

1/48/2001

3. Részjelentés: 2003. November 30.-2004. december 31.

**RP.9. Rosszindulatú agydaganatok génterápiájának
bevezetése**

Dr. Nyáry István
Országos Idegsebészeti Tudományos Intézet

RP9. A génterápia klinikai bevezetése a rosszindulatú agydaganatok kezelésére

Témavezető: dr. Nyáry István, Országos Idegsebészeti Tudományos Intézet

Résztevők: dr. Sáfrány Géza, OKK, OSSK, dr. Mécs Imre, Bay Z. Biotechnológiai Intézet

A/ Az állatkísérletek során használt adenovírus alapú vektorrendszer humanizálása.

B/ Az emberi GM-CSF-et kódoló adenovírus alapú vektor „klinikai minőségű” előállítás.

C/ Primer sejtvonalakat készítünk glioblasztomás betegekből eltávolított daganatból.

D/ Agydaganatos betegek vakcinálása GM-CSF-et termelő, autológ daganatsejtekkel.

E/ Vakcinált betegek klinikai tüneteinek nyomon követése.

F/ Az immunrendszer aktivációjának a nyomon követése.

G/ Az eljárás hatásfokának növelése dendritikus sejtekkel való kombináció segítségével.

ÖSSZEGEZÉS

- 1.) Kialakított aszeptikus laboratóriumi részlegünkben a szövettenyésztésre alkalmazott anyagaink és eljárásaink alkalmasnak bizonyultak GM-CSF-t kódoló, „nyers” Adeno 5 vektor vírus előállítására nagyobb (1700 ml) mennyiségben előállítani 10^{11} - 10^{12} TCID₅₀/ml titerrel.
- 2.) Az általunk előállított progeny vektor virion pool-ok „első,” és „második” passzásai nem tartalmaztak infectív Adeno 5 viriont, azaz **passzálásuk alkalmával nem történt a vektor vírusok genomjában back mutáció.**
- 3.) Az általunk előállított virion pool-ok „első” és „második” passzásainak **biztonsági vizsgálati során kiderült, hogy azok mentesek bármely aerob, anaerob baktérium Mycobacterium tuberculosis, és mikroszkopikus gomba, Mycoplasma, Chlamydia, Hepatitis B és C vírus, Cytomegalovírus, Herpes simplex vírus 1 és 2. típusától és nem tartalmaznak pyrogén anyagot.**
- 4.) Ezek alapján az általunk előállított, s GM-CSF-t kódoló, vektor Adeno 5 virionok „első” és „második” poolozott passzársa **felhasználható oltóvírusként ipari, vagy laboratóriumi méretű vektor vírusok előállítására, vagy további tisztítás és koncentrálásnak alávetve therápiás célra is felhasználható.**

A project során előállított vírusanyagot további hasznosítás céljára átadjuk az Országos Joliot-Curie Sugárbiológiai Intézetnek.

1. a.) Aszeptikus körülmények között, H-293 MS 2 permissive sejtkulturákban 1700 ml GM-CSF-t kódoló Adeno 5 progeny” vektor viriont állítottunk elő.

Az Országos Joliot-Curie Sugárbiológiai Intézetből Dr. Sáfrány Géza projektvezető úr bocsátotta rendelkezésünkre az un. „permissive” - koncentrált és tisztított- vektor vírus inokulumot és a szaporításukra alkalmas H-293 MS 2 permissive sejtkultúrát (2x0,5 ml).

Az inokulum mennyiségének limitált volta, valamint a passage-k során esetleg fellépő mutációk, netán „járulékos fertőzések ellenőrzésére”, elsősorban ezzel az inokulummal fertőzött sejtekben szaporított progeny virionok anyagát használtuk, s „1.passage” jelöléssel külön tároltuk és ellenőriztük az így előállított egyes sarzsokat.

Az 1.passage-ból származó vektor virionokból szaporítottuk tovább a vektor vírusok egyes sarzsait, s „2.passage” jelöléssel tároltuk és ellenőriztük őket.

A back mutánsok ellenőrzésére, valamint a mikrotitrátor lemezekben végzett vírustitrálások módszerének kidolgozására a **Hep 2 sejtkulturát** és a tisztított és koncentrált „vad” **Adeno 5 vírust** a SZOTE Mikrobiológiai Intézetéből, Prof. Pusztai Rozáliától szereztük be.

1. b.) A „Progeny” vektor virionokat 14 részletben (sarzs) állítottuk elő, 600 ml-es T-flaskákban kifejlesztett, 3-4 napos permissive (293-as) monolayer kultúrákban. Hét esetben a Dr. Sáfrány témavezető úrtól kapott 0.1 ml inokulummal (**1.passage**), hét esetben pedig az ebből a passage-ból származó, 2–2 ml-es inokulummal fertőzött permissive monolayerekben (**2.passage**).

Két órán át 37°C-on adszorbeáltuk a monolayereket az inokulummal, steril PBS-el mostuk, majd 75 ml - steril és pyrogén mentes - 5% GIBCO fetal calf szérumot tartalmazó SIGMA RPMI mediummal töltöttük fel a fertőzött tenyészeteket és 37°C-on 5%-os CO₂ atmoszférán inkubáltuk az intenzív cytopathogén hatás (5-7 nap) megjelenéséig. Ekkor -70°C-on lefagyasztottuk a fertőzött tenyészeteket, s ezen a hőmérsékleten tároltuk.

2.) Meghatároztuk a progeny vektor virionok titerét permissive H-293 MS 2 sejtkulturák mikrotitrátor tenyészeteiben, amit átlagosan 10¹¹ TCID₅₀/ ml -nek találtunk.

(A TCID₅₀ meghatározására a vitális neutrálvörös festésnél sokkal érzékenyebb iodonitrotetrazolium kloridos festést (1) alkalmaztuk, ami csak az érintetlen dehydrogenáz enzimaktivitással rendelkező, ép sejtekben alakul át oldhatatlan, vörös színű csapadékká. Ez teszi rendkívül pontosá a vírustitrálások végpontjainak megállapítását, mivel a **fertőzés következtében károsodott sejtek nem festhetők meg ezzel az eljárással.**)

Az **I.sz. Fotón** a vektor virionok titrálását mutatjuk be H-293 MS 2 „permissive” mikrotitrátor tenyészetekben, a **II.sz. Fotón** pedig a hasonló körülmények között Hep 2 sejtekben szaporított „vad” Adeno 5 virionok titrálását Hep 2 mikrotitrátor tenyészetekben, „terazóliumos festéssel”.

3.) Ellenőriztük a tizennégy 75 ml-es „sarzs”-ban előállított 1. és 2.passage-ból származó progeny vektor virion készítmények tisztaságát, négy - négy párhuzamos Oxoid dextrose tryptone broth (code: CM73)-ban, illetve Oxoid anaerostatban, 5% birka vörösvértestet tartalmazó véresagar táptalajon (Code :AN 25 és BR 42 catalyst), 0.5 - 0.5 ml inokulomot alkalmazva, **aerob, illetve anaerob mikrobák kimutatására, 37°C-on, 5 napig inkubálva.** (2).

Mikroszkopikus gombák és élesztők kimutatására is, sarzsonként 4 - 4 Sabouraud liquid médiumra oltással (code: CM147) és 5 napos inkubálással jártunk el. (2)

4.) A vektor virion „sarzsok” „járulékos,, vírushatárát Vero sejt kulturákban kifejtett cytopathogén hatásuk alapján ellenőriztük, mely közismerten érzékeny **humán enterovírusok és herpesvírusok** kimutatására.

A 3. és 4. pontok ellenőrzései során valamennyi vektor vírus sarzsot - baktérium és mikroszkopikus gomba - sterilnek, illetve járulékos vírushatárától mentesnek találtuk és két („1.” és „2.” passage-ból származó) pool-ba egyesítettük.

5.) A további ellenőrző vizsgálatokat ezekről az egyesített vektor virion pool-okból végeztük.

5. a.) A Chlamydia (trachomatis, psittaci és pneumoniae) antigén kimutatást az ÁNTSZ -ben hivatalosan bevezetett ELISA módszerével végeztük el (3., 4.), s a vektor virion pool-okat chlamydia mentesnek találtuk.

5. b.) A **Mycoplasma pneumoniae kimutatást** ugyancsak az ÁNTSZ-ben hivatalosan bevezetett **tenyésztési eljárással** hajtottuk végre (5.),s a vektor virion pool-okat **mycoplasma mentesnek találtuk.**

5. c.) A vektor virion pool-oknak, a **passagek során fellépő** esetleges **back mutációját** 100 ml-es (non permissive) Hep 2 monolayer kultúrákban és/vagy mikrotitrátor tenyészetekben, majd ezt követően permissive sejtek mikrotitrátor tenészeteiben ellenőriztük.

(A Hep 2 monolayereket 1 ml, a Hep 2 mikrotitrátor tenészeteiket pedig 0.1 ml „tömény” progeny vektor virion „1” és „2” **passage-jával** fertőztük, s 5 napig 37°C-on inkubáltuk. Mivel a vektor virion fertőzés ezalatt „határozatlan cytopathogén” hatást idézett elő (**III. sz. Fotó**) az így előállított virion subcultúrát H-293 MS 2 mikrotitrátor tenészeteiben „**ismételten megtitráltuk**” a Hep 2 sejtek tömény és különböző hígítású felülúszójával) (**IV. sz. Fotó**).

E „második”, un. **permissive sejt kultúrákban egyetlen esetben sem észleltünk cytopathogén hatást, sem az „1”, sem a „2” passage-ból származó progeny vektor virion pool-okban. Ez kizárja a GM-CSF-t kódoló Adeno 5 vektor vírus back mutációjának valószínűségét, mind a tisztított és koncentrált inokulumban, mind pedig az „1” és „2” passage-ból származó, 2 ml-es inokulummal előállított sarzsok esetében.** (Ugyanis, hasonló körülmények között, nem festődő és jellegzetes cytopathogén hatás alakul ki a vad vírussal fertőzött non permissive Hep 2/C sejtekben.)(**V.sz. Foto**).

5. d.) Az általunk előállított vektor(„1”. és „2”.passage) virion pool-ok pyrogenitását a **SIGMA-ALDRICH Kft. módszerével ellenőriztük.**

Pozitív kontrollként a **Sigma 210-A 1 E-Toxate reagens** kit-jét alkalmaztuk (Procedure No. 210), mely rendkívül érzékeny különböző plazmák, s egyéb folyadékok endotoxin tartalmának meghatározására.

Pozitív kontrolunk esetében a pyrogenitás végpontja 0,25 NE/ml endotoxin volt. Az ilyen érzékenységgű pyrogenitási teszttel, a koncentrált (nem hígított) „1” és „2” vektor virion pool-ok és különböző, 1:2 alapú hígításai negatívnak bizonyultak.

Ezek alapján állíthatjuk, hogy a GM-CFS-t kódoló, általunk előállított progeny vektor virion pool-ok pyrogén mentesek.

5. e.) Cytomegalo vírus jelenlétét az „1”. és „2”.passage-ból származó progeny vektor virion pool-okban **PCR módszerrel ellenőriztük** (6) Dr. Pusztai Róza professzor asszony segítségével, az un. nested-PCR módszerrel.

Sem az eredeti, koncentrált Sugárbiológiai Intézettől rendelkezésünkre bocsátott,(1.sz. minta) sem pedig a vele permisszive 293 sejt kultúrában előállított progeny virionokban (2, 3, és 4. sz. minta) nem volt jelen kimutatható Cytomegalovírus.(Lásd: I.sz. Táblázat).

5. f.) **Vektorvirus Adeno 5 típusának biztonsági molekuláris biológiai vizsgálata PCR módszerrel**

Mind az eredeti, Sugárbiológiai Intézetből származó, koncentrált, Adeno 5 típusú vektor „oltó vírusban”(1.sz. minta), mind az ezzel a 293 sz. kompetens sejtek monolayerében előállított „első passzázsában” (2.sz. minta), és „második passzázsában” (3. sz. minta) leellenőriztük a Szegedi Tudományegyetem Szent-Györgyi Albert Orvos és Gyógyszerésztudományi Centrum Klinikai Mikrobiológiai és Diagnosztikai Intézetében (Dr. Deák Judit docens asszony segítségével) Arthus és Roche kitékkel a Chlamydia

trachomatis, a Hepatitis B és C, a Cytomegalovirus, az Enterovirusok, a Herpes simplex I és II. típusai, valamint a Mycobacterium tuberculosis nukleinsavainak jelenlétét .

A felsorolt kórokozók valamennyi esetében negatív eredményt kaptunk. (I.sz. Táblázat)
(Az erről szóló tanúsítványt csatoljuk).

Irodalmi hivatkozások:

- 1.) Nachlas M.N. et al. :Anal.Biochem. 1. 317 (1960.)
- 2.) Oxoid manual (1998)
- 3.) Saikku P.: Proc.3rdChlamydia Res. p.215 (1996), Vienna
- 4.) Isenberg H.D. : Clinical Microbiol.,Procedures Handbook 2.vol.(1992),Washington
- 5.)Klinikai és Járványügyi Bakteriológiai Kézikönyv. (1999). Szerk. Czifrok Éva
- 6.)Lukácsi A. et al.(2001) J.Med.Virol. 65. 537-542.

A GM-CFS-t kódoló ADENO 5 vektor vírus biztonsági vizsgálata

Minta	TCID ₅₀ /ml		Baktérium		MYCOPL.	CHLAMY.	PYROGÉN	Hepatitis		CMV	Entero vírusok	Herpes s.		TBC
	293	Hep 2	aer	anaer				B	C			1	2	
1.	10 ¹³ - 10 ¹⁴ t	0 t	0 t	0 t	0 t	0 p, t	0 sa	0 p	0 p	0 p	0 p	0 p	0 p	0 p
2.	10 ¹¹ - 10 ¹² t	0 t	0 t	0 t	0 t	0 p, t	0 sa	0 p	0 p	0 p	0 p	0 p	0 p	0 p
3.	10 ¹¹ - 10 ¹² t	0 t	0 t	0 t	0 t	0 p, t	0 sa	0 p	0 p	0 p	0 p	0 p	0 p	0 p
4.	10 ¹¹ - 10 ¹² t	0 t	0 t	0 t	0 t	0 t	0 sa	0 -	0 -	0 p	0 vt	-	-	-

MINTÁK EREDERTE:

- 1./ Sugárbiológiai Intézetből kapott eredeti, koncentrált vektor vírus / 2 x 0,5 ml /
- 2./ Az eredeti minta első passzáza 293 számú permisszív szövetkultúrán / 920 ml pool /
- 3./ A 2. sz. minta újabb /második/ passzáza 293 számú permisszív szövetkultúrán / 850 ml pool /
- 4./ Az eredeti minta más sarzsból származó első passzáza 293 számú permisszív szövetkultúrán / 850 ml /

JELMAGYARÁZAT:

t: tenyésztéssel nyer eredmény, p: PCR technikával kapott eredmény
vt: Vero szövetkultúrán végzett tenyésztés
sa: Sigma-Aldrich pyrogenitási teszt