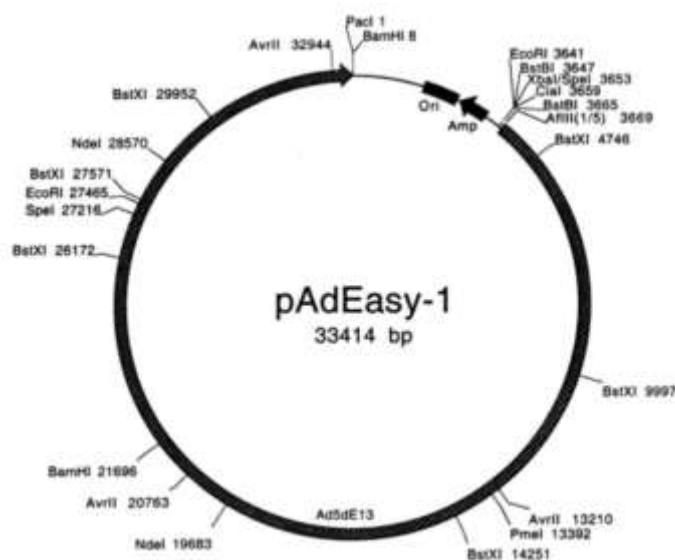
(۳) تولید پلاسمید نو ترکیب آدنووایروس تیپ ۵ مشابه با انکورین (H101) با استفاده از روش های نو ترکیبی همولوگ
در باکتری BJ5183

(۴) تایید ساخت پلاسمید نهایی تولید کننده آدنووایروس انکولیتیک از طریق تکنیک PCR و هضم آنزیمی و توالی
یابی

❖ ساختار اصلی آدنووایروسی تکثیرشونده (مشابه انکورین) با استفاده از وکتور
غیر تکثیرشونده pAdeasy-1

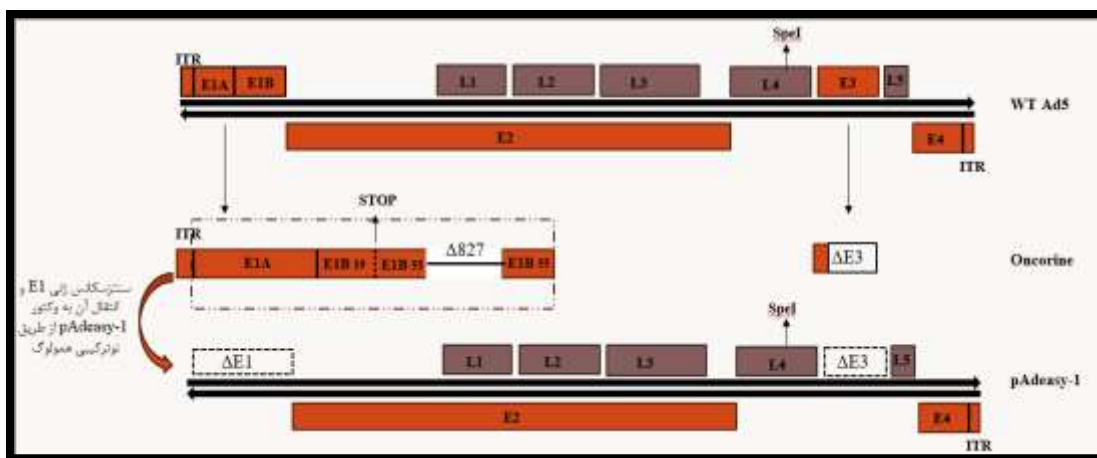
پلاسمید آدنووایروسی pAdEasy-1 شامل تمام توالی های Ad5 به جز نوکلئوتیدهای ۱-۳۵۳۳ (شامل
ژن های E1 و نوکلئوتیدهای ۲۸۱۳۰-۳۰۸۲۰ (شامل E3) است. (شکل ۴-۲) لازم به ذکر است که ویروس
انکولیتیک انکورین نیز مبتنی بر سرو تیپ ۵ آدنووایروس تولید خواهد شد.

❖ **ناحیه E1:** 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 آدنوویروسی ("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



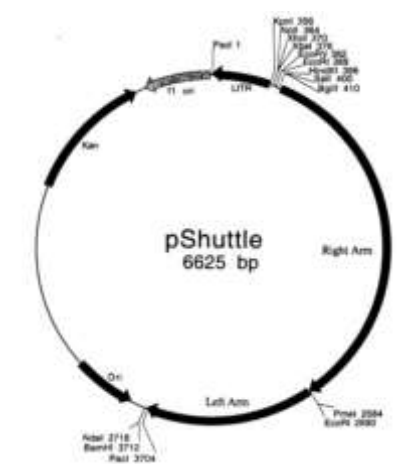
شکل ۴-۲ شکل شماتیک وکتور pAdEasy-1

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. (شکل ۴-۳)



شکل (۳-۴) تصویر شماتیک از مقایسه ساختار ژنتیکی ویروس Ad5، H101 و pAdEasy-1

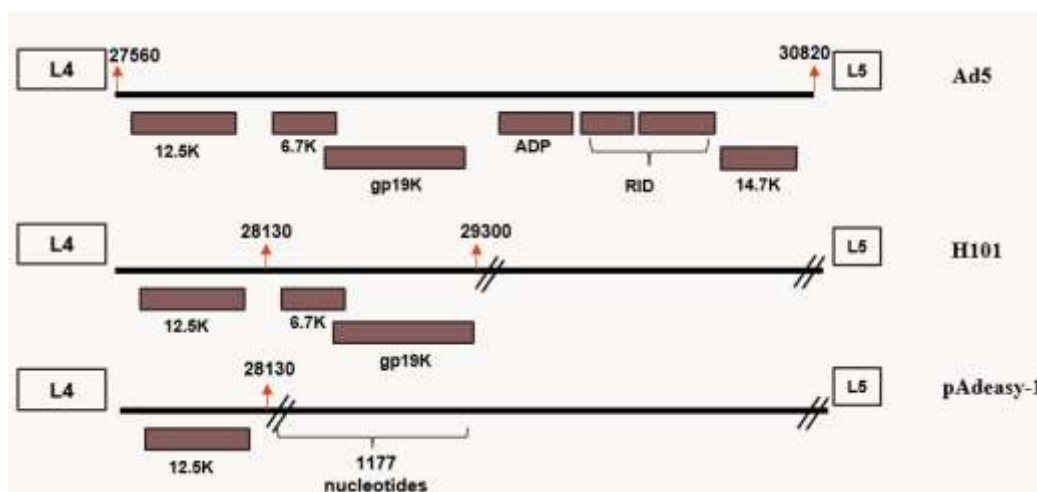
در این راستا توالی ایی به طول ۲۳۷۹ نوکلئوتید که حاوی توالی کدکننده E1A و E1B-19KD مطابق شکل (شکل ۳-۴) سنتز و در وکتور pShuttle (16402) کلون شد (شکل ۴-۴). پس از تایید ساخت شاتل وکتور، برای انجام نوترکیبی باید شاتل وکتور از ناحیه بین دو بازوی همولوگ خطی شود که برای اینکار از آنزیم *EcoRI* استفاده می شود. در مرحله بعد شاتل وکتور خطی شده به همراه پلاسمید pAdEasy-1 به درون باکتری Bj5183 ترانسفورم می گردد تا نوترکیبی اتفاق بیفتد. 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 معمولاً کانامایسین است جایگزین می شود



شکل ۳-۴ نقشه ژنتیکی شاتل وکتور 16402

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 می‌شود تا استخراج پلاسمید و الکتروفورز انجام شود و پلاسمید کاندید نوترکیبی انتخاب می‌گردد. در صورتی که نوترکیبی همولوگ بین شاتل وکتور و پلاسمید pAdEasy-1 انجام شود، در اثر هضم آنزیمی وکتور کاندید نوترکیبی با *Pacl* یک قطعه ۴۵۰۰ بازی از وکتور خارج می‌شود. آنزیم *Pacl* در وکتور نوترکیب pAdEasy-1 دارای ۲ جایگاه برش است که پس از هضم آنزیمی قطعه‌ی حدود ۴۵۰۰ نوکلئوتید شامل ژن مقاومت به آنتی بیوتیک و ناحیه آغاز همانندسازی باکتریایی از آن حذف می‌شود و صرفاً توالی مربوط به ویروس باقی می‌ماند، در نتیجه استفاده از این پلاسمید برای مطالعات بالینی هیچ منعی ندارد همانطور که در مطالعات بسیاری در طراحی واکسن و ویروس‌های انکولیتیک از آن استفاده شده است.

ناحیه E3: در وکتور pAdEasy-1 مشتق از ژنوم Ad5، از ناحیه E3 توالی حفاصل ۲۸۱۳۰-۳۰۸۲۰ حذف شده است که معادل ۲۶۹۰ نوکلئوتید می‌باشد، درحالیکه شروع ناحیه E3 در ژنوم Ad5 از نوکلئوتید ۲۷۵۶۰ است. در مورد ویروس H101، از ناحیه E3 سکانس کدکننده پروتئین‌های ADP, RID و 14.7K حذف و توالی کدکننده‌ی پروتئین‌های 12.5، 6.7 و 19 کیلو دالتونی حفظ شده است. از آنجایی که حذف توالی E3 در pAdEasy-1 از نوکلئوتید ۲۸۱۳۰ آغاز می‌شود و شروع ناحیه‌ی E3 از نوکلئوتید ۲۷۵۶۰ می‌باشد در نتیجه ۱۱۷۷ نوکلئوتید ابتدایی در وکتور pAdEasy-1 وجود دارد. بنابراین می‌بایست بعد از نوکلئوتید ۲۸۱۳۰، ۱۱۷۷ نوکلئوتید باقی مانده، سکانس کدکننده پروتئین‌های 6.7 و 19 کیلو دالتون، به سکانس pAdEasy-1 اضافه شود (شکل ۴-۵).



شکل ۵-۴ تصویر شماتیک از مقایسه ساختار E3 در ویروس Ad5، H101 و وکتور pAdeasy-1

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 می شود 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 باشد. برای انجام نوترکیبی در این مرحله می بایست بکبن آدنوویروسی در نزدیکی توالی E3 خطی شود که برای خطی کردن از آنزیم *SpeI* استفاده می شود. پس از خطی شدن وکتور pAdeasy-1 که در مرحله قبل توالی E1A و E1B 19KD به آن اضافه شده، نوترکیبی بین این وکتور و قطعه ۳۶۷۰ بازی در باکتری Bj5183 انجام می شود. برای تایید اضافه شدن توالی ۱۱۷۷ بازی ناحیه E3 به وکتور pAdeasy-1 کلونی PCR انجام می شود. برای انجام کلونی PCR از جفت پرایمری استفاده می شود که یکی از آنها اختصاصی توالی ۱۱۷۷ و دیگری به توالی بکبن متصل می شود. فرایند PCR و در ادامه توالی یابی، افزودن توالی های مدنظر به پلاسمید pAdeasy-1 را تایید می نماید. پس از ساخت توالی نهایی به منظور اطمینان از درستی توالی افزوده شده و مشابهت پلاسمید با توالی آنکورین کل توالی پلاسمید سکانس می گردد و تشابه توالی ناحیه ویروسی پلاسمید pAdeasy-1 با ویروس انکورین تایید می شود.

• فاز دوم: تولید آزمایشگاهی ویروس انکورین و انجام مطالعات پیش بالینی مرتبط با کارایی و ایمن و بی خطر بودن ویروس انکولتیک تولیدی (Oncomed)

(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 آدنووایروس با ذرات ویروسی تغلیظ شده به منظور بررسی تکثیر پذیری ویروس بر روی رده سلولی سرطانی

(۳) تایید انکولتیک بودن ویروس از طریق مشاهده تکثیر ویروس در رده های سلول سرطانی با نقص پروتئین p53 مانند HT29, SW480 و عدم تکثیر آن در سلول های نرمال

(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 سینرژیسم آن با داروهای شیمی درمانی

(۶) ارزیابی ایمن و بی خطر بودن 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 موشی

فصل پنجم:

یافته های پژوهش

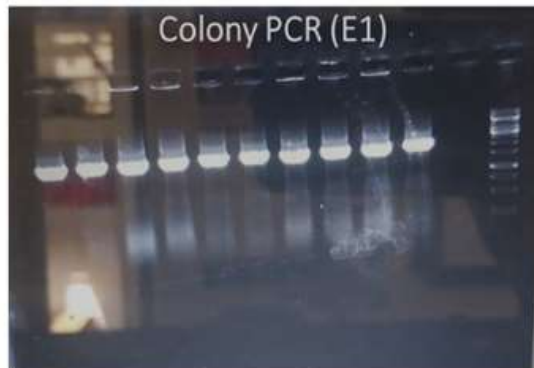
۵-۱. ساخت بکبن آدنووایروسی تکثیرشونده (مشابه انکورین) با استفاده از وکتور

غیرتکثیرشونده Adeasy-1

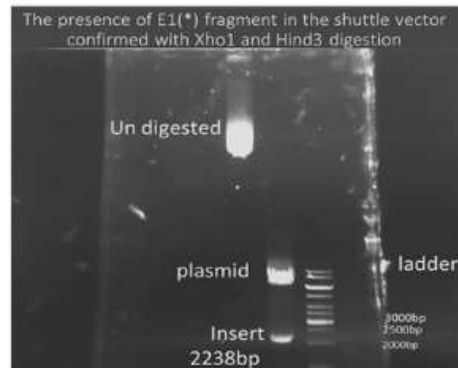
برای انجام نوترکیبی و افزودن توالی مربوط به E1A و E1B به بکبن ویروس از شاتل وکتور pShuttle (16402) استفاده شد. در این وکتور توالی های آدنووایروسی (بازوهای همولوگ) متناسب با دو طرف ناحیه E1 وجود دارد که امکان نوترکیبی همولوگ با pAdEasy-1 را فراهم می کند. بازوی چپ حاوی نوکلئوتیدهای Ad5 34,931-35,935 است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



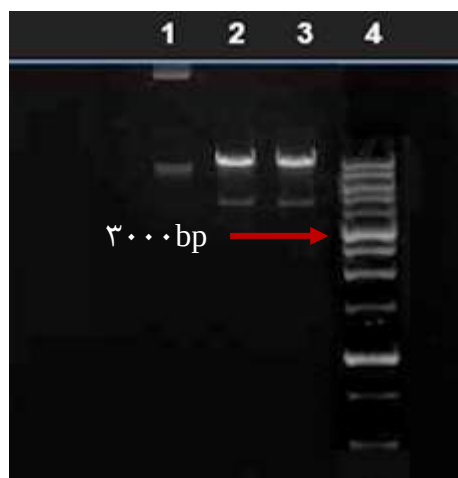
شکل ۵-۲ هضم آنزیمی شاتل وکتور حاوی قطعه E1A و E1B-19KD توسط آنزیم *EcoRI* به منظور نو ترکیبی همولوگ با یک بن آدنوویروسی؛ (۱) شاتل وکتور نو ترکیب هضم شده با آنزیم *EcoRI*، (۲) Ladder 1Kb و (۳) شاتل وکتور هضم نشده.

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



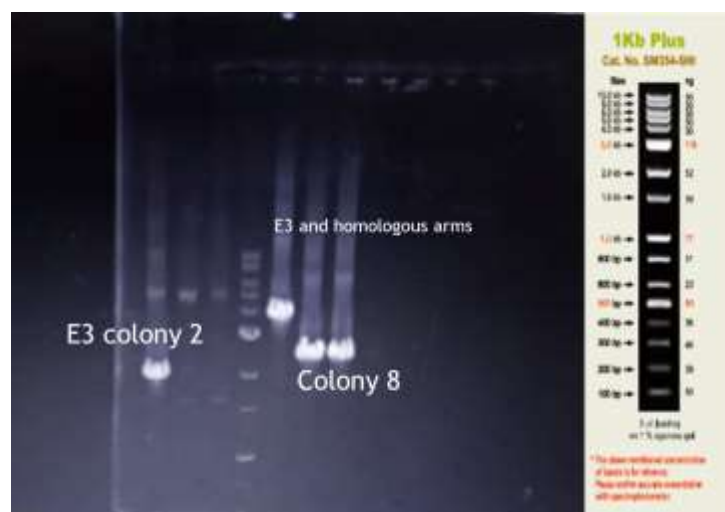
شکل ۴-۵ الکتروفورز محصول هضم آنزیمی پلاسمید کاندید نو ترکیبی با *PacI*؛ (۱) پلاسمید نو ترکیب pAdeasy-1 هضم نشده، (۲ و ۳) پلاسمید نو ترکیب pAdeasy-1 هضم شده با آنزیم *PacI* و (۴) Ladder 1Kb

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 ۳۰۸۲۰-۲۸۱۳۰ ژنوم Ad5 است. از طرفی قسمتی از ناحیه E3 که برای تولید ویروس مشابه H101 لازم است معادل ۱۷۴۰ باز است که شامل توالی کدکننده پروتئینهای ۱۲/۵ ، ۶/۷ و ۱۹ کیلو دالتون است.

با توجه به اینکه حذف ناحیه E3 در pAdeasy-1 از نوکلوتید ۲۸۱۳۰ آغاز می شود و ناحیه ی E3 از ۲۷۵۶۰ در نتیجه ۵۷۰ نوکلوتید ابتدایی از ناحیه E3 در Adeasy-1 وجود داشته و در نتیجه ۱۱۷۷ نوکلئوتید باقی مانده به این ناحیه اضافه و بعد از باز ۲۸۱۳۰ قرار داده شد. برای افزودن این توالی به وکتور pAdeasy-1 به شاتل وکتوری نیاز بود که دارای بازوی همولوگ با دوطرف ناحیه E3 باشد. در این راستا قطعه‌ای به طول ۳۶۷۰ نوکلئوتید در وکتور PUC57 سنتز شد که علاوه بر توالی کدکننده ۶/۷ و ۱۹ کیلودالتون برای اضافه شدن به وکتور pAdeasy-1 دارای توالی های همولوگ نیز می باشد. 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).



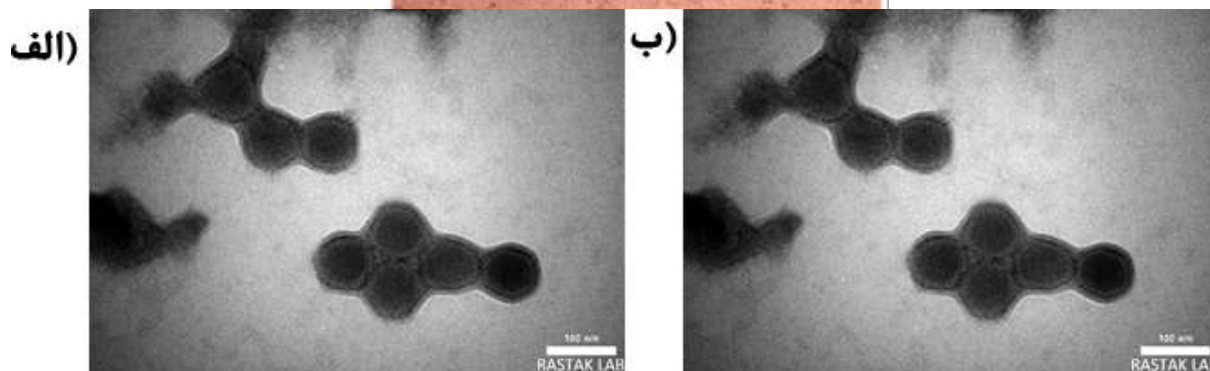
شکل ۵-۵ هضم آنزیمی وکتور pAdeasy-1 با آنزیم *SpeI* به منظور نوترکیبی با وکتور حاوی توالی E3 ۱- وکتور هضم نشده ۲- مارکر ۱Kb ۳ و ۴- وکتور هضم شده



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

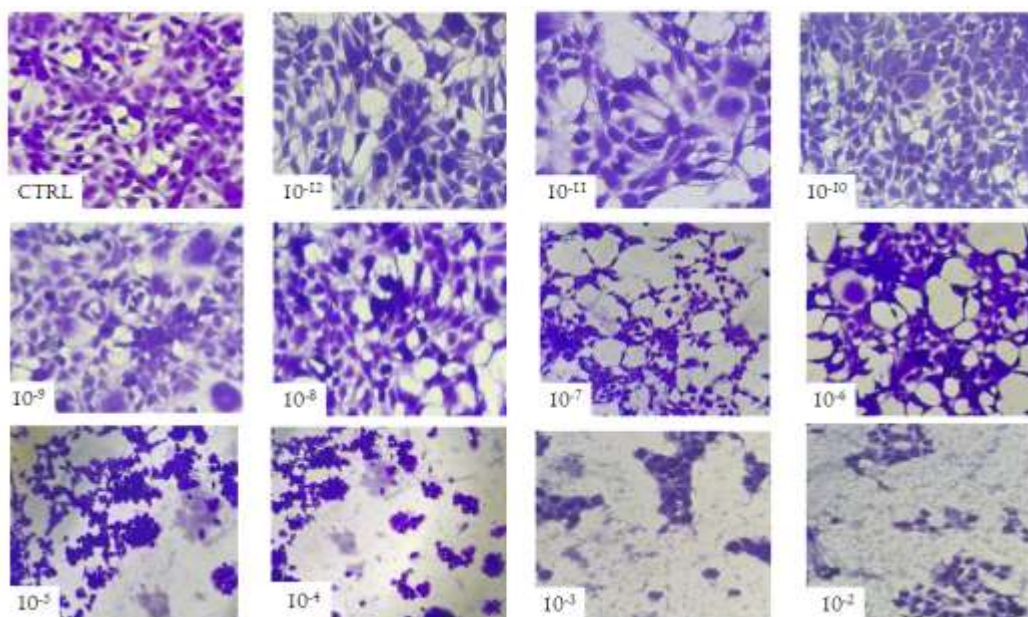
پس از خطی شدن وکتور pAdeasy-1 که در مرحله قبل توالی E1A و E1B-19KD به آن اضافه شده بود، نوترکیبی بین این وکتور و قطعه ۳۶۷۰ بازی در باکتری Bj5183 انجام شد. برای تایید اضافه شدن توالی ۱۱۷۷ بازی ناحیه E3 به وکتور pAdeasy-1 کلونی PCR انجام شد. برای انجام کلونی PCR از جفت پرایمری استفاده شد که یکی از آنها 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 ۵-۹ عکس میکروسکوپ الکترونی از ویروس انکولیتیک (انکورین) تولید شده در پژوهشکده معتمد که کاملاً منطبق با تصاویر میکروسکوپ الکترونی آدنوویروس می باشد.

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



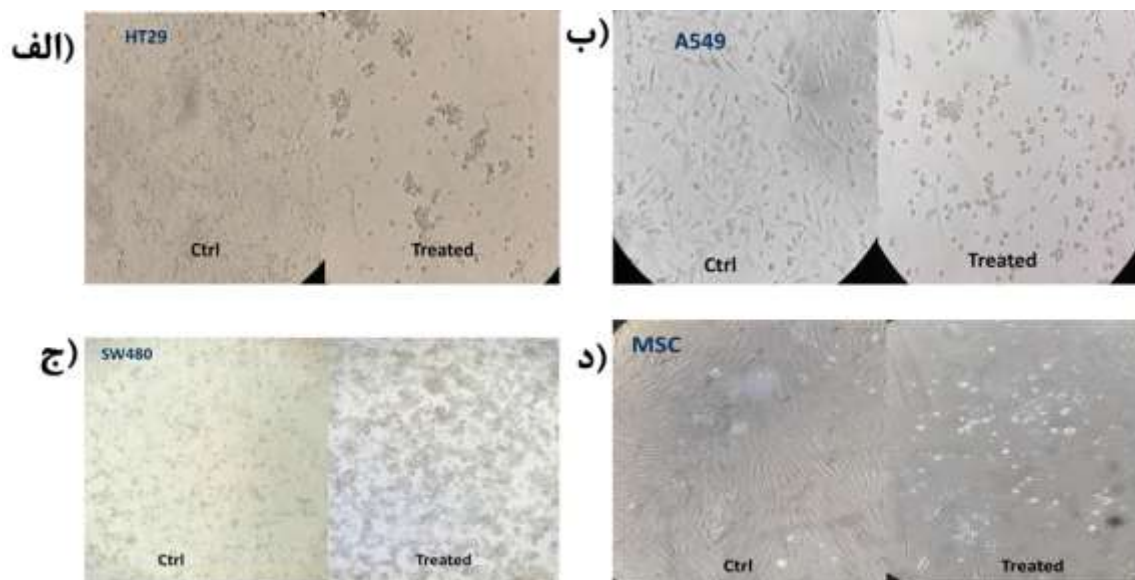
شکل ۵-۸ ترنگ آمیزی سلول های HEK-AD با رنگ کریستال ویوله ۱۰ روز پس از آلوده کردن سلول ها با ویروس انکورین سپس به عنوان یکی از روش های تعیین هویت ویروس، از ویروس انکولیتیک خالص شده عکس میکروسکوپ الکترونی تهیه شد.

در مرحله بعد ویروس با تیترا بالا تولید و تعیین تیترا شد. برای تعیین تیترا ویروس از روش TCID₅₀

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

ژنی ویروس تولید شده با ویروس انکورین، توالی یابی (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 سایتوتوکسیسیتی ویروس انکورین بر روی مجموعه ای از سلول های سرطانی با نقص پروتئین p53 مثل HT29، SW480، MCF-7 و A549 کشت داده شدند و توسط ویروس انکورین با MOI های مختلف آلوده شدند و بعد از 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 اثر سینرژیسیم دارو، ایمن و بی خطر بودن و کارایی ویروس آنکومد در فاز پیش بالینی مورد بررسی قرار خواهد گرفت و به صورت همزمان تولید ویروس با کیفیت مناسب آغاز خواهد شد تا در صورت تایید ایمنی در مطالعه پیش بالینی فاز سوم مطالعه (بررسی safety ویروس در فاز صفر و یک) آغاز گردد.

فصل ششم:

بحث و نتیجه گیری

۱-۶. مروری بر یافته‌های پژوهش

در سال‌های اخیر ویروس درمانی با استفاده از ویروس‌های آنکولیتیک به عنوان یک رویکرد درمانی امیدوارکننده برای مبارزه با سرطان پیشنهاد شده است. از انواع ویروس‌های دارای خواص آنکولیتیک می‌توان به آدنوویروس‌ها، ویروس هرپس سیمپلکس و ویروس بیماری نیوکاسل اشاره کرد. در میان انواع حامل‌های ویروسی آنکولیتیک، آدنوویروس‌های آنکولیتیک 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. روش‌های مختلفی برای دستیابی به تکثیر انتخابی آدنوویروس در سلول‌های سرطانی مورد استفاده قرار گرفته است که از جمله آنها می‌توان به استفاده از پروموتورهای اختصاصی تومور برای بیان ژن E1A و یا حذف ژن E1B اشاره کرد. (۱۷).

در مطالعات بالینی پتانسیل درمانی ویروس H101 در درمان انواع تومورها نشان داده شده 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 پاسخ کلی ۲۷ درصد افزایش یافت. نتایج مربوط به این کارآزمایی باعث شد تا ویروس H101 توسط سازمان غذا و داروی دولتی چین برای درمان سرطان نازوفارنکس تایید گردد (۱۸).

ژن E1b آدنوویروس دو پلی پپتید اصلی ۵۵ کیلو دالتون و ۱۹ کیلو دالتون را کد می‌کند که هر دو برای ترانسفورماسیون سلول‌های چوندگان توسط عفونت ویروسی مورد نیاز هستند. پروتئین E1B55K از سلول‌های آلوده در برابر اثرات p53 ناشی از E1A محافظت می‌کند (۱۹). 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 پروتئین‌های پرو آپوپتوز Bak و Bax جلوگیری می‌کند. اعتقاد بر این است که عملکرد این پروتئین‌های کدگذاری شده توسط ژن E1B، از مرگ زودرس سلولی جلوگیری می‌شود و تکثیر ویروسی به حداکثر می‌رسد (۲۰).

در مطالعات گذشته نشان داده شده است که آدنووایروس فاقد توالی کدکننده E1B55K و E1B19K می تواند در اکثریت سلول های سرطانی، نه صرفاً تومورهای همراه با نقص p53، تکثیر شود و اثر سایتوپاتیک ایجاد کند. نتایج ما در این پروژه هم راستا با نتایج گذشته نشان می دهد که ویروس آنکومد نه صرفاً در سلول های همراه با نقص p53 بلکه در تمامی سلول های سرطانی بیان کننده رسپتور CAR قابلیت تکثیر و اثر سایتولیتیک دارد. بنابراین می توان گفت غیرفعال سازی p53 و مهار آپوپتوز توسط پروتئین های E1B55K و E1B19K در تکثیر ویروس ضروری نیست و این به معناست که پروتئین های E1B ممکن است نقش های دیگری علاوه بر مهار آپاپتوز داشته باشند (۲۱). در این راستا یک رویکرد مبتنی بر آرایه ژنی در مقیاس بزرگ برای تجزیه و تحلیل بیان ژن های 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، پروتئین های E1B بر بیان طیف متنوعی از ژن ها از جمله CDC25A و سیکلین E که در تنظیم چرخه سلولی مهم هستند تأثیر می گذارد (۲۲).

تاکنون حداقل سه مکانیسم برای تکثیر ویروس های فاقد E1B55K در سلول های سرطانی پیشنهاد شده است. فرضیه اصلی این است، از آنجایی که بسیاری از سلول های سرطانی فاقد پروتئین عملکردی p53 یا مسیرهای آن هستند، عملکرد E1B55K در مهار p53 به اندازه سلول های عادی مهم نیست و بنابراین، وکتورهای حذف شده با E1B55K می توانند به طور انتخابی در سلول های سرطانی دارای p53 تکثیر شوند. مکانیسم دوم مبتنی بر این است که سلول های سرطانی تمایل به حمایت از انتقال هسته ای mRNA های دیررس ویروسی در غیاب پروتئین E1B55K دارند و بنابراین امکان تکثیر انکولیتیک وکتورهای حذف شده با E1B55K را فراهم می کنند. مکانیسم سوم این است که سلول های سرطانی با سیکلین E از تنظیم خارج شده به وکتورهای حذف شده با E1B55K اجازه می دهند تا بیان سیکلین E را القا کنند که منجر به تکثیر انکولیتیک در سلول های سرطانی می شود. به طور کلی پروتئین E1B55K دارای عملکرد های متفاوت است و می تواند با اجزای مختلف سلولی اینترکشن نشان دهد که در حال حاضر به طور کامل شناخته نشده است، بنابراین عملکرد ویروس های

فاقد ژن E1b55K مانند انکورین در سلول های سرطانی متفاوت یکسان نخواهد بود و متاثر از ویژگی های تومور و نوع سلول سرطانی خواهد بود (۲۳).

۶-۲. محدودیت ها

- ✓ عدم دسترسی به آدنوویروس دست نخورده برای ساخت وکتورهای انکولیتیک در ایران
- ✓ محدودیت خرید و قیمت بالای مواد و تجهیزات لازم در حوزه مهندسی ژنتیک و تولید ویروس
- ✓ محدودیت در واردات تجهیزات استاندارد مرتبط با تولید محصولات ویروسی و ویروسی

۶-۳. نتیجه گیری

از نتایج به دست آمده در این پروژه، تولید ویروس آنکومد (مشابه ویروس انکورین) از طریق حذف دو ژن E1B و E3 آدنوویروس سروتپ ۵ (Ad5) است که قادر است به صورت انتخابی سلول های توموری را آلوده و لیز کند در حالی که در سلول های طبیعی، ویروس قادر به غیرفعال کردن پروتئین P53 نیست، بنابراین برای سلول های نرمال ایمن است.

۶-۴. برنامه های آینده جهت ادامه پروژه

- ادامه فاز دوم: ارزیابی ایمنی و کارایی ویروس دست ورزی شده انکورین در مطالعه پیش بالینی
- فاز سوم: تولید ویروس انکولیتیک با کیفیت مناسب جهت انجام کارآزمایی های بالینی فاز صفر و یک

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. Zeyaulah 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. Liang M. Oncorine, the world first oncolytic virus medicine and its update in China. *Current cancer drug targets*. 2018;18(2):171-6.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. Yu W, Fang H. Clinical trials with oncolytic adenovirus in China. *Current cancer drug targets*. 2007;7(2):141-8.
19. 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.

20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. Cheng P-H, Wechman SL, McMasters KM, Zhou HS. Oncolytic replication of E1b-deleted adenoviruses. *Viruses*. 2015;7(11):5767-79.