

بسمه تعالی

مجموعه RFP های پژوهش های توسعه ای حوزه ایمونوتراپی

فهرست

۱. توسعه واکسن درمانی سرطان بیوسیمیلار ۲
۲. درمان های ترکیبی ایمونوتراپی برای استفاده در کارآزمایی بالینی ۶
۳. توسعه روش های کنترل کیفی فرآورده های ویروسی مطابق استانداردهای جهانی ۱۰
۴. تولید ویروس انکولایتیک و/یا وکتورهای ویروسی در شرایط استاندارد ۱۷

با توجه به اشتراکات موضوعی حوزه ایمونوتراپی و ژن درمانی، RFP ها و اولویتهای حوزه ژن درمانی را نیز ملاحظه نمایید.

۱. توسعه واکسن درمانی سرطان یئوسیمیلار^۱

مقیاس پروژه (پژوهشی، شبیه سازی، امکان سنجی، آزمایشگاهی، پیلوت، صنعتی، زیرساختی):

آزمایشگاهی، پیلوت

شرط اولیه برای ارزیابی پروپوزال دریافتی:

فرآورده هدف توسعه در پروپوزال باید در دنیا حداقل فاز I/IIa کارآزمایی بالینی را با موفقیت طی کرده باشد.
(ایمنی فراورده و کارایی حداقلی آن اثبات شده باشد.)

خروجی های مورد انتظار:

۱. چنانچه وضعیت توسعه فرآورده هدف در سطح جهانی در مرحله II/ III (وضعیت احراز اثربخشی) کارآزمایی بالینی باشد ارائه مدارک ثبت و تأییدیه شرکت دانش بنیان و گواهی تبدیل ایده به نمونه محصول (MVP) به عنوان حداقل خروجی در نظر گرفته خواهد شد.

۲. چنانچه وضعیت توسعه فرآورده هدف در سطح جهانی دارای مستندات خروجی فاز III کارآزمایی بالینی باشد، تأییدیه ماژول III از CTD سازمان غذا و دارو به عنوان حداقل خروجی در نظر گرفته خواهد شد.

۳. چنانچه وضعیت توسعه فرآورده هدف در سطح جهانی دارای تأییدیه از یک نهاد نظارتی (Regulatory Body) باشد، ارائه تأییدیه ماژول III و IV از CTD مورد تأیید سازمان غذا و دارو به عنوان حداقل خروجی در نظر گرفته خواهد شد.

❖ برای هر طرح متناسب با سطح TRL و تعهدات در نظر گرفته شده، تا سقف بودجه فراخوان گزینش تصویب خواهد شد.

^۱ مدل بومی سازی شده یک محصول خارجی مجوزدار یا محصول دارای نتایج مثبت در کارآزمایی بالینی

^۲ Minimum viable product

اهمیت و آینده حوزه در دنیا:

پیشرفت های اخیر در درک ما از مکانیسم های مولکولی مختلف که سلول های توموری برای فرار از نظارت ایمنی استفاده می کنند، توسعه واکسن های پیشگیری کننده و درمانی سرطان را تسهیل کرده است؛ به طوریکه می تواند در برابر طیف وسیعی از بدخیمی های انسانی مؤثر باشد. واکسن های سرطان سیستم ایمنی را تحریک می کنند تا با القاء پاسخ ایمنی ضد توموری در برابر سرطان محافظت ایجاد کنند. واکسن های سرطان معمولاً به دو دسته ی پیشگیرانه یا درمانی طبقه بندی می شوند. واکسن های پیشگیرانه از ابتلا به عفونت ویروس انکوژن محافظت می کنند. از سوی دیگر، واکسیناسیون های درمانی، پتانسیل سیستم ایمنی را برای از بین بردن سلول های سرطانی به کار می گیرند. علاوه بر این، نسل جدیدی از واکسن های پیشگیری کننده از سال ۲۰۲۱ وارد فاز کارآزمایی بالینی شده اند که افراد سالم اما با ریسک بالای ابتلا به سرطان را علیه آنتی ژن های سرطانی واکسینه می کنند.

واکسن های درمانی سرطان بسته به روش های فرمولاسیون و سیستم های تحویل مختلف به چهار دسته تقسیم می شوند: واکسن های مبتنی بر اسیدهای نوکلئیک (DNA یا RNA)، واکسن های مبتنی بر ویروس، واکسن های مبتنی بر پپتید و واکسن های مبتنی بر سلول. واکسن های سرطان مبتنی بر سلول خود به دو دسته تقسیم می شوند: (۱) واکسن هایی که از سلول های کامل مانند سلول های عرضه کننده آنتی ژن اتولوگ مانند سلول های دندریتیک (DCs) به عنوان سلول عرضه کننده ی آنتی ژن استفاده می کنند، (۲) واکسن هایی که حاصل دست ورزی ژنتیکی سلول های سرطانی برای بیان عوامل تحریک کننده ی سیستم ایمنی همچون سایتوکاین ها یا ژن های خودکشی هستند. واکسن های مبتنی بر پپتید شامل اپی توپ های پیش بینی شده ی آنتی ژن تومور هستند. واکسن های سرطان مبتنی بر ویروس از ناقل های ویروسی بیان کننده آنتی ژن توموری استفاده می کنند. DNA واکسن ها می توانند TAA یا فاکتورهای تعدیل کننده ی ایمنی را برای القاء پاسخ اختصاصی آنتی ژن تومور رمزگذاری کنند.

پلت فرم واکسن های سرطان مبتنی بر mRNA به عنوان یکی از پیشروترین فناوری های ایمونوتراپی سرطان پس از موفقیت در بیماری کووید-۱۹، مورد توجه گسترده شرکت های داروسازی و مراکز تحقیقاتی قرار گرفته است. این فناوری به دلیل توانایی در رمزگذاری سریع و دقیق نئوآنتی ژن های شخصی سازی شده، سرعت تولید بالا، ایمنی نسبی و انعطاف پذیری فرمولاسیون، در خط مقدم پژوهش های بالینی قرار دارد. شرکت مدرنا تا سال ۲۰۲۵ چندین کاندید واکسن mRNA علیه ملانوما، سرطان ریه و سایر تومورها را در مراحل مختلف کارآزمایی بالینی دارد که یکی از مهم ترین آن ها mRNA-4157/V940 است؛ این واکسن شخصی سازی شده در ترکیب با Pembrolizumab در یک کارآزمایی فاز b2 بر روی بیماران ملانوما پرخطر، خطر عود یا مرگ را به طور معنی داری کاهش داد و هم اکنون وارد فاز III شده است. مدرنا همچنین گزارش داده که در حوزه های سرطان ریه غیرکوچک، سرطان پانکراس و دیگر بدخیمی ها، کاندیدهای mRNA در فاز I/II را در حال توسعه دارد. شرکت BioNTech به عنوان پیشگام دیگر این حوزه، تاکنون بیش از ۶ کاندید واکسن mRNA درمانی سرطان را در فازهای I و II بالینی در انواع سرطان ها از جمله ملانوما، سرطان های GI و سرطان پستان توسعه داده است. علاوه بر آن، از سپتامبر ۲۰۲۳ BioNTech پروژه ای را در بریتانیا آغاز کرده تا واکسن های mRNA درمانی شخصی سازی شده را در یک برنامه ملی به بیماران عرضه کند؛ هدف این برنامه، واکسیناسیون حداقل ۱۰/۰۰۰ بیمار سرطانی با واکسن mRNA تا سال ۲۰۳۰ است.

همچنین، BioNTech در حال کار روی ترکیب واکسن های mRNA با آنتی بادی های مهارکننده نقاط واریسی ایمنی (ICIs) و ویروس های آنکولیتیک برای افزایش اثربخشی است.

پیش بینی می شود که اولین واکسن های درمانی سرطان مبتنی بر mRNA تا سال ۲۰۳۰ مجوزهای رسمی (FDA/EMA) را دریافت کنند، به ویژه در حوزه ملانوما و NSCLC. مزیت های این پلتفرم شامل طراحی سریع و شخصی سازی شده، تولید در مقیاس بزرگ، و قابلیت به روزرسانی سریع با داده های ژنومیک بیمار است. بر اساس گزارش های تحلیل بازار، انتظار می رود ارزش بازار جهانی واکسن های سرطان mRNA تا اوایل دهه ۳۰ میلادی به چندین میلیارد دلار برسد. این فناوری علاوه بر نقش درمانی، به عنوان واکسن پیشگیری کننده برای افراد در معرض ریسک بالا نیز در حال بررسی است. پژوهش ها نشان می دهد که ترکیب واکسن mRNA با درمان های استاندارد و طراحی چند اپی توپی می تواند شانس پاسخ ایمنی ضد توموری را به طور معناداری افزایش دهد.

واکسن های درمانی سرطان مبتنی بر پپتید طی دهه گذشته پیشرفت قابل توجهی داشته اند و همچنان یکی از مهم ترین پلتفرم های تحقیقاتی باقی مانده اند. این واکسن ها با هدف قرار دادن اپی توپ های اختصاصی آنتی ژن های توموری طراحی می شوند و به دلیل سهولت سنتز، ایمنی بالا و انعطاف پذیری در طراحی، در بیش از ۱۰ کارآزمایی بالینی فاز I تا III برای سرطان های ملانوما، NSCLC، پروستات، پانکراس و کولورکتال در حال ارزیابی هستند. برخی از این واکسن ها، به ویژه در ترکیب با checkpoint inhibitors، نتایج نویدبخشی در افزایش نرخ بقا و پاسخ ایمنی در بیماران نشان داده اند.

واکسن های مبتنی بر DNA نیز به ویژه در هدف گیری سرطان دهانه رحم (HPV-Associated) و ضایعات پیش سرطانی مانند CIN2/3 با واکسن VGX-3100 موفقیت های بالینی کسب کرده اند. داده ها حاکی است این واکسن ها پاسخ های ایمنی سلولی و هومورال قوی ایجاد می کنند و چندین کاندید آن ها در فازهای II و III بالینی هستند.

شواهدی در حال ظهور است که نشان می دهد این پلتفرم ها می توانند برای مراحل اولیه سرطان یا حتی به عنوان پیشگیری ثانویه در افراد با ریسک ژنتیکی بالا استفاده شوند. به عنوان نمونه، واکسن های پپتیدی علیه MUC1 در بیماران با آدنوم پیش سرطانی کولورکتال پاسخ ایمنی مطلوبی ایجاد کرده اند. همچنین، واکسن DNA VGX-3100 در بیماران با دیسپلازی دهانه رحم (مرحله پیش سرطانی) نتایج مثبت داشته است. برخی مطالعات در افراد سالم با جهش BRCA یا سندرم Lynch نیز در حال ارزیابی اثربخشی واکسن های درمانی/پیشگیری کننده هستند. این یافته ها مسیر را برای استفاده از واکسن ها در مراحل اولیه سرطان یا جمعیت های پرخطر باز کرده اند.

بازار جهانی واکسن های سرطان با CAGR حدود ۱۳ درصد رو به رشد است و پیش بینی می شود تا ۲۰۳۲ از ۲۵ میلیارد دلار فراتر رود. رشد سریع این حوزه مدیون ترکیب واکسن ها با checkpoint inhibitors، توسعه واکسن های نئوآنتی ژن شخصی سازی شده و استفاده از یادگیری ماشین در طراحی اپی توپ ها است.

واژگان کلیدی:

Cancer vaccine, Sipuleucel-T, Peptide, mRNA cancer vaccine, Personalized cancer vaccine

اقلام (ابزار، مواد، تکنولوژی، زیرساخت) مورد نیاز:

- رده های سلولی و مواد و تجهیزات لازم برای انجام تست های QC
- مواد و تجهیزات لازم برای کشت، فعال سازی و تکثیر سلول و یا تولید بیولوژیک یا سنتز شیمیایی پپتید و یا پروتئین، سنتز الیگونوکلئوتید با توجه به نوع واکسن انتخاب شده و تخلیص و فرمولاسیون نهایی
- مدل حیوانی و آزمایشگاه مناسب برای مطالعات پیش بالینی

بیان و تشریح پروژه:

هدف نهایی این پروژه ساخت محصول کاملاً مشابه واکسن های سرطانی دارای داده های امیدبخش و اثبات شده ی بالینی ۱ ست. لازم است با ارائه شواهد علمی ثابت شود پلتفرم انتخابی احتمال موفقیت بالایی در طی مراحل توسعه بالینی خواهد داشت. همچنین نوع سرطان انتخاب شده یکی از سرطان های شایع در کشور باشد. اولویت حمایت به ترتیب با پیشنهادهایی خواهد بود که توسعه ی فرآورده ی تأیید شده یا در حال ارزیابی در فازهای انتهایی کارآزمایی بالینی را هدف گذاری کرده باشند.

تمامی مراحل پروژه شامل طراحی، سنتز یا کشت، فرمولاسیون، تخلیص، آزمون های کیفی و کمی، و مطالعات پیش بالینی باید به گونه ای برنامه ریزی شوند که داده های به دست آمده امکان تهیه مستندات CTD و ثبت CTA را فراهم سازند. پیشنهاد می شود امکان پذیری فنی و اقتصادی پلتفرم در پیشنهاد برر سی شود و قابلیت توسعه به واکسن های شخصی سازی شده یا ترکیب با سایر درمان های ایمنی (در صورت امکان) تشریح شود.

۲. درمان های ترکیبی ایمونوتراپی برای استفاده در کار آزمایی بالینی

مقیاس پروژه (پژوهشی، شبیه سازی، امکان سنجی، آزمایشگاهی، پایلوت، صنعتی، زیرساختی):
کار آزمایی بالینی

خروجی های مورد انتظار:

۱. به روزرسانی و ارائه گزارش نتیجه کار آزمایی بالینی حاصل از پروتکل ثبت شده در سامانه IRCT.
۲. ثبت کار آزمایی بالینی در ClinicalTrials.gov.
۳. انتشار حداقل یک مقاله (مستخرج از طرح) در مجلات JCR نمایه شده در پایگاه Web of Science در سطح Q1.
۴. چنانچه طراحی پروتکل یا فرمولاسیون ایمونوتراپی ترکیبی دو جزئی بوده و یکی از اجزا در دسته فرآورده های متداول (Conventional) باشد ارائه تأییدیه CTA از سازمان غذا و دارو به عنوان حداقل خروجی در نظر گرفته خواهد شد.

اهمیت و آینده حوزه در دنیا:

رویکردهای درمان ترکیبی سرطان مسیره های متعددی را در ریز محیط توموری علیه سلول های سرطانی هدف قرار می دهند که به طور بالقوه می توانند اثربخشی ایمونوتراپی را افزایش دهند. بررسی روند ثبت کار آزمایی های بالینی جدید نشان می دهد که کار آزمایی های بالینی که مهارکننده های PD-1/PDL-1 را در ترکیب با سایر روش های ایمنی درمانی، درمان هدفمند، شیمی درمانی و پرتودرمانی ارزیابی می کنند، به طور پیوسته در حال افزایش هستند، در حالیکه آزمایش های بالینی که مهار PD-1/PDL-1 را به عنوان تک درمانی آزمایش می کنند، به طور پیوسته رو به کاهش هستند. بر اساس تجزیه و تحلیل اخیر، بیش از ۵۰۰۰ کار آزمایی بالینی ثبت شده است که ۸۵ درصد آن به صورت کار آزمایی بالینی ترکیبی است.^۴ تعداد زیادی از این کار آزمایی های بالینی در حال ارزیابی رژیم های PD-1/PDL-1 در ترکیب با ایمونوتراپی های مختلف، درمان های هدفمند، شیمی درمانی و پرتودرمانی هستند. علاوه بر مسیر PD-1/PD-L1، مسیره های TIM-3، LAG-3، TIGIT، نیز در ترکیب با داروهای هدفمند متابولیک مانند IDO1 و CD73 در حال مطالعه بالینی ترکیبی هستند. تعداد آنتی بادی های دو یا چند اختصاصی علیه محورهای ایمنی به بیش از ۱۱۰ کاندید توسعه یافته رسیده است که برخی وارد فازهای بالینی شده اند. به نظر می رسد، آنتی بادی های دو اختصاصی در ترکیب با ایمونوتراپی Anti PD-1/PDL-1 به طور فزاینده ای مورد توجه پژوهشگران قرار گیرند. در سال ۲۰۱۵ پروژه های بین المللی تحت عنوان The Halifax project انجام شد که در آن رویکرد مشابهی برای طراحی بهترین روش های درمانی برای هر سرطان انجام شده است. استفاده از نتایج این تحقیق گسترده، برای طراحی مدل بهینه درمان هر نوع سرطان می تواند بسیار کمک کننده باشد.

Combination therapy^۳

^۴ این نسبت در سال ۲۰۲۳، ۸۳ درصد بود

شواهد روبه رشد نشان می دهد که میکروبیوم انسان، به ویژه میکروبیوتای روده، نقش کلیدی در تعیین نحوه پاسخ به ایمنی درمانی ایفا می کند. مطالعات بالینی اخیر ثابت کرده اند که ترکیب خاصی از باکتری های مفید می تواند اثر مهارکننده های نقاط واریسی ایمنی (مانند PD-1/PD-L1) را افزایش دهد، در حالی که دیس بیوزیس ممکن است مقاومت به درمان ایجاد کند. از این رو، طراحی درمان های ترکیبی که شامل اصلاح میکروبیوم (با پروبیوتیک ها، پری بیوتیک ها یا حتی FMT) همراه با ایمونوتراپی باشند، یک رویکرد نوین و آینده دار محسوب می شود. افزودن یک بازوی تحقیقاتی برای ارزیابی مداخلات مبتنی بر میکروبیوم در کنار رویکردهای مرسوم می تواند به شناسایی ترکیبات درمانی با کارایی و ایمنی بهبود یافته کمک کند.

طراحی منطقی رویکردهای ترکیبی با استفاده از فرآورده های درمانی سرطان که واجد تأییدیه استفاده در بالین هستند با ایمونوتراپی نیازمند مشارکت پژوهشگران متخصص در حوزه های تحقیقاتی مختلف از جمله زیست شناسی سرطان، هال مارک های سرطان، مسیرهای متابولیک و ... است. از این رو علاوه بر دانش زیست شناسی سرطان، لازم است به نتایج بازدهی، ایمنی، دینامیک دارویی و ... در داروها و درمان های واجد مجوز موجود و نیز میزان هزینه آن ها برای انتخاب نهایی ترکیب دارویی توجه شود. اهمیت دیگر این موضوع در پیشنهاد ترکیب بهینه داروهای مجوزدار برای استفاده در بالین است. از آنجا که فرایند توسعه ی داروی جدید با صرف هزینه بالایی همراه است، می توان از ترکیب بهینه داروهای موجود واجد مجوز برای کارایی بهتر در بالین بهره برد. لازم به ذکر است مشارکت یک تیم متخصص از پژوهشگران علوم پایه و نیز پزشکان انکولوژیست در طراحی رویکرد ایمونوتراپی ترکیبی و کارآزمایی بالینی یک امتیاز برای تصویب پیش نویس طرح تحقیقاتی این پروژه محسوب خواهد شد.

در این فراخوان درمان های ترکیبی برای بیماری های خود ایمنی که دارای یک جز ایمونوتراپی باشند نیز مورد

بررسی قرار خواهند گرفت.

امکان پذیری و توسعه دهنده گی ظرفیت فعلی ایران:

تاکنون داروها و روش های درمانی متعددی برای درمان سرطان های مختلف مجوز استفاده در بالین را دریافت کرده اند. علیرغم دریافت درمان های استاندارد، در اغلب موارد ناهمگنی زیاد سلول های سرطانی در سطح ژنتیکی و اپی ژنتیکی منجر به عود مجدد بدخیمی بعد از درمان می شود. طراحی هوشمند ترکیبی از داروها یا روش های درمانی واجد مجوز استفاده در بالین پتانسیل زیادی دارد تا با هدف گیری چند منظوره سلول های سرطانی باعث لیز کامل سلول ها در توده ی ناهمگن سرطانی شود. استفاده از روش های مختلف ایمونوتراپی در ترکیب با سایر درمان های متداول سرطان نیز می تواند باعث ایجاد ایمنی سیستمیک علیه سلول های سرطانی شده و از عود مجدد بیماری و متاستاز آن به نواحی دیگر بدن جلوگیری نماید. صنعت تولید داروهای شیمی درمانی و آنتی بادی مونوکلونال در ایران به بلوغ نسبی رسیده است و در این زمینه محصولات متعددی مجوز استفاده ی بالینی دریافت کرده اند. از طرف دیگر چند شرکت دانش بنیان نیز به عرصه ی ایمونوتراپی مبتنی بر سلول ورود کرده اند. توسعه ی رژیم ها یا داروهای ایمونوتراپی ترکیبی برای سرطان می تواند علاوه بر کمک به سلامت عمومی جامعه به بهره برداری بیشتر از پتانسیل این صنایع مستقر در کشور نیز کمک نماید.

واژگان کلیدی:

سرطان، ایمنی درمانی، سلول درمانی، شیمی درمانی، آنتی بادی مونوکلونال، پرتودرمانی.

اقلام (ابزار، مواد، تکنولوژی، زیرساخت) مورد نیاز:

- نرم افزارها و پایگاه های داده ی بیوانفورماتیکی برای اثبات مفهوم اثربخشی رویکرد درمانی ترکیبی در سطح In silico.
- کلیه ی زیرساخت های نرم افزاری و سخت افزاری که در چهارچوب موضوع مطالعه برای اجرای کارآزمایی بالینی مورد نیاز است.

بیان و تشریح پروژه:

در این پروژه لازم است بر مبنای داده های خروجی از کارآزمایی های بالینی و مطالعات پیش بالینی یک رویکرد ایمونوترابی ترکیبی مبتنی بر منطق علمی و با استفاده از فرآورده های واجد مجوز استفاده در بالین طراحی شود. در صورت امکان مطلوب است اثربخشی رویکرد درمانی ترکیبی در سطح In silico اثبات شده باشد. ارائه ی مستندات علمی و داده های اثبات مفهوم اثربخشی رویکرد درمانی ایمونوترابی ترکیبی (حاصل از مطالعات بیوانفورماتیکی، در شیشه و پیش بالینی) در پروپوزال برای طی فرایند تصویب پروژه الزامی است. پیش نویس پروژه باید توسط شورای علمی دانشکده/ پژوهشکده مورد بررسی قرار گیرد. طرح های تحقیقاتی که مستندات مربوط به اخذ تأییدیه شورای علمی دانشکده/ پژوهشکده را همراه با پیش نویس طرح تحقیقاتی ارسال نمایند در روند داوری پروژه اولویت خواهند داشت. نهایتاً پس از اخذ تأییدیه های لازم، پروتکل کارآزمایی بالینی باید در سامانه IRCT ثبت و کارآزمایی بالینی مطابق مقررات وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی اجرا گردد.

اهداف پروژه:

هدف این پروژه توسعه ی رویکردهای ایمونوترابی ترکیبی مبتنی بر منطق علمی و نتایج کارآزمایی های بالینی با استفاده ترکیبی از فرآورده هایی درمانی است که واجد مجوز استفاده در بالین باشند. در مرحله ی بعد اثربخشی رویکرد درمانی ترکیبی باید در کارآزمایی بالینی ارزیابی شود. در ادامه، مستندسازی مسیر توسعه فرآورده و ایجاد همکاری با شرکت های تامین کننده دارو به عنوان بخشی از اهداف تکمیلی است.

شرایط اولیه ضروری برای تصویب پیش نویس طرح تحقیقاتی:

۱. حداقل یکی از مواد موثره در فرمولاسیون یا رویکرد ایمونوترابی ترکیبی باید ماهیت و منشاء "بیولوژیک" داشته باشد.
۲. همه اجزای پروتکل درمانی باید واجد مجوز سازمان غذا و دارو باشند (این شرط برای اجزای مرتبط با حوزه ATMP از درمان ترکیبی ضروری نیست).
۳. ارائه مستندات کافی برای اثبات منطق علمی اثربخشی رویکرد ایمونوترابی ترکیبی در پروپوزال ضروری است. این بخش پارامتر اصلی امتیازدهی به پروپوزال ها خواهد بود.

❖ شاخص های تشویقی برای پیش نویس طرح تحقیقاتی:

۱. پروژه هایی که با مشارکت توانان پژوهشگران متخصص در حوزه بالینی و علوم پایه در تیم تحقیقاتی طراحی و ارائه شوند در اولویت تصویب خواهند بود.

۲. طرح های تحقیقاتی در راستای موضوع پروژه که قبلاً مورد تأیید شورای علمی دانشکده/ پژوهشکده قرار گرفته باشند در روند داوری از اولویت برخوردار خواهند بود. بنابراین مستندات مربوط به تأییدیه شورای علمی باید همراه با پیش نویس طرح تحقیقاتی ارسال گردد.
۳. طرح های تحقیقاتی در چهارچوب موضوع پروژه که قبلاً موفق به اخذ تأییدیه ی اخلاقی شده باشند در روند داوری از اولویت برخوردار خواهند بود. بنابراین مستندات مربوط به اخذ تأییدیه ی اخلاقی باید همراه با پیش نویس طرح تحقیقاتی ارسال گردد.
۴. طرح های تحقیقاتی در راستای موضوع پروژه که قبلاً در سامانه IRCT ثبت شده باشند در روند داوری از اولویت برخوردار خواهند بود. بنابراین مستندات مربوط به ثبت در سامانه IRCT باید همراه با پیش نویس طرح تحقیقاتی ارسال گردد.
۵. طرح هایی که با مشارکت و حمایت تامین کنندگان داخلی داروی مورد استفاده در مطالعه بالینی انجام شوند در روند داوری پیش نویس طرح تحقیقاتی از اولویت برخوردار خواهند بود.
۶. طرح هایی که با حمایت همکار بین المللی انجام شوند در روند داوری پیش نویس طرح تحقیقاتی از اولویت برخوردار خواهند بود.
۷. چنانچه در طراحی مطالعه اصول پزشکی شخصی سازی شده متناسب با جمعیت هدف رویکرد درمانی در نظر گرفته شود، پروژه در روند تصویب و داوری از اولویت برخوردار خواهد بود.

شرایط پرداخت اولین نوبت بودجه پژوهشی:

۱. اخذ تأییدیه شورای علمی دانشکده/ پژوهشکده.
۲. اخذ تأییدیه اخلاق.
۳. ثبت پروتکل و اخذ کد در سامانه IRCT.

۳. توسعه روش های کنترل کیفی فرآورده های ویروسی مطابق استانداردهای جهانی

مقیاس پروژه (پژوهشی، شبیه سازی، امکان سنجی، آزمایشگاهی، پایلوت، صنعتی، زیرساختی):
آزمایشگاهی، زیرساخت آزمایشگاهی مورد تأیید ملی

پیش شرط های ورودی پیشنهاد به مرحله ی داوری:

۱. ارائه معرفی نامه و وجود رابطه ا ستخدامی بین ا ستاد هیئت علمی (مجری ا صلی) و همکاران طرح با یک شخصیت حقوقی ارائه دهنده زیر ساخت و تجهیزات (شرکت دانش بنیان، شرکت فناور، یا مرکز خدمات تخصصی وابسته به دانشگاه/پژوهشگاه)

۲. گروه تحقیقاتی باید سابقه ی همکاری با سازمان غذا و دارو داشته باشد.
❖ بارگذاری مستندات مربوط به موارد فوق در سامانه کاپیر الزامی است.

خروجی های پروژه:

۱. معرفی آزمایشگاه محل اجرای پروژه به عنوان آزمایشگاه صلاحیت دار سازمان غذا و دارو برای تست های کنترل کیفی فرآورده های ویروسی.
۲. ارائه ی SOP های مورد تأیید سازمان غذا و دارو.
۳. ثبت تمامی خدمات مورد حمایت در لبزنت.
۴. ارائه خدمات به جامعه ی پژوهشی.

اهمیت و آینده حوزه در دنیا:

در سال های اخیر، فرآورده های ویروسی به عنوان یکی از ستون های اصلی درمان های نوین در حوزه های ژن درمانی، سلول درمانی، واکسن سازی و ایمنی درمانی مطرح شده اند. با این حال، موفقیت بالینی و پذیرش قانونی این فرآورده ها مستلزم انطباق کامل با الزامات سازمان های ناظر مانند FDA، EMA و WHO در زمینه کنترل کیفیت (Quality Control) است. هرگونه نقص در کنترل کیفی می تواند منجر به بروز عوارض ناخواسته، کاهش اثربخشی، آلودگی متقاطع یا حتی توقف پروژه های بالینی شود. در همین راستا، توسعه و پیاده سازی روش های دقیق، قابل اعتماد و استاندارد در کنترل کیفی فرآورده های ویروسی، نه تنها پیش شرط ورود این محصولات به فازهای بالینی و بازار است، بلکه نقش کلیدی در حفظ ایمنی بیماران، اعتبار تولیدکنندگان و موفقیت درمان های زیستی نوین دارد. این پروژه با هدف هم راستا سازی روش های QC در ایران با معیارهای جهانی، می تواند نقشی مؤثر در ارتقاء توانمندی صنعت زیست فناوری کشور و تسریع مسیر تولید محصولات پیشرفته بازی کند.

در سطح بین المللی، آزمایشگاه های آکریدیتیه ای که توسط سازمان های نظارتی مانند FDA (سازمان غذا و داروی آمریکا)، EMA (آژانس دارویی اروپا) یا تحت چارچوب استانداردهای OECD GLP تأیید شده اند، مسئول انجام آزمون های دقیق کنترل کیفی برای فرآورده های دارویی و بیولوژیکی هستند. از جمله شناخته شده ترین این مراکز می توان به موارد زیر اشاره کرد: Charles River Laboratories (آمریکا، کانادا، اروپا): یکی از بزرگ ترین ارائه دهندگان خدمات GLP در زمینه کنترل کیفیت و مطالعات پیش بالینی برای واکسن ها و ژن درمانی و سلول درمانی.

Eurofins Scientific (اروپا و آمریکا): شبکه‌ای گسترده از آزمایشگاه‌های آکریدیته که خدمات کنترل کیفیت، آنالیزهای زیستی و میکروبی، و تست‌های ویروسی را ارائه می‌دهند. گروه یوروفینز دارای شبکه‌ای بین‌المللی متشکل از بیش از ۹۰۰ آزمایشگاه در ۶۲ کشور است و مجموعه‌ای شامل بیش از ۲۰۰'۰۰۰ روش تحلیلی تأیید شده برای شناسایی ایمنی، هویت، خلوص، ترکیب، اصالت و منشاء محصولات و مواد زیستی در اختیار دارد. همچنین، یوروفینز خدمات آزمایش‌های تشخیص بالینی و محصولات تشخیص (in-vitro) را نیز ارائه می‌دهد.

مؤسسه ملی استانداردها و کنترل‌های زیستی (NIBSC): یک نهاد دولتی بریتانیایی است که زیر نظر سازمان نظارت بر داروها و محصولات بهداشتی بریتانیا (MHRA) فعالیت می‌کند و مسئول توسعه، تولید و توزیع درصد بالایی از استانداردهای زیستی بین‌المللی مورد استفاده در سراسر جهان می‌باشد. این مؤسسه به عنوان آزمایشگاه رسمی کنترل داروهای زیستی در بریتانیا شناخته شده و وظیفه انجام آزمایش‌های نظارتی مستقل بر محصولات زیستی در چارچوب اتحادیه اروپا و سازمان بهداشت جهانی (WHO) را بر عهده دارد.

علاوه بر این‌ها، آزمایشگاه‌های دیگری مانند **SGS Life Sciences** (سوئیس) و **Labcorp Drug Development** نیز در زمینه تست‌های **GMP/GLP** و کنترل کیفی محصولات ویروسی و زیستی فعال هستند و نقش مهمی در چرخه تولید و تضمین کیفیت دارند.

امکان پذیری و توسعه دهنده‌گی ظرفیت فعلی ایران:

در ایران، با رشد روزافزون مراکز تحقیقاتی، شرکت‌های دانش‌بنیان و تولیدکنندگان فرآورده‌های بیولوژیک، به‌ویژه در حوزه محصولات نوین سلولی، نیاز به توسعه‌ی زیرساخت‌های استاندارد کنترل کیفی بیش از هر زمان دیگری احساس می‌شود. با توجه به چشم‌انداز علمی کشور در مورد رشد فناورانه در حوزه فناوری‌های زیستی، نبود روش‌های کنترل کیفی مطابق با استانداردهای جهانی، می‌تواند به‌عنوان مانعی جدی در مسیر دریافت تأییدیه‌ها و اجرای کارآزمایی‌های بالینی در سطح جهانی عمل کند. از سوی دیگر، افزایش تمایل به استفاده از درمان‌های نوین در داخل کشور، لزوم تأمین ایمنی و کارایی محصولات را بیش از پیش ضروری ساخته است. توسعه‌ی روش‌های بومی‌شده و معتبر کنترل کیفی فرآورده‌های ویروسی، نه تنها زمینه‌ساز ارتقای سلامت جامعه است، بلکه عاملی کلیدی برای استقلال علمی و فناورانه کشور در حوزه درمان‌های پیشرفته به‌شمار می‌رود.

به‌رغم وجود ظرفیت‌های علمی و تجربی در حوزه تولید فرآورده‌های ویروسی در ایران، نبود روش‌های اعتبارسنجی‌شده و مستندسازی‌شده برای بسیاری از آزمون‌های کلیدی (QC) مانند سنجش توان زیستی، **Replication Competence** و خلوص کپسیدهای ویروسی) و همچنین فقدان آموزش سیستماتیک پرسنل بر اساس **GLP/ICH Q2**، از جمله موانع اصلی توسعه کنترل کیفی در کشور محسوب می‌شود.

واژگان کلیدی:

Viral product, Quality control (QC), Good Laboratory Practice (GLP), Sterility testing, Potency assay, ...

بیان و تشریح پروژه:

دریافت تأییدیه های نظارتی برای وکتورهای ویروسی دارای ملاحظات و معیارهای خاص برای هر مرحله از فرایند می باشد که باید پیش از ورود به مرحله بعدی، به طور کامل برآورده شوند. پس از طراحی محصول اثر بخش و بهینه سازی فرایند جهت تولید مقیاس پذیر، ایمنی محصول باید مورد ارزیابی کامل قرار بگیرد. دریافت تأییدیه های نظارتی نیاز به مستندسازی کامل اصول و فرایندهای تولید، آزمون و کنترل کیفی دارد (CMC)^۵ دارد که رکن اصلی هر پرونده نظارتی است. در سال ۲۰۲۰، حداقل ۱۴ پرونده ژن درمانی یا درخواست مطالعه توسط نهادهای نظارتی به دلیل نبود مستندات CMC به تعویق افتاد یا رد شد.

با وجود پیشرفت هایی که طی سال های اخیر در حوزه ژن درمانی حاصل شده و رشد تعداد محصولات در مرحله توسعه و کارآزمایی بالینی، این حوزه همچنان در مقایسه با سایر زیست داروها نظیر آنتی بادی های مونوکلونال (mAbs) و پروتئین های نوترکیب، در مراحل ابتدایی خود قرار دارد. کنترل ویژگی های کیفی پراهمیت^۶ در مراحل مختلف فرایند از فیلتراسیون اولیه محیط کشت تا فیلتراسیون نهایی استریل موجب اطمینان از تولید محصول ایمن، اثرگذار و عاری از آلودگی و ناخالصی خواهد شد. کنترل ویژگی های کیفی از طریق تعریف پارامترهای تاثیرگذار فرایند (CPP)^۷، مقادیر قابل قبول آنها و پایش آن در سراسر فرایند به کنترل ویژگی های کیفی در محدوده مناسب منجر خواهد شد.

اسناد راهنمای بین المللی مانند

Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs)- Guidance for Industry - January 2020

می بایست در تعریف پارامترها و ویژگی کیفی مورد استفاده قرار بگیرد.

یک آزمایشگاه کنترل کیفی مستقل از واحد تولید باید قادر باشد ارزیابی کیفی کامل وکتورهای ویروسی را به طریقی که مشخصه یابی کامل آن را تضمین نماید مانند روش های توالی یابی به انجام برساند. مشخصه یابی کامل مواد سلولی استفاده شده بر طبق استانداردهای بین المللی مانند

ICH Topic Q 5 D Quality of Biotechnological Products: Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products

جهت اطمینان از پایداری تولید عاری از آلودگی باید به طور کامل پایه گذاری و به انجام برسد. کنترل کیفی مواد اولیه مورد استفاده در فرایند از طریق روش های آزمون مناسب موجب پایداری تولید در بچ های مختلف تولید^۸ خواهد شد و باید در فرایند کاری آزمایشگاه تعریف شود.

لازم است تمامی مراحل فرایندی بر اساس روش های استاندارد کار^۹ تصویب شده انجام شود. همچنین می بایست کلیه مواد و تجهیزات استفاده شده دارای مستندات احراز کیفیت و یا اعتبار سنجی مربوطه مانند گواهی آنالیز (COA)، گواهی کالیبراسیون و IQ/OQ/PQ Documentation باشد. افزودن هر نوع ترکیب شیمیایی در حین فرایند، نیاز به حذف آن ترکیب در مراحل بعدی فرایند را به دنبال خواهد داشت که می بایست مستندات مربوطه آماده شود. لذا توسعه یک روش آزمون جهت اثبات

^۵Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC)

^۶Critical Quality Attributes (CQAs)

^۷Critical Process Parameters (CPPs)

^۸Batch to Batch Consistency

^۹Standard operating procedure (SOP)

حذف ترکیبات ناخواسته توسط آزمایشگاه کنترل کیفی انجام شود. توسعه روش آزمون مناسب و معتبر سازی روش های آزمون باید برای همه روش های آنالیز به صورت مستند منطبق بر اسناد راهنمای بین المللی مانند ICH guideline Q2(R2) on validation of analytical procedures به انجام برسد.

آنالیز محصول نهایی به منظور بررسی ایمنی محصول، از طریق ارزیابی استریل بودن محصول، ارزیابی وجود مایکوپلاسما، اندوتوکسین و آلودگی های ویروسی و میکروبی و در موارد لازم Replication competent بودن باید توسط آزمایشگاه کنترل کیفی انجام شود.

همچنین مشخصه یابی محصول نهایی مانند بررسی ناخالصی ها وابسته به فرایند و ناخالصی های وابسته به محصول^{۱۲} Identity، فعالیت و اثربخشی و مطالعات پایداری باید توسط آزمایشگاه کنترل کیفی انجام شود.

استفاده از روش های آزمون مختلف که مستندات معتبر سازی آنها فراهم شده است در تمامی مراحل فرایند تولید ضروری می باشد. ارزیابی های مختلف مانند موارد زیر از جمله تست هایی می باشد که باید توسط آزمایشگاه کنترل کیفی انجام شود. همچنین علاوه بر موارد زیر با توجه به ماهیت متنوع روش های تولید محصولات مرتبط با وکتور های ویروسی و روش های درمانی نوین، طراحی مناسب روش های جدید منطبق بر استاندارد های بین المللی از وظایف ذاتی آزمایشگاه کنترل کیفی می باشد.

۱- Virus titer assay:

Item	Name	Suggested Method(s)
۱	Viral Genome (VG/ml)	QPCR
۲	Viral Particle (VP/ml)	Antibody based - ELISA, SPR
۳	Functional virus	TCID ₅₀ , Flowcytometry, Microscopy
۴	Titer assay	SEC-HPLC

۲- Virus-related impurity

Item	Name	Suggested Method(s)
۱	Incorrectly packaged virus	PCR, Sequencing
۲	Empty and partially filled viral particles	TEM, CE, IEX-HPLC, sedimentation velocity analytical ultracentrifugation (AUC)
۳	Free viral proteins	SEC-HPLC, ELISA
۴	Aggregation	SEC-HPLC, TEM, DLS

^۱Analytical Method Development

^۲Analytical Method Validation

^۳Process related impurities and product related impurities

۳- Impurity assay

Item	Name	Suggested Method(s)
۱	Total protein (ug/ml)	BCA , ELISA
۲	Total DNA (ng/ml)	PicoGreen, , QB, realtimePCR
۳	Adventitious virus and microbes	Culture , PCR
۴	HcDNA	QPCR
۵	HCP	ELISA
۶	Sterility	Culture

۴- Characterization

Item	Name	Suggested Method(s)
۱	Viral protein identity Purity and Integrity check by SDS_PAGE	SDS-PAGE Western Blot
۲	Virus structure	TEM
۳	Size Distribution	DLS

۵- Residual

Item	Name	Suggested Method(s)
۱	Leaked affinity ligand	ELISA kit
۲	Detergent residual	LC-MS
۳	Transfection reagent	
۴	residual assay for domiphen bromide	RP_HPLC, LC-MS

در این پروژه، ابتدا با مرور سیستماتیک مستندات و راهنماهای منتشر شده از سوی مراجع بین المللی (مانند EMA, FDA و WHO)، مجموعه ای جامع از الزامات کیفی و آزمون های مورد تأیید برای فراورده های ویروسی گردآوری می شود. سپس با دسته بندی این آزمون ها در حوزه هایی مانند: تعیین هویت، توان عفونت زایی، تیتروسی، خلوص، استریلیتی، تست های میکروبی، اندوتوکسین، بقایای مواد فرایند، و ویروس های تکثیر پذیر، روش های موجود برای انجام هر آزمون تحلیل و با یکدیگر مقایسه می شوند (از نظر حساسیت، اختصاصیت، هزینه و امکان پذیری در آزمایشگاه های داخل کشور).

در ادامه، با هدف احداث یک یا چند آزمایشگاه GLP، امکان اعتبارسنجی عملی برخی از این روش ها مورد بررسی قرار می گیرد. همچنین، با شنا سایی چالش های اجرایی موجود در زیر ساخت های کنترل کیفی کشور، پیشنهادهایی جهت بهبود تجهیزات آموزش پرسنل، و بومی سازی کیت ها و روش ها ارائه خواهد شد.

مراحل لازم جهت اجرای این پروژه به تفصیل به شرح زیر است:

❖ در گام نخست، برنامه ریزی دقیق پروژه و ارزیابی الزامات مقرراتی باید انجام شود تا محدوده پروژه، چارچوب زمانی و الزامات قانونی به روشنی مشخص گردد. در این مرحله، ابتدا یک تحلیل جامع از شکاف میان توانمندی های فعلی آزمایشگاه های کنترل کیفی فعال در ایران، به ویژه آن دسته که در زمینه فراورده های بیولوژیک فعالیت دارند، و الزامات بین المللی مانند مقررات ۲۱ CFR بخش ۲۱۱ و راهنماهای ICH Q9 و Q10 صورت می گیرد. همچنین باید محدوده فراورده های ویروسی هدف تعریف شود. این فراورده ها که شامل محصولات ویروسی مورد استفاده در درمان های ژنی یا ویروس درمانی هستند عمدتاً بر پایه ویروس هایی نظیر آدنوویروس ها، لنتی ویروس ها و ویروس های وابسته به آدنو طراحی می شوند. در همین راستا، آزمون های کنترل کیفی مورد نیاز برای هر نوع وکتور ویروسی، از جمله سنجش توان زیستی (Potency)، خلوص (Purity)، هویت (Identity) و ایمنی (Safety)، به طور دقیق می بایست تعیین گردد.

برای پیشبرد این مرحله، لازم است یک تیم چند رشته ای متشکل از ویروس شناسان، متخصصان تضمین کیفیت، کارشناسان آنالیز داده و نمایندگانی از سازمان غذا و دارو تشکیل شود. این تیم مسئول تدوین و توسعه روش ها، اعتبارسنجی، آماده سازی برای بازرسی و سایر فعالیت های کلیدی خواهد بود.

در همین راستا، ارتباط با مشاوران مقرراتی و استفاده از برنامه های مشورتی پیش از ارسال سازمان غذا و دارو (نظیر Pre-IND) نیز برقرار می شود تا انتظارات سازمان از همان ابتدا به درستی تفسیر و در برنامه پروژه لحاظ شوند.

جلسات

❖ در مرحله دوم، می بایست توسعه روش های کنترل کیفی اختصاصی برای هر فراورده ویروسی در دستور کار قرار گیرد. ابتدا می بایست ویژگی های کیفی بحرانی (CQAs) مانند تیتروسی، عدم حضور عوامل خارجی، و بقایای سلولی شناسایی شوند. سپس مناسب ترین روش های ارزیابی متناسب با استاندارد سازمان غذا و دارو و امکانات کشور برای هر ویژگی انتخاب شده و با تدوین SOP های اولیه، فرایند توسعه روش آغاز می شود. این روش ها باید حساس، اختصاصی، تکرارپذیر و منطبق با استانداردهای GLP و سازمان های نظارتی طراحی و تدوین شوند. به صورت همزمان آموزش پرسنل آزمایشگاهی می تواند انجام شود که نقش بسیار کلیدی در تضمین کیفیت محصولات ویروسی دارند. ارتقاء دانش فنی، افزایش دقت در اجرای روش ها و آماده سازی پرسنل برای مواجهه با ممیزی ها و بازرسی های سازمان های نظارتی از اهداف اصلی این مرحله است.

❖ در مرحله سوم، آزمایشگاه های توانمند در حوزه توسعه تست های کنترل کیفی فراورده های ویروسی باید روش های طراحی شده را تحت فرایند اعتبارسنجی (Validation) قرار دهند. این اعتبارسنجی باید بر اساس دستورالعمل های بین المللی مانند ICH Q2(R1) و USP <1225> انجام شود تا اطمینان حاصل گردد که روش های مورد استفاده از نظر علمی و مقرراتی قابل قبول هستند. در این فرایند، ویژگی هایی نظیر دقت (Accuracy)، صحت (Precision)، تکرارپذیری (Repeatability)، خطی بودن (Linearity)، حد تشخیص (LOD) و حد سنجش (LOQ) هر آزمون مورد ارزیابی قرار می گیرند.

آزمایشگاه توسعه دهنده موظف است برای سنجش عملکرد روش های طراحی شده، نمونه های مرجع، نمونه های کنترل و نمونه های اسپایک شده را تهیه کرده و آنالیزهای لازم را با استفاده از این نمونه ها انجام دهد. نتایج حاصل از این مطالعات باید در قالب مستندات رسمی و استاندارد شده ثبت و گزارش شوند تا در صورت نیاز برای ارزیابی های نظارتی یا ثبت در پرونده های دارویی محصول و بررسی مورد استفاده قرار گیرند. در موارد خاص، به ویژه زمانی که هدف انتقال روش به سایر مراکز یا اثبات تکرارپذیری مستقل است، مطالعات بین آزمایشگاهی (Inter-laboratory studies) نیز اجرا می شود تا قابلیت اطمینان و پایداری روش از نظر عملکردی و اجرایی در محیط های مختلف بررسی گردد. ایجاد یک بانک ملی از مواد مرجع (Reference Standards) شامل ویروس های مرجع، DNA/RNA های کالبراسیونی و کیت های کنترل مثبت/منفی مطابق استانداردهای WHO و NIBSC، می تواند نقش کلیدی در اعتبارسنجی آزمون ها و تکرارپذیری داده های کنترل کیفی داشته باشد. توسعه این بانک باید به عنوان یکی از خروجی های کلیدی پروژه دیده شود.

❖ در ادامه فرایند اجرایی پروژه، زیر ساخت های آزمایشگاهی موجود توسط تیم توسعه دهنده تست های کنترل کیفی محصولات و بررسی باید از جنبه های فنی، تجهیزاتی و سیستمی به صورت کامل ارتقاء یابند تا الزامات مورد نیاز برای کار با فرآورده های ویروسی و همچنین الزامات ایمنی زیستی بین المللی برآورده شود. از آنجا که کار با ویروس ها، به ویژه ویروس های مهندسی شده برای درمان های ژنی یا ویروس درمانی، نیازمند استانداردهای ایمنی و کیفیتی بسیار دقیق و چندلایه است، آزمایشگاه باید حداقل در سطح BSL-2 یا BSL-2⁺ تجهیز و طراحی شود، و در موارد خاص بسته به نوع ویروس، ممکن است رعایت الزامات BSL-3 نیز ضروری باشد. طراحی فضاهای آزمایشگاهی شامل اتاق های تمیز (Cleanrooms) با فشار مثبت یا منفی، فیلترهای HEPA، سامانه های تهویه اختصاصی، کنترل آلودگی متقاطع و ایستگاه های کنترل دسترسی باید به گونه ای باشد که امنیت زیستی پرسنل، محیط و نمونه ها کاملاً تضمین شود. در بخش تجهیزات، تأیید صلاحیت (Qualification) تجهیزات کلیدی شامل دستگاه های PCR، RT-PCR، دستگاه های Real-Time، سامانه های HPLC، سیستم های فلو سیتومتری، اتوکلاو، تجهیزات کشت سلولی، انکوباتورها، و فریزرهای دمای پایین (-80°C) انجام شود. این فرایندها تضمین می کنند که تجهیزات به درستی نصب، عملکرد آنها طبق دستورالعمل سازنده ارزیابی و عملکرد نهایی آنها در شرایط واقعی آزمایشگاهی تأیید شده باشد.

با توجه به محدودیت منابع مالی و امکانات موجود در کشور، مهم ترین گلوگاه در توسعه روش های کنترل کیفی، مرحله انجام آزمون های تخصصی و نهایی محصول است؛ چرا که این مرحله نیازمند آزمایشگاهی مجهز با استانداردهای ایمنی زیستی و برخورد از تجهیزات پیشرفته برای اجرای تست های دقیق و قابل استناد کنترل کیفی می باشد. طراحی و اجرای مطالعات بین آزمایشگاهی (Inter-Laboratory Validation) برای اطمینان از تکرارپذیری و دقت آزمون های توسعه یافته، مطابق دستورالعمل های ICH Q2 و USP <1225> ضروری است.

❖ پس از آن، مرحله تهیه مستندات و ارسال درخواست به نهادهای مقرراتی و سازمان غذا و دارو انجام می شود. این مرحله شامل جمع کلیه گزارش های طراحی و توسعه، اعتبارسنجی، SOP ها، مستندات تجهیزات، و داده های پشتیبان برای ثبت آزمایشگاه به عنوان مرکز مورد تأیید سازمان غذا و دارو است. در صورت نیاز، پرونده CMC برای برخی محصولات خاص نیز آماده خواهد شد و درخواست رسمی برای بازرسی و ثبت ارسال می شود.

- ❖ در نهایت، در مرحله پایانی پروژه، تیم توسعه دهنده آمادگی لازم برای بازرسی و پیاده سازی عملیاتی روش های توسعه داده را پیدا می کند. ابتدا بازرسی های آزمایشی داخلی برای شناسایی شکاف ها انجام می شود، کلیه مستندات و سوابق برای ارائه به بازرسین سازمان غذا و دارو آماده می شود، و کارکنان برای مواجهه حرفه ای با پرسش های بازرسان آموزش می بینند. پس از عبور موفق از بازرسی، روش ها وارد فاز بهره برداری روتین می شوند و تیم توسعه دهنده آماده ارائه خدمات به محققین و فناوران توسعه دهنده محصولات ویروسی خواهد بود.
- ❖ پذیرش طرح در این فراخوان به صورت رقابتی خواهد بود. بنابراین آن دسته از پروپوزال ها که پیش شرط های ورودی را داشته باشند و تست هایی با سطح تکنولوژی بالاتر یا تعداد بیشتری از تست ها را پوشش دهند امتیاز بیشتری خواهند داشت.

۴. تولید ویروس انکولایتیک و/یا وکتورهای ویروسی در شرایط استاندارد

مقیاس پروژه:

پایلوت

پیش شرط های ورودی پیشنهاد به مرحله ی داوری:

۱. ارائه معرفی نامه و وجود رابطه استخدامی بین استاد هیئت علمی (مجری اصلی) و همکاران طرح با یک شخصیت حقوقی ارائه دهنده ی زیر ساخت و تجهیزات (شرکت دانش بنیان، شرکت فناوری، یا مرکز خدمات تخصصی وابسته به دانشگاه/پژوهشگاه).
 ۲. گروه تحقیقاتی باید در زمینه ی تولید وکتور یا فرآورده های ویروسی رزومه ی قوی پژوهشی یا سابقه ی کار صنعتی داشته باشند.
 ۳. شرایط ویروس/وکتور ویروسی انتخاب شده: نمونه بومی سازی شده یک محصول مجوزدار باشد و اثربخشی و ایمنی آن در سطح پیش بالینی به اثبات رسیده باشد.
- ❖ بارگذاری مستندات مربوط به موارد فوق در سامانه کایپر الزامی است.

خروجی های پروژه:

۱. تولید ویروس/وکتورهای ویروسی تحت شرایط GMP جهت استفاده در کارآزمایی بالینی
۲. رعایت استانداردها، شرایط و خروجی های تعیین شده در بخش "بیان و تشریح پروژه" برای ۳ پلتفرم ویروسی مختلف
۳. ارائه خدمات حمایتی به پژوهشگران و ارائه اطلاعات مربوط به این خدمات به بنیاد ملی علم ایران

اهمیت و آینده حوزه در دنیا:

تولید وکتورهای ویروسی یکی از زیرساخت های حیاتی در مسیر توسعه درمان های نوین مانند ژن درمانی، ایمونوتراپی است. به ویژه در فناوری های نظیر ویروس های انکولاییتیک، استفاده از وکتورهای ویروسی برای درمان نقص ژنتیکی و نیز سلول درمانی با سلول های مهندسی شده نظیر CAR-T، تولید بهینه و استاندارد وکتورهای ویروسی رکنی اساسی به شمار می شود. رشد سریع این حوزه ها گواهی بر تحول بنیادینی است که در زیست پزشکی مدرن در حال وقوع است. برای نمونه، ارزش بازار ژن درمانی تا سال ۲۰۳۰ با نرخ رشد سالانه حدود ۲۱,۷٪ به بیش از ۳۰ میلیارد دلار خواهد رسید و اندازه بازار CAR-T نیز با نرخ رشد سالانه بیش از ۲۰٪ تا ۱۰ میلیارد دلار افزایش می یابد. همچنین بازار ویروس های انکولاییتیک علی رغم حجم کمتر آن، با نرخ رشد بالای ۲۰٪ در حال رشد است. در همین راستا، تقاضا برای ویروس ها و وکتورهای ویروسی ایمن، مؤثر و قابل تولید در مقیاس بالینی، به شدت رو به افزایش است. شایان ذکر است برخی مطالعات بازار نرخ رشد سالیانه استفاده از وکتورهای ویروسی جهت انتقال ژن را ۱۴,۶ درصد اعلام کرده و پیش بینی می کنند حجم بازار این وکتورها تا سال ۲۰۳۴ به ۷,۶۲ میلیارد دلار برسد.

نگاهی به محصولات نوین زیست پزشکی که در سالهای اخیر تأییدیه سازمان غذا و دارو از کشورهای مختلف، از جمله تأییدیه FDA، را دریافت کرده اند نیز حاکی از اهمیت این حوزه است. تنها از سال ۲۰۲۴ تاکنون، سازمان غذا و داروی ایالات متحده (FDA) سه درمان جدید CAR-T، که از وکتور لنتی ویروس استفاده کرده اند، را تأیید کرده است. در بین محصولات مجوزدار سلول و ژن درمانی از وکتورهای ویروسی مختلفی مانند لنتی ویروس، آدنوویروس، AAV، هرپس سیمپلکس ویروس و رترو ویروس استفاده شده است.

طی ۵ سال گذشته، حوزه ژن درمانی موجی از داروهای مبتنی بر ناقل های ویروسی را شاهد بوده که موفق به دریافت تأییدیه های سازمان های نظارتی برای توسعه گزینه های درمانی برای بیماری های مختلفی از جمله سرطان و بیماری های تک ژنی شده اند. در حال حاضر سه ناقل ویروسی استراتژیک در حوزه درمان های نوین، وکتورهای مبتنی بر آدنوویروس ها، ویروس های مرتبط با آدنو (AAV) و لنتی ویروس ها هستند. این سه دسته ویروسی در دو دهه گذشته در موفقیت های بالینی و پیش بالینی پیشرو بوده اند. بررسی مطالعات علم سنجی، روندهای بازار و نیز مطالعات بالینی نشان دهنده رشد استفاده از ناقل های ویروسی در مطالعات علمی و بالین دارد. به طور خاص استفاده از وکتورهای مبتنی بر لنتی ویروس و AAV در دو دهه اخیر به طور میانگین در مقالات و پتنت ها شاهد روندی صعودی بوده اند. استفاده از آدنوویروس نیز تا سال ۲۰۰۶ روندی صعودی را در مقالات ژن درمانی تجربه کرده است. هرچند از این سال تا سال ۲۰۱۸ تعداد مقالات این حوزه کاهش یافته است اما از این سال تا کنون مجدداً تعداد مقالات این حوزه رشد داشته است. علاوه بر این در مطالعات بالینی فاز ۳ نیز چندین کارآزمایی مبتنی بر این ویروس بوده است که برای سرطان، هموفیلی و بیماری قلبی استفاده شده اند. علی رغم رشد فناوری استفاده از ناقل های ویروسی و رفع بسیاری از چالش های گذشته، این حوزه همچنان با چالش های بسیاری مواجه است که توجه و تلاش محققان را می طلبد. شواهد فوق نمایانگر اهمیت توسعه پلتفرم های ویروسی مناسب استفاده در بالین است.

(برای اطلاعات بیشتر به فایل "احصاء اولویتهای پژوهشی حوزه داروهای مبتنی بر نوکلئیک اسید و ژن درمانی" و "احصاء

اولویت های پژوهشی حوزه بیوتکنولوژی پزشکی "مراجعة شود).
امکان پذیری و توسعه دهنده گی ظرفیت فعلی ایران: تجربه محققین کشور در توسعه فناوری CAR-T برای درمان سرطان، توسعه ویروس های انکولایتیک و نیز خط تولید های موجود جهت تولید واکسن موجب ایجاد رسوب دانش و فناوری در حوزه تولید وکتورهای ویروسی شده است. هر چند همچنان راه زیادی تا رفع خلاهای موجود برای تولید وکتورهای ویروسی با صرفه اقتصادی و با استانداردهای لازم برای استفاده در بالین باقی مانده است. با وجود تجربیات موفق در توسعه CAR-T و تولید واکسن های ویروسی، هنوز زیرساخت های لازم برای تولید تحت شرایط کاملاً مطابق با GMP، شامل بانک های سلولی و ویروسی استاندارد، سامانه های اعتبارسنجی و خطوط تولید صنعتی مقیاس بالا، نیازمند توسعه و سرمایه گذاری هدفمند است. همچنین تربیت نیروی انسانی ماهر برای کنترل کیفیت و تضمین کیفیت بر اساس دستورالعمل های EMA/FDA ضروری است.
واژگان کلیدی: Viral vectors, Gene therapy, Oncolytic virus, Virotherapy, Adeno-associated viruses; Adenoviruses; Lentiviruses
بیان و تشریح پروژه: جایگاه مناسب ایران در حوزه زیست داروها و فناوری های مرتبط اهمیت همگام شدن با پیشرفت های جهانی در حوزه محصولات دارویی پیشرفته^{۱۳} (ATMPs) به عنوان نسل آینده درمان های زیستی را دوچندان می نماید. با توجه به اهمیت این حوزه در جهان و لزوم توسعه دانش و فناوری مرتبط در کشور، هدف این پروژه حمایت از پژوهشگرانی است که توسعه پلتفرم های ویروسی مناسب استفاده در تولید فراورده های نوین زیست پزشکی با قابلیت استفاده در بالین را هدف گذاری کرده اند. اولویت این پروژه تمرکز بر تولید وکتورهای ویروسی مبتنی بر ویروس هایی است که به طور مستقیم به عنوان عامل درمانی و یا به عنوان واسطه برای مهندسی سلول ها جهت درمان استفاده شده اند. در این پروژه گروه تحقیقاتی باید روش بهینه تولید و تخلیص را برای پلتفرم ویروسی منتخب طراحی و در مقیاس استفاده برای حدوداً ۱۰۰ بیمار در کارآزمایی بالینی تولید کند. بنابراین متقاضی ملزم است مراحل پیش بالینی جهت بررسی اولیه ویروس منتخب خود را سپری کرده باشد. پروتکل های تولید، خالص سازی و کنترل کیفیت باید با آخرین دستورالعمل های (ICH، EMA و FDA) ویرایش های ۲۰۲۳ و ۲۰۲۴ همراستا باشند، از جمله پایش دقیق میزان DNA میزبان، پروتئین های سلولی، ذرات ناقص، و تضمین عاری بودن از RCL و ویروس های کمکی. ارائه یک برنامه اعتبارسنجی فرایند (Process Validation) شامل آزمون های مقبولیت در مقیاس پایلوت الزامی است.

^{۱۳}Advanced Therapy Medicinal Products

همچنین دستیابی به تیتراژ مناسب و روش تولید با صرفه اقتصادی و خلوص بالا و انجام تست های آزمایشگاهی مربوطه لازم خواهد بود. بذریعویروس مورد نظر ممکن است از یکی از پروژه های در حال اجرای بنیاد تامین شود. انجام دهنده این پروژه صرفاً در فرایند توسعه یافته در همین تحقیق و نه محصول به دست آمده از بذریعویروس (در صورت تامین از سایر منابع) دارای حقوق مادی و معنوی خواهد بود. استانداردهای مورد انتظار برای هر ویروس به شرح زیر است:

• آدنوویروس

به دلیل حساسیت بالای سلول های HEK293 نسبت به طیف وسیعی از ویروس ها، این سلول ها کاربرد گسترده ای در تولید وکتورهای ویروسی، واکسن ها درمانی، ژن درمانی و همچنین ویروس انکولیتیک دارند. این کاربردهای متنوع، نیاز به حجم های مختلف تولید دارد، لذا توسعه پلتفرم های مقیاس پذیر برای تولید صنعتی آدنوویروس دارای اهمیت فراوان می باشد. استفاده از سلول های با قابلیت کشت معلق امکان تولید مقیاس پذیر در بیوراکتورهای Stirred-tank و یا Rocking bioreactor را فراهم می کند. در حالت چسبنده، سلول های HEK293 معمولاً در سیستم هایی مانند هایپر فلاسک (HyperFlask) یا سل استک (CellSTACK) کشت داده می شوند. کشت در حجم ۵ تا ۱۰ لیتر با استفاده از هر دو روش می تواند وکتورهای مناسبی را برای استفاده در مطالعات کارآزمایی بالینی تولید کند.

تولید وکتور آدنوویروسی برای استفاده های بالینی نیازمند یک فرایند تولید در مقیاس بزرگ است که باید با استفاده از مواد تأیید شده مطابق با استانداردهای GMP انجام شود. برای این منظور می بایست بانک سلولی مرجع (GMP Master Cell Bank - MCB)، بانک سلولی کاری (Working Cell Bank - WCB)، بانک ویروسی مرجع (Master Virus Seed - MVSS) و بانک ویروسی کاری (Working Virus Seed Stock - WVSS) ایجاد شده و کنترل کیفی جامع آن بر اساس دستورالعمل های ICH آماده شود.^{۱۴}

در مرحله بالادستی تولید وکتور آدنوویروسی، لازم است کنترل کیفی حین فرایند^{۱۵} و نمونه برداری دوره ای انجام شود تا پارامترهای کلیدی زیر مورد پایش قرار گیرند: رشد سلولی، درصد زنده ماندن، مورفولوژی سلول ها، غلظت متابولیت ها، مصرف مواد مغذی و pH محیط کشت. همچنین، میزان متابولیت هایی مانند گلوکز، لاکتات، آمونیم، گلوتامین و گلوتامات باید به صورت منظم و دقیق اندازه گیری شود تا وضعیت متابولیک سلول ها کنترل گردد. استفاده از محیط های کشت با ترکیب شیمیایی تعریف شده^{۱۶} منجر به تکرارپذیری، کاهش ریسک آلودگی و سهولت در پایش کیفی و تطابق با الزامات نظارتی می شود. پس از انجام عفونت و برداشت (هارو است) محصول، ارزیابی تیتراژ ویروسی نیز ضروری است تا میزان ویروس تولید شده مورد سنجش و اطمینان از کیفیت و کارایی محصول حاصل شود که برای آدنوویروس می بایست حداقل 10^{11} vp/ml باشد.

^{۱۴}ICH Topic Q 5 D Quality of Biotechnological Products: Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products

^{۱۵}In-Process Quality Control (IPQC)

^{۱۶}Chemically defined and animal-derived component free

لازم است تمامی مراحل فرایندی بر اساس روش های استاندارد کار^۷ تصویب شده انجام شود. همچنین می بایست کلیه مواد و تجهیزات استفاده شده دارای مستندات احراز کیفیت و یا اعتبار سنجی مربوطه مانند گواهی آنالیز (COA)، گواهی کالیبراسیون و IQ/OQ/PQ Documentation باشد.

فرایندهای پایین دستی که گاهی تا بیش از ۸۰ درصد هزینه فرایند تولید محصولات بیوتکنولوژی را به خود اختصاص می دهند در تولید وکتورهای آدنوویروسی بر اساس الزامات GMP اهمیت ویژه ای دارند. این فرایندها شامل مراحل زیر می باشند.

۱. لیز سلول HEK-Ad (Lysis)

ویروس های غیرلیز کننده، مانند آدنوویروس، برای آزادسازی از سلول میزبان نیاز به روش هایی برای شکستن سلول دارند. استفاده از روش هایی با قابلیت مقیاس پذیری در این مرحله اهمیت بالایی دارد چراکه روش های رایج آزمایشگاهی به راحتی در مقیاس تولید قابل انجام نخواهد بود. استفاده از روش لیز شیمیایی نیاز به توجه کامل به مواد مورد استفاده در طی فرایند از لحاظ انطباق با استانداردهای بین المللی دارد. به عنوان مثال در روش های قدیمی از ترکیب شیمیایی تریتون X-100 به علت بازده مناسب به عنوان یک ماده شوینده برای لیز کردن سلول ها استفاده شده است. با این حال، تریتون X-100 در فهرست مواد تحت مجوز REACH قرار دارد و تنها می تواند در مقادیر محدود و برای مقاصد تحقیقاتی مورد استفاده قرار گیرد. لذا استفاده از ترکیبات منطبق با استانداردهای جهانی به شدت اهمیت دارد. از طرفی باید توجه نمود که افزودن هر نوع ترکیب شیمیایی در حین فرایند، نیاز به حذف آن ترکیب در مراحل بعدی فرایند و توسعه یک روش آزمون جهت اثبات حذف آن ماده را به دنبال خواهد داشت که می بایست مستندات مربوطه آماده شود.

۲. رسوب و حذف DNA (DNA precipitation)

آلودگی های DNA میزبان باید در این مرحله از بین برود. استفاده از سیستم های آنزیمی مانند اندونوکلیاز ها و یا مواد شیمیایی پس از ارزیابی از لحاظ کارایی حذف DNA و هزینه فرایند در این مرحله باید انجام شود. مواد افزودنی مانند آنزیم بنزوناژ یا ترکیب کاتیونی دومیفن بروماید در مراحل مختلف فرایند می بایست با یک روش آزمون مناسب در مراحل بعدی فرایند مورد پایش قرار بگیرند.

۳. شفاف سازی (Clarification)

در این مرحله نیز می بایست یک روش با قابلیت مقیاس پذیری مورد ارزیابی و توسعه قرار بگیرد. در حالیکه روش هایی مانند سانتریفیوژ و دیگر روش های آزمایشگاهی برای مقیاس کم مناسب می باشند، استفاده از فیلترهای عمقی در مقیاس تولید صنعتی کاربرد گسترده ای دارد. ارزیابی فیلتر مناسب در این مرحله باید به صورت روش مند صورت پذیرد.

استفاده از ابزار های کنترل کیفی مناسب بخش های مختلف مانند استفاده از روش های استاندارد Filter integrity Check در صورت استفاده از فیلتر ها باید انجام شود و مستندات مربوطه تهیه شود.

۴. تعویض و تغلیظ بافر از طریق فیلتراسیون جریان مماسی TFF

^۷Standard operating procedure (SOP)

استفاده از سیستم های فیلتراسیون کارآمد جهت حذف ترکیبات شیمیایی مختلف، انتقال ویروس ها به بافر مناسب و تنظیم غلظت آن ها جهت پیش برد ادامه فرایند پایین دستی در این مرحله صورت می پذیرد.

۵. کروماتوگرافی تبادل آنیونی (AEX)

طراحی استراتژی مناسب تخلیص پروتئین (CiPP (capture, intermediate purification, polishing)) به منظور بازیابی حداکثری ذرات ویروسی، حذف ناخالصی های عمده و تخلیص نهایی محصول به همراه کنترل کیفی حین فرایند و رصد ویژگی های کیفی مهم^۸ بر اساس کیفیت، ایمنی و اثر بخشی محصول در این مرحله انجام می شود. ستون های کروماتوگرافی پر شده از رزین مناسب پس از ارزیابی های کیفی مربوطه جهت خالص سازی محصول مورد استفاده قرار می گیرد. در هر مرحله از فرایند کروماتوگرافی اندازه گیری ناخالصی ها وابسته به فرایند و ناخالصی های وابسته به محصول^۹ می بایست به طور کامل اندازه گیری شود. بنابراین توسعه و اعتبار سنجی روش CIP مناسب جهت جلوگیری از آلودگی های رزین و ستون کروماتوگرافی و جلوگیری از آلودگی متقاطع^{۱۰} بسیار ضروری می باشد.

۶. تبادل بافر (Buffer Exchange) جهت فرمولاسیون نهایی از طریق فیلتراسیون جریان مماسی TFF

تنظیم غلظت مناسب ویروس و استفاده از بافر مناسب فرمولاسیون

۷. استریل کردن نهایی با فیلتر ۰٫۲۲ میکرومتر (Sterile Filtration)

استفاده از فیلتر های با اندازه حفرات مشخص جهت استریلیزاسیون محصولات دارویی از روش های پرکاربرد می باشد. استفاده از فیلتر های عمقی امکان انجام این مرحله را در مقیاس تولید صنعتی فراهم می کند. پس از اتمام مراحل خالص سازی، در صورتی که محصول نهایی ویروسی جهت استفاده در مطالعات بالینی مدنظر باشد، باید استانداردهای کیفی و ایمنی لازم بر اساس الزامات سازمان های نظارتی (مانند FDA یا EMA) را دارا باشد که این موارد شامل :

۱- Virus titer assay: TVP/IVP ratio Criteria: <30

Item	Test
۱	Viral Genome (VG/ml)
۲	Viral Particle (VP/ml)
۳	Functional virus
۴	Titer assay

^۸Critical Quality Attributes (CQAs)

^۹Process related impurities and product related impurities

^{۱۰}Cross-contamination

۲- Virus-related impurity

Item	Test
۱	Incorrectly packaged virus
۲	Empty and partially filled viral particles
۳	Free viral proteins
۴	Aggregation

۳- Impurity assay: gDNA ng per dose (10^{11} vp) Criteria: <10 ng HCP ng per dose (10^{11} vp)
Criteria: <20 µg

Item	Test
۱	Total protein (ug/ml)
۲	Total DNA (ng/ml)
۳	Adventitious virus and microbes
۴	hcDNA
۵	HCP
۶	Sterility

۴- Characterization

Item	Test
۱	Viral protein identity Purity and Integrity check by SDS_PAGE
۲	Virus structure
۳	Size Distribution

۵- Residual (if applicable): Residual Tween 20 (%) Criteria: ~ 0.005

Item	Name
۱	Leaked affinity ligand
۲	Detergent residual
۳	Transfection reagent

۴

Residual assay for domiphen
bromide

محدوده قابل قبول شاخص های کیفی ارزیابی شده برای وکتورهای آدنووایروس:

شاخص KPI	KPI هدف	روش ارزیابی
تیترو ویروس آلوده کننده (infectious titer)	$>10^{10}$ IFU/mL	TCID ₅₀ /PFU
تیترو ویروس کل (total titer)	$>10^{12}$ vp/mL	Absorbance at ۲۶۰ nm, SPR, qPCR
خلوص (Purity)	$<5\%$ پروتئین ناخالص یا DNA	BCA, Western blot, SDS-PAGE
DNA سلول میزبان (HCD)	<10 ng/Dose	qPCR با پرایمر اختصاصی ژنهای بتا اکتین، GAPDH، ...
پروتئین های سلول میزبان (HCP)	<100 ng/mL	ELISA
باقیمانده Benzonase در صورت استفاده از این آنزیم برای حذف ژنوم سلول میزبان	<0.1 U/mL	ELISA
باقیمانده Tween ۲۰	قابل شناسایی در محدوده پایین	LC-MS / UPLC
اندازه و توزیع ذرات	اندازه میانگین ۸۰-۱۲۰ نانومتر	NTA (NanoSight)/DLS
خلوص ساختاری ذرات ویروس	نسبت ذرات کامل ویروس به ناقص $>90\%$ و تجمع ذرات ویروسی	HPLC (Q Sepharose), TEM

در کنار شاخص های کیفی مربوط به خلوص، تیترو و ترکیب محصول، بررسی آلودگی های میکروبی و پیروژنیک در محصول نهایی آدنووایروس برای استفاده در مطالعات بالینی بر اساس استانداردهای نهادهای نظارتی الزامی است که شامل آزمون های حیاتی استریلیتی، مایکوپلاسما و اندوتوکسین می باشد.

شاخص	KPI هدف	روش ارزیابی / تست
------	---------	-------------------

کشت در محیط TSB و FTM	عدم رشد میکروبی پس از ۱۴ روز	استریلیتی (Sterility)
qPCR اختصاصی یا کشت سلولی با DAPI staining	منفی	مایکوپلازما (Mycoplasma)
LAL Test (Limulus Amebocyte Lysate) – روش ژل کلات یا کروماتوگرافی	< 5 EU/mL	اندوتوکسین (Endotoxin level)

بنابراین برای درمان ۱۰۰ بیمار، در صورتی که هر بیمار نیاز به ۱۰ دوز از آدنووایروس انکولیتیک با مقدار 5×10^{11} ذره ویروسی در هر دوز داشته باشد، در مجموع 5×10^{14} ذره ویروسی مورد نیاز خواهد بود. با توجه به بازده معمول تخلیص این ویروس که معادل $10^{12}/\text{ml}$ می باشد تهیه این مقدار ویروس مستلزم تولید حداقل ۵۰۰ میلی لیتر آدنووایروس خالص شده می باشد.

• ویروس های مرتبط با آدنو (AAV)

فرایند کلی تولید AAV نو ترکیب من جمله مراحل پایین دستی شباهت زیادی به روش تولید وکتورهای آدنووایروسی دارد. پس از توسعه رده سلولی مناسب، فرایندهای بالادست، برداشت سلول، شفاف سازی، تغلیظ و تعویض بافر، پالایش زیستی، فرمولاسیون و استیریلیزاسیون می بایست بر طبق روش های بهینه شده منطبق بر استاندارد های GMP انجام شود. تولید وکتورهای نو ترکیب وابسته به آدنو عمدتاً در سلول های HEK293T به صورت معلق (suspension) و در چهار مرحله اصلی انجام می شود. در مرحله نخست، سلول هایی که به کشت سوسپانسیون در محیط بدون سرم سازگار شده اند، با تراکم اولیه بین ۰٫۱ تا ۰٫۲ میلیون سلول در میلی لیتر کشت داده می شوند. پس از رسیدن به تراکم هدف (کمتر از ۳ میلیون سلول در میلی لیتر)، مرحله ترانسفکشن با استفاده از سیستم سه پلاسمیدی و عامل ترانسفکشن مانند PEI MAX یا کلسیم فسفات انجام می شود.

پس از گذشت زمان مناسب از ترانسفکشن (معمولاً بین ۴۸ تا ۷۲ ساعت)، محصول برداشت می شود. برای ارزیابی عملکرد، تیتراژ ذرات ویروسی (VP) با استفاده از روش ELISA و تیتراژ ژنوم ویروسی (VG) از طریق qPCR اندازه گیری می شود. در صد کپسیدهای کامل از نسبت VG به VP محاسبه شده و در این روش معمولاً بیش از ۱۵٪ به دست می آید. این فرایند مقیاس پذیر، تکرار پذیر و برای تولید انواع مختلف سروتیپ های AAV قابل استفاده است.

روش ارزیابی	مقدار هدف	KPI شاخص کلیدی
سنجش با ELISA	$\geq 1 \times 10^8 \text{ VP/L}$	(VP/L) تیتراژ ذرات ویروسی
سنجش با qPCR	$\geq 1 \times 10^8 \text{ VG/L}$	(VG/L) تیتراژ ژنوم ویروسی
	$\geq 15\%$	(VG/VP $\times 100$) درصد کپسیدهای کامل

فرایند پایین دستی محصولات ویروسی مبتنی بر AAV (ویروس آدنو-مرتبط) عمدتاً مشابه با فرایندهای مربوط به آدنوویروس است، زیرا هر دو ویروس فاقد پوشش لیپیدی (non-enveloped) بوده و دارای ساختار کپسیدی پروتئینی هستند؛ با این تفاوت که AAV اندازه کوچکتری دارد. از این رو، برای تولید محصول نهایی جهت استفاده در کارآزمایی های بالینی، رعایت استانداردهای خاصی ضروری است.

شاخص KPI	KPI هدف	روش ارزیابی
نسبت کپسیدهای پر	> ۹۰٪	AUC/AEX-HPLC
نسبت کپسیدهای خالی به کل	< ۱۰٪	Analytical Ultracentrifugation
تجمع ذرات ویروسی (Aggregation)	< ۵٪	SEC-HPLC/DLS
DNA میزبان باقیمانده (HCD)	< ۱۰ ng/dose	qPCR
پلاسمید باقیمانده	< 1 ng/mL	qPCR
پروتئین میزبان (HCP)	< 100 ng/mL	ELISA
PEI (ریجنت استاندارد برای ترانسفکشن وکتورهای AAV)	غیرقابل شناسایی (<LOD)	HPLC یا Spectrophotometry
عامل لیز (دترجنت توئین و تریتون X۱۰۰)	< 0.01% (w/v)	HPLC
تعداد ذرات ویروسی	1×10^{11} تا 1×10^{13} vp/mL	Spectrophotometry (OD _{۲۶۰}) یا qPCR
عفونت زایی در شرایط آزمایشگاهی	IP/VP $\geq 1:100$	TCID _{۵۰} یا Plaque Assay

همچنین در کنار شاخص های کیفی مربوط به خلوص، تیترو و ترکیب محصول، بررسی آلودگی های میکروبی و پیروژنیک در محصول نهایی وکتور ویروسی وابسته به آدنو برای استفاده در مطالعات بالینی بر اساس استانداردهای GMP الزامی است که شامل آزمون های حیاتی استریلیتی، مایکوپلازما و اندوتوکسین می باشد.

شاخص	KPI هدف	روش ارزیابی / تست
استریلیتی	بدون رشد میکروبی	Ph. Eur. ۲,۶,۱ USP <۷۱>

اندوتوکسین باکتریایی	< 5 EU/mL	LAL Test (USP <85>)
مایکوپلاسما	منفی	PCR یا کشت (Ph. Eur. ۲.۶.۷)

دوز تزریق داروهای ژن درمانی (gene therapy) مبتنی بر وکتور ویروسی مرتبط به آدنو (AAV) می تواند بسته به عوامل مختلفی به طور قابل توجهی متفاوت باشد. مهم ترین عوامل تأثیرگذار شامل نوع بیماری، سن و وزن بیمار، مسیر تجویز (داخل وریدی، داخل عضله، داخل نخاع، داخل چشمی، و غیره) و هدف سلولی یا بافتی هستند. به طور مثال اگر فرض شود برای درمان ۱۰۰ بیمار که هر یک به یک دوز معادل 10^{13} ذره ویروسی نیاز دارند، در مجموع به 10^{15} ذره ویروسی نیاز است. با توجه به اینکه در شرایط بهینه، میزان تولید ویروس وابسته به آدنو در مرحله بالادستی حدود 10^{13} ذره در هر لیتر محیط کشت است، و با در نظر گرفتن بازدهی تخلیص در محدوده ۲۰ تا ۳۰ درصد، تولید مقدار مورد نیاز ویروس خالص شده مستلزم استفاده از حداقل ۵۰ لیتر محیط کشت اولیه می باشد.

• لنتی ویروس

لنتی ویروس ها، ویروس های RNA پوشش دار (enveloped) هستند که به خانواده رتروویریده (Retroviridae) تعلق دارند و اندازه ذرات آن ها حدود ۸۰ تا ۱۰۰ نانومتر است. لنتی ویروس ها قادرند قطعات ژنتیکی بزرگی تا ۹ کیلو باز (kb) را به سلول های در حال تقسیم و سلول های غیرفعال منتقل کنند. تخلیص وکتورهای لنتی ویروسی به دلیل پایداری پایین، حساسیت بالا نسبت به pH، غلظت نمکی، دما و سایر عوامل محیطی بسیار چالش برانگیز است. وکتورهای لنتی ویروسی (Lentiviral Vectors - LV) رایج ترین روش انتقال ژن به سلول های T در درمان های CAR-T محسوب می شوند، و تولید و تخلیص آن ها از عوامل اصلی هزینه را در فرایند تولید هستند. میزان بازیابی در روش های استاندارد رایج برای بازیابی این وکتورها تنها ۲۰٪ تا ۴۰٪ است، که این موضوع منجر به نیاز به بچ های تولیدی بزرگ تر و پرهزینه تر می شود.

تولید وکتورهای لنتی ویروسی و در مراحل بالادستی (Upstream) و پایین دستی (Downstream) تفاوت های قابل توجهی با وکتورهای وابسته به آدنو (AAV) دارند که بر پیچیدگی و چالش فرایند تأثیر می گذارد. در مرحله بالادستی، هر دو معمولاً با ترانسفکشن موقت سلول های HEK293T در سیستم سه یا چهار پلاسمیدی انجام می شوند، اما تولید AAV معمولاً نیاز به دقت بالاتری در نسبت پلاسمیدها، دما، و زمان برداشت دارد، چرا که در صد کپسیدهای کامل (Full Capsids) نسبت به Total Capsids از اهمیت بالایی برخوردار است. در مقابل، لنتی ویروس ها اغلب تیتر عفونی (Infectious Titer) بالاتری تولید می کنند و در تولید مقیاس کوچک (مثلاً برای ژن درمانی های ex vivo) راحت تر مدیریت می شوند.

در مرحله پایین دستی، تولید AAV چالش برانگیزتر است، زیرا نیاز به حذف ذرات ناقص (empty capsids)، ویروس های نادرست مونتاژ شده، و پروتئین های آزاد سلول میزبان دارد. خالص سازی آن معمولاً از کروماتوگرافی تبادل یونی (AEX)، فیلتراسیون جریان مماسی (TFF)، و روش هایی مانند SEC استفاده می کند. در مقابل، لنتی ویروس به دلیل شکنندگی ذرات ویروسی، نمی تواند از سانتریفیوژهای سرعت بالا استفاده کند و فرایندهای تصفیه ای آن به شدت به شرایط ملایم وابسته است. در عوض، خالص سازی لنتی ویروس ها بیشتر به فیلتراسیون و کروماتوگرافی مبتنی بر آنتی بادی (مثلاً ضد p24) متکی است.

روش ارزیابی	KPI هدف	شاخص کلیدی (KPI)
ELISA	$< 100 \text{ ng/mL}$	باقی مانده بنزوناز (Residual Benzonase)
p24 ELISA/ qPCR	$> 1 \times 10^9 \text{ vp/mL}$	تیترا فیزیکی ویروس
Flowcytometry/Transduce	$> 1 \times 10^7 \text{ TU/mL}$	تیترا عملکردی
In vitro amplification + p24 ELISA	No RCL detected	عدم وجود ویروس های Competent (RCL)
	$< 500 \text{ bp}$	اندازه DNA سلولی باقیمانده
qPCR	$< 10 \text{ ng/dose}$	مقدار DNA سلولی باقی مانده (HCD)
RT-PCR	No DNA detected	انتقال توالی های ژنومی خاص (SV40, E1A, VSVG)

همانند آدنو ویروس و ویروس وابسته به آدنو (AAV)، محصول نهایی لنتی ویروسی نیز باید از نظر آزمایش های استریلیتی، آلودگی به مایکوپلازما و سطح اندوتوکسین مورد ارزیابی قرار گیرد تا از ایمنی، کیفیت و مطابقت با الزامات تولید تحت شرایط GMP اطمینان حاصل شود.

روش ارزیابی / تست	KPI هدف	شاخص
Ph. Eur. $< 71 > \text{ USP}$ یا $2,6,1$	بدون رشد میکروبی	استریلیتی
LAL Test ($\text{USP} < 85 >$)	$< 5 \text{ EU/mL}$	اندوتوکسین باکتریایی
PCR یا کشت ($\text{Ph. Eur. } 2,6,7$)	منفی	مایکوپلازما

در این راستا، برای تهیه ۱۰۰ بچ درمانی CAR-T، که در هر مورد نیاز به ترانس دیوس کردن حداقل 10^8 سلول T با MOI معادل ۱۰ وجود دارد، در مجموع به 10^9 ذره ویروسی عملکردی برای هر بیمار و در نتیجه به 10^{11} ذره ویروسی عملکردی برای

کل بیماران نیاز است. با تیتراژ عملکردی 10^7 TU/mL، حجم ویروس مورد نیاز ۱۰ لیتر خواهد بود؛ در حالی که با تیتراژ 10^8 TU/mL این مقدار به ۱ لیتر، و با تیتراژ 10^9 TU/mL به ۱۰۰ میلی لیتر کاهش می یابد. بنابراین، افزایش تیتراژ عملکردی ویروس که خود وابسته به فاکتورهای متعددی از جمله بهینه سازی فرایند تولید و تخلیص لنتی ویروس است به طور مستقیم باعث کاهش حجم مورد نیاز برای تولید بیج های درمانی CAR-T می شود..

لازم به ذکر است در فراخوان های قبلی انقلاب زیستی چندین طرح نیازمند تولید ویروس، مورد حمایت قرار گرفته اند و با توجه به نظر خبرگان این حوزه، در شرایط فعلی، عدم رسوب دانش فنی تولید تحت GMP ویروس در مقیاس صنعتی از گلوگاه های توسعه درمان های پیشرفته در کشور است. لذا هدف غایی این پروژه رفع چالش های تولید ویروس با استانداردهای مناسب جهت استفاده در بالین است.