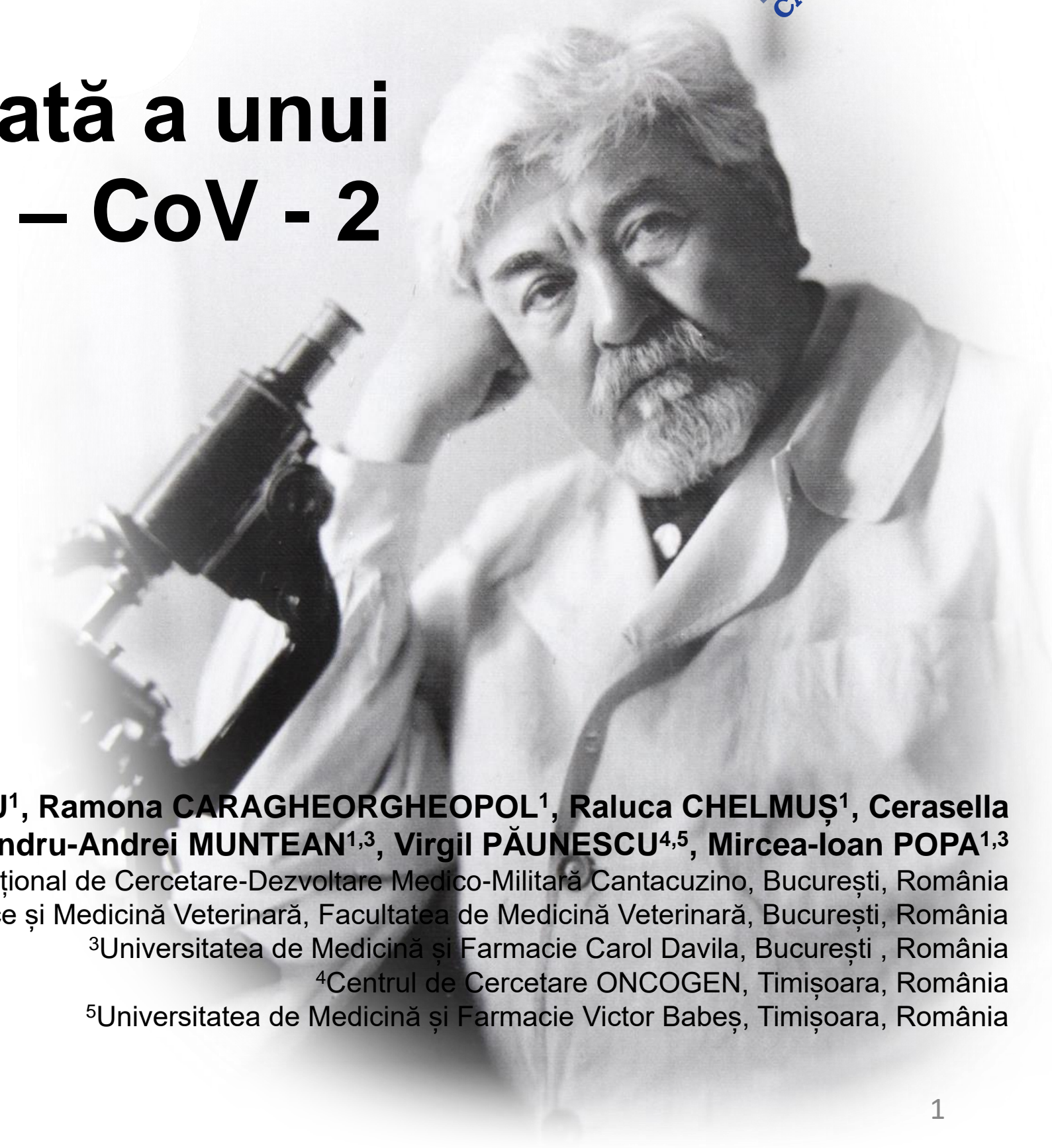




INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE DEZVOLTARE
MEDICO-MILITARĂ „CANTACUZINO”



Testarea toxicității de doză repetată a unui vaccin candidat împotriva SARS – CoV - 2



Cristin COMAN¹, Diana-Larisa ANCUȚA^{1,2*}, Irina IONESCU¹, Ramona CARAGHEORGHEOPOL¹, Raluca CHELMUȘ¹, Cerasella DRAGOMIRESCU^{1,3}, Alexandru-Andrei MUNTEAN^{1,3}, Virgil PĂUNESCU^{4,5}, Mircea-Ioan POPA^{1,3}

¹Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare Medico-Militară Cantacuzino, București, România

²Universitatea de Științe Agronomice și Medicină Veterinară, Facultatea de Medicină Veterinară, București, România

³Universitatea de Medicină și Farmacie Carol Davila, București, România

⁴Centrul de Cercetare ONCOGEN, Timișoara, România

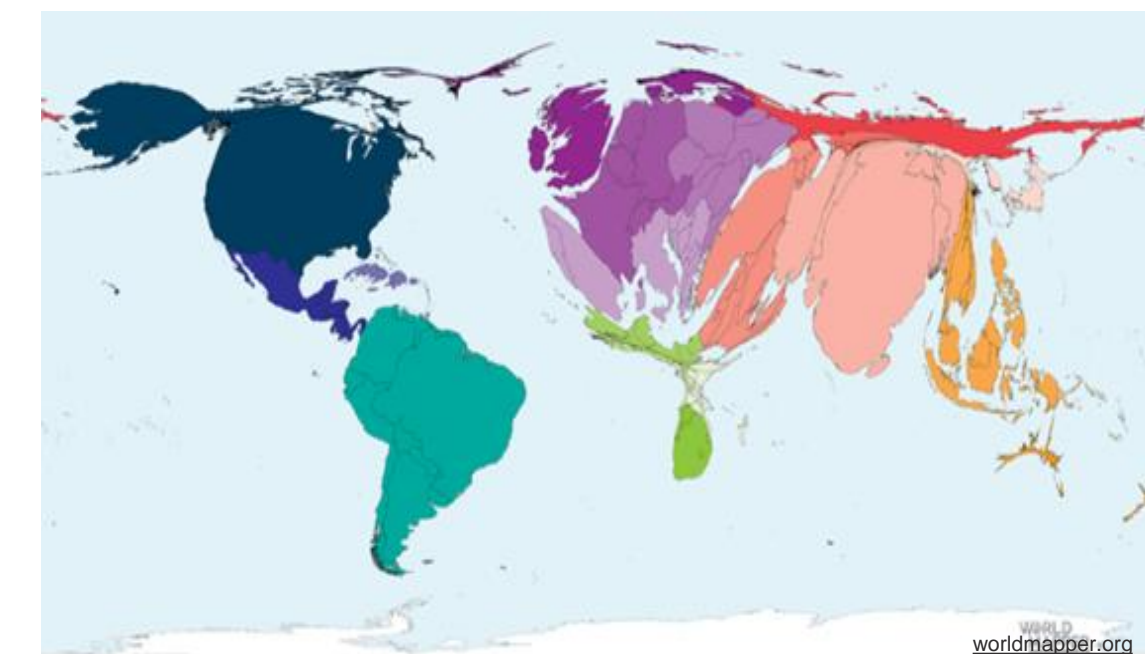
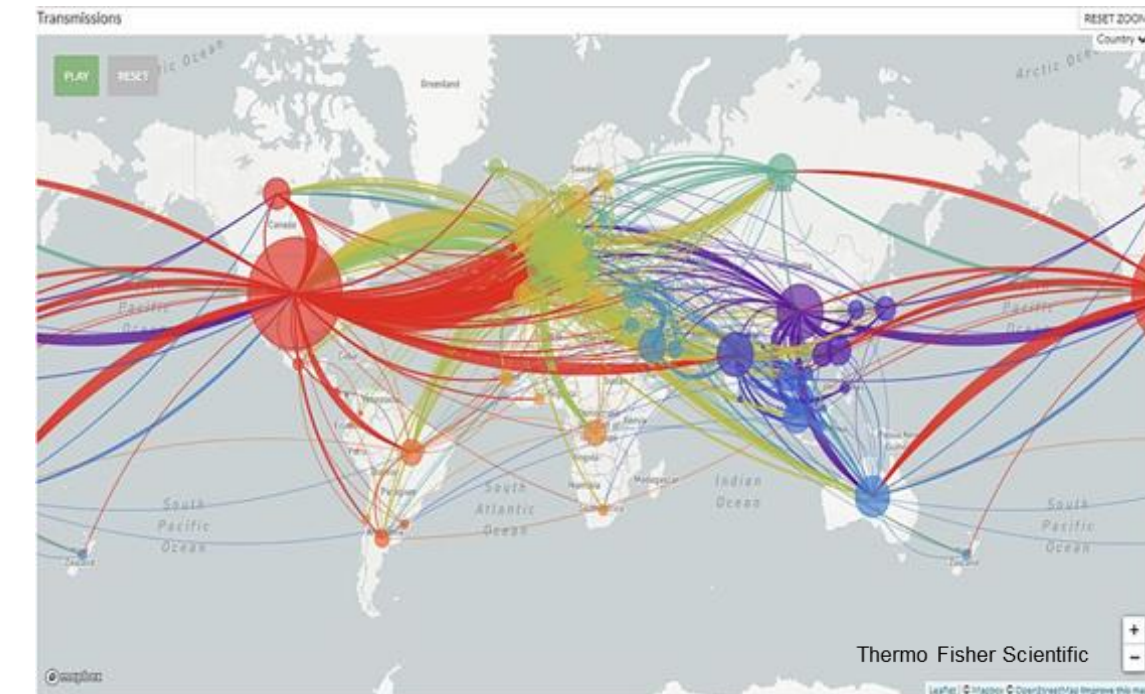
⁵Universitatea de Medicină și Farmacie Victor Babeș, Timișoara, România



Introducere



Situația epidemiologică a anului 2020, la nivel global, a impus găsirea unei soluții rapide pentru prevenirea și controlul răspândirii SARS-CoV-2. Vaccinarea este una dintre metodele care poate opri răspândirea virusului și în acest sens au fost dezvoltate vaccinuri a căror siguranță a fost verificată printr-o serie de teste. Toxicitatea de doză repetată este o etapă cheie a fazei preclinice.



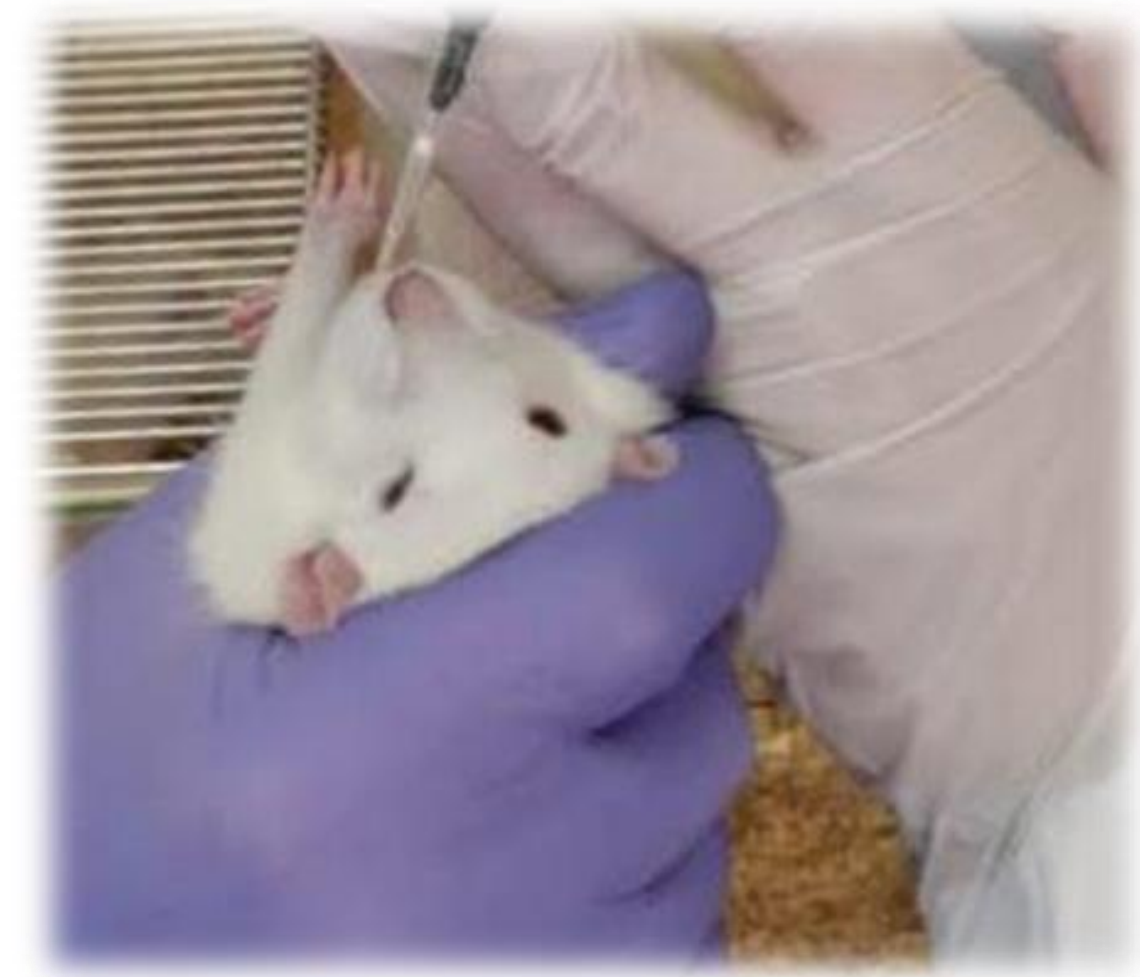


TESTUL TOXICITĂȚII DE DOZĂ REPETATĂ

- Este una dintre etapele fundamentale care atestă siguranța unui vaccin înaintea studiilor clinice și a aprobării de introducere pe piață.
- Scopul principal al testului toxicității de doză repetată este de a caracteriza profilul toxicologic al componentelor produsului de testat după administrare repetată.
- Aceasta include identificarea organelor cu potențial toxic, analiza relației expunere-răspuns, precum și reversibilitatea potențială a efectelor toxice.



Scopul acestui studiu a fost acela de a observa toxicitatea unui vaccin candidat împotriva SARS-CoV-2, la șobolani, după administrare intranazală repetată.





1. Standardul Internațional OECD de Bună Practică de Laborator (GLP) - **ENV/MC/CHEM(98)17**.
2. **CPMP/SWP/1042/99 Rev 1 Corr** - Guideline on repeated dose toxicity, Committee for Human Medicinal Products (CHMP), European Medicine Agency.
3. **EMA/CHMP/ICH/731268/1998 - ICH guideline S6 (R1)** – preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals, European Medicine Agency, Committee for Human Medicinal Products (CHMP).
4. **ISO 10993-2**, Biological evaluation of medical devices Part 2: Animal welfare requirements.
5. **LEGEA nr. 43 din 11 aprilie 2014** privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice.



www.slideshare.net



Depositphotos



Labroots



Celulele T vs anticorpi

- Imunitatea celulară bazată pe limfocite T a fost prezentă la 17 ani după infectarea cu SARS 1.
- Imunitatea umorală, bazată pe anticorpi, nu a mai fost prezentă după circa 2-3 ani.

Simptomele SARS 1

- Pacienții infectați cu SARS 1 care au dezvoltat imunitate celulară (limfocite T) au avut fie simptome ușoare, fie au fost asimptomatici.
- Pacienții care au dezvoltat imunitate umorală (anticorpi) au prezentat simptome moderate până la severe.

Literatura SARS 1

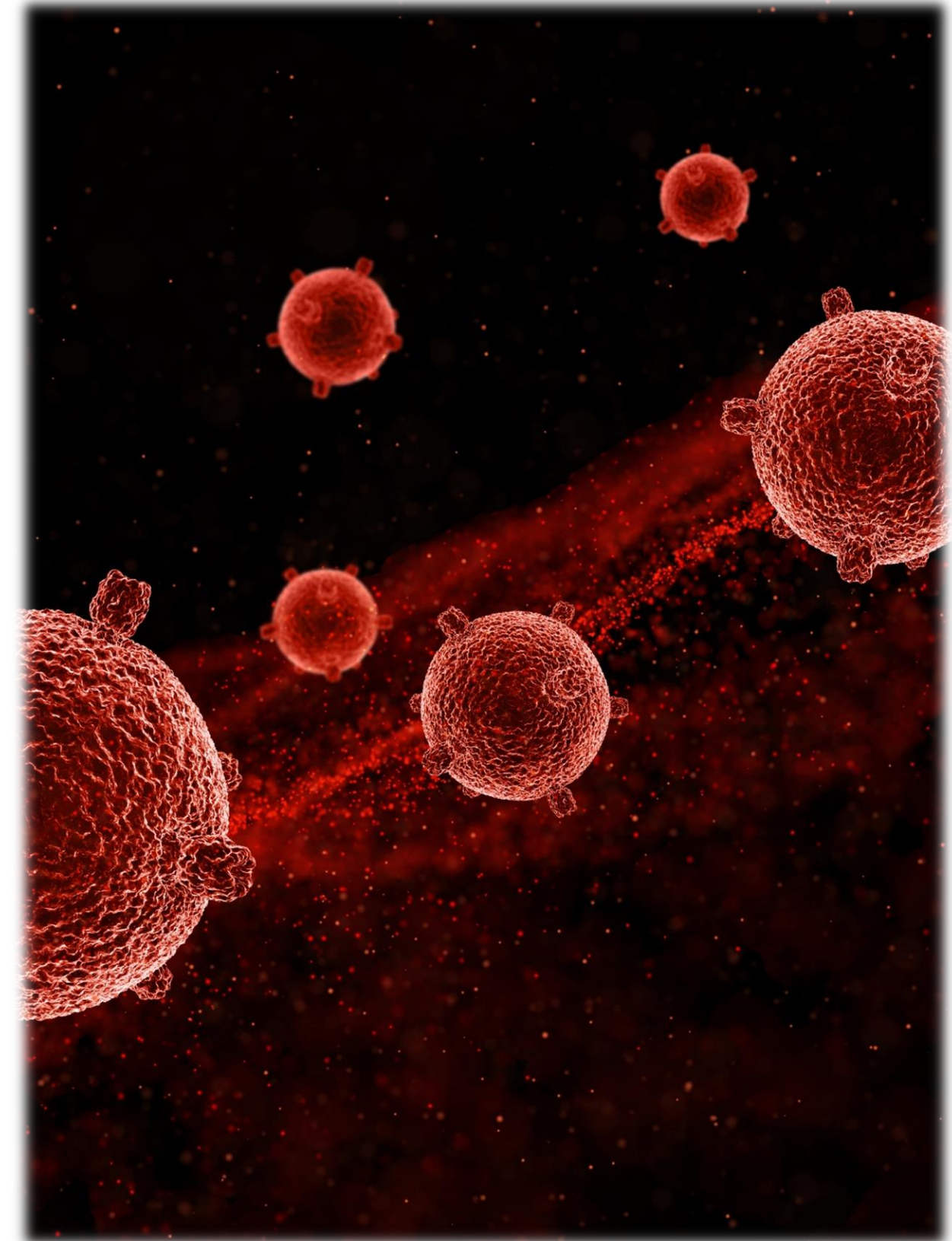
- Literatura despre SARS 1 precede pandemia; continuă să confirme constatările inițiale.



Despre Vaccinul cu celule T (1)



- Noua tehnologie, derivată din oncologie, s-a dovedit a fi eficientă:
 - *Long Neo-Antigen Peptide (LNAP)*;
- Fără material genetic viral:
 - se folosesc în peptide (proteine) sintetice;
- Flexibilitate:
 - tehnologia poate fi adaptată dacă virusul suferă mutații dincolo de prag;

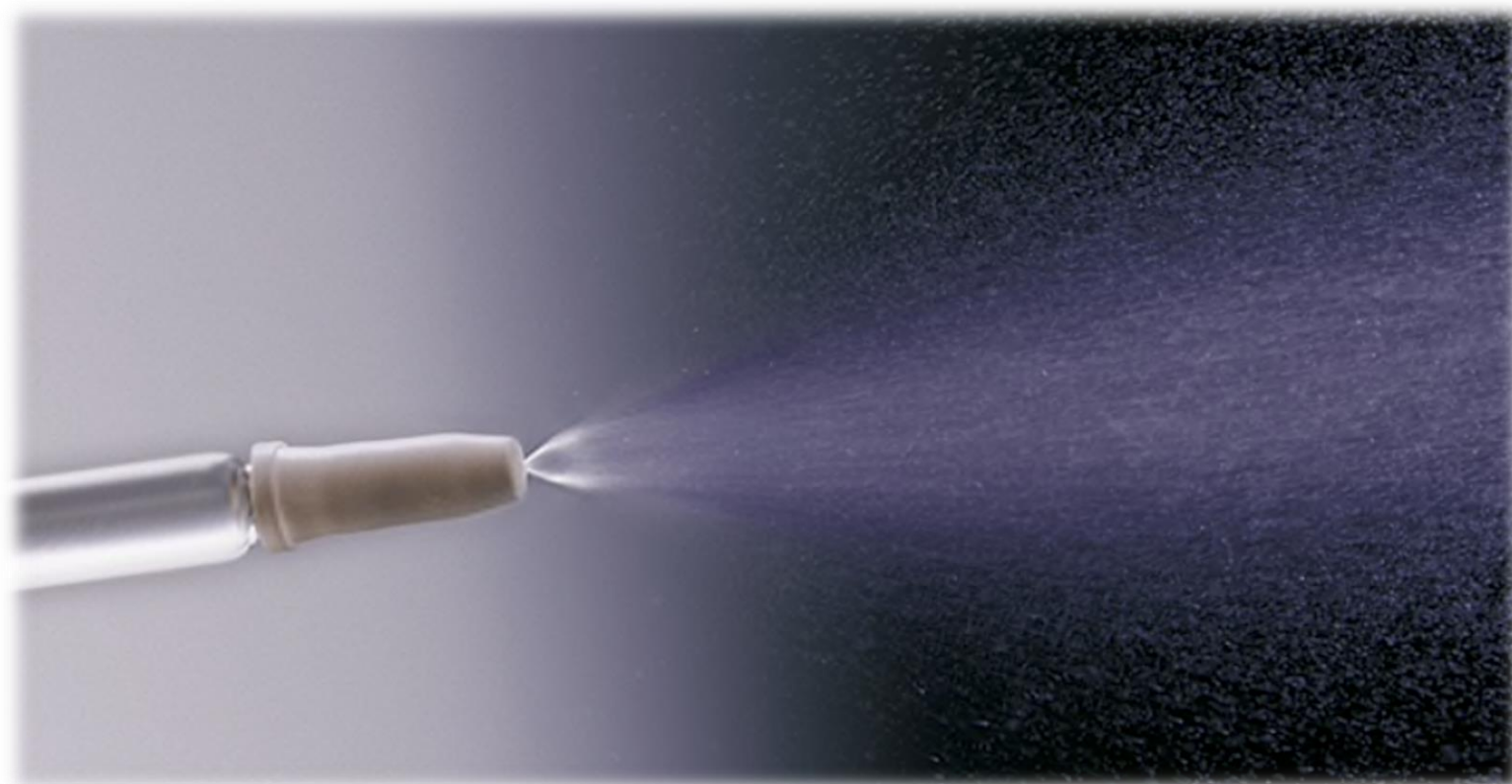




Despre Vaccinul cu celule T (2)



- Administrarea intranasală poate oferi protecție la poarta de intrare a virusului (nas, gură, tub digestiv);
- Activarea imunității locale;
- Protecția locală poate apărea mai rapid;
- Potențial mai puține efecte secundare;



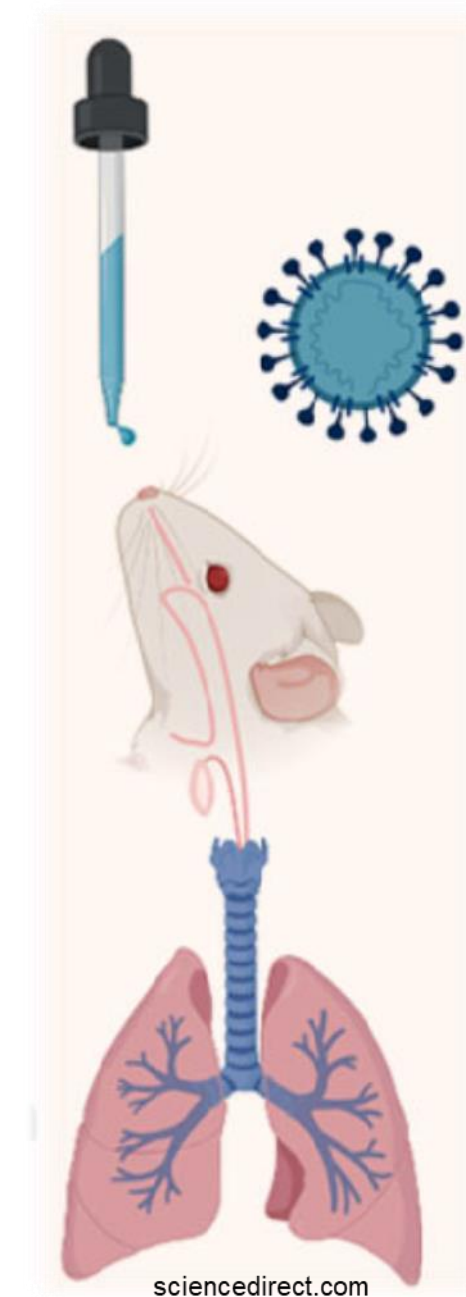
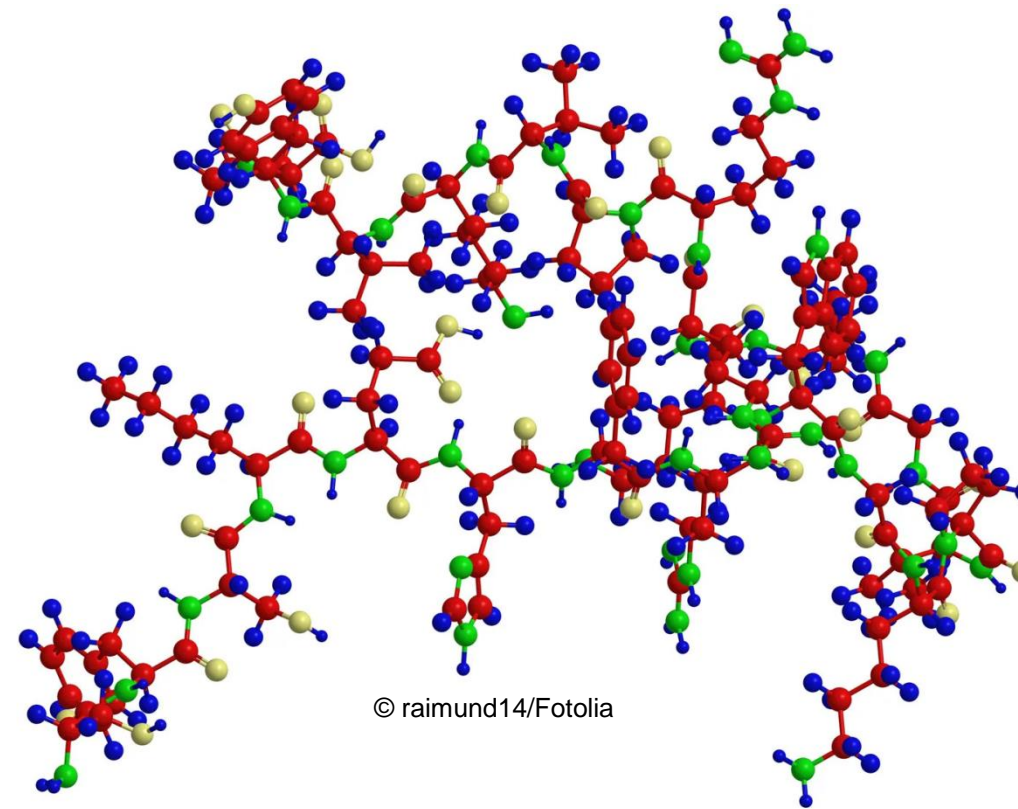


1. Vaccinul candidat împotriva SARS – CoV – 2

- ❖ Propus de Institutul ONCOGEN, Timișoara - lider Prof. Univ. Dr. Păunescu Virgil
- ❖ constituit din 9 peptide sintetice lungi (SLP) care au fost selectate dintre proteina Spike a SARS-CoV-2 și alte 2 cu afinitate crescută de a se lega la o mare varietate de molecule MHC.
- ❖ SLP-urile au fost proiectate folosind un *linker* sensibil la catepsină (LLSVGG) pentru a lega epitopii restricționați MHC clasa I la epitopii restricționați MHC clasa II, epitopul MHC clasa II fiind întotdeauna situat la capătul N-terminal, pentru a stimula atât LTc, cât și LTh.

2. Substanța control

- Calea de administrare: intranazală
- Doză: 5 μ l/ nară (0,04nmoli din fiecare peptidă)
- Frecvență: 4 administrări/ 2săptămâni





Monitorizare:

1. Examen clinic: local și general
2. Examen oftalmoscopic direct și măsurarea presiunii intraoculare
3. Examen hematologic, biochimic, imunologic și al factorilor de coagulare
4. Examen necropsic pentru prelevare de organe, în vederea efectuării examenului histopatologic.



<https://globalnews.ca>



<https://globalnews.ca>



1. Examenul clinic



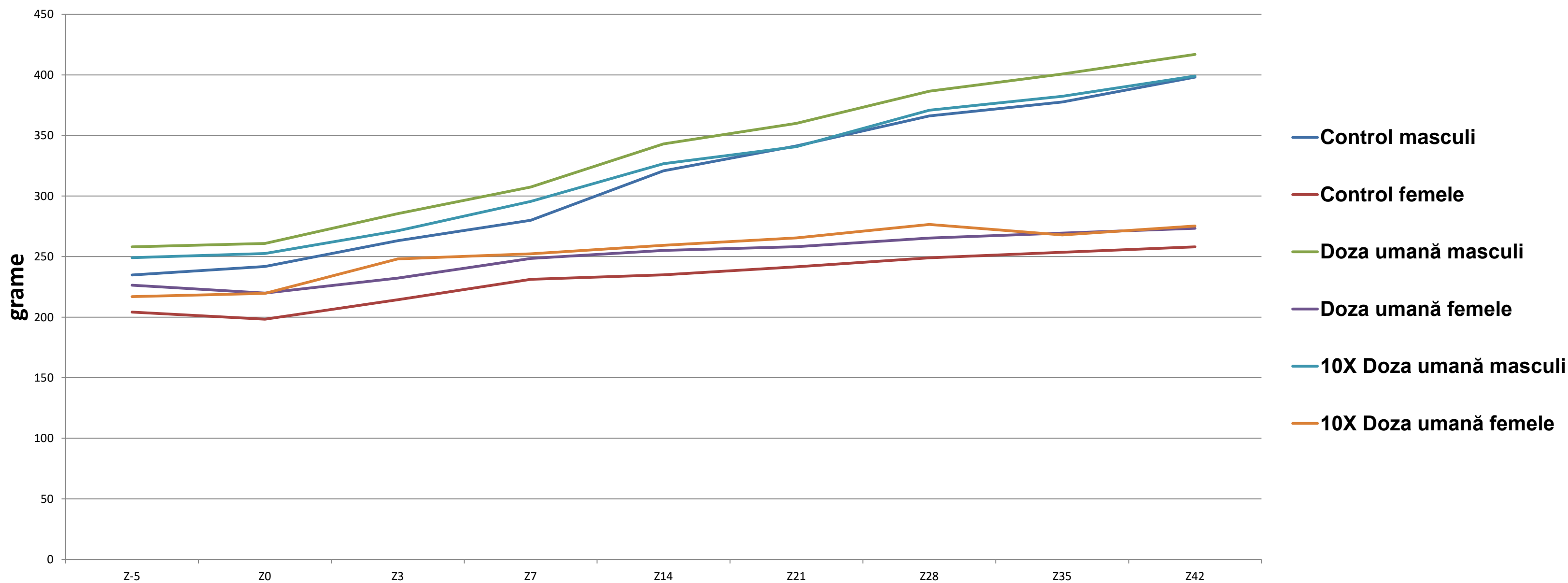
- ! Fecale moi
- ! Epistaxis
- ! Leziuni oculare





Greutatea corporală – monitorizată la ziua -5, 0, 3, 7 apoi săptămânal până la ziua finală a fiecărui grup

Grup Principal

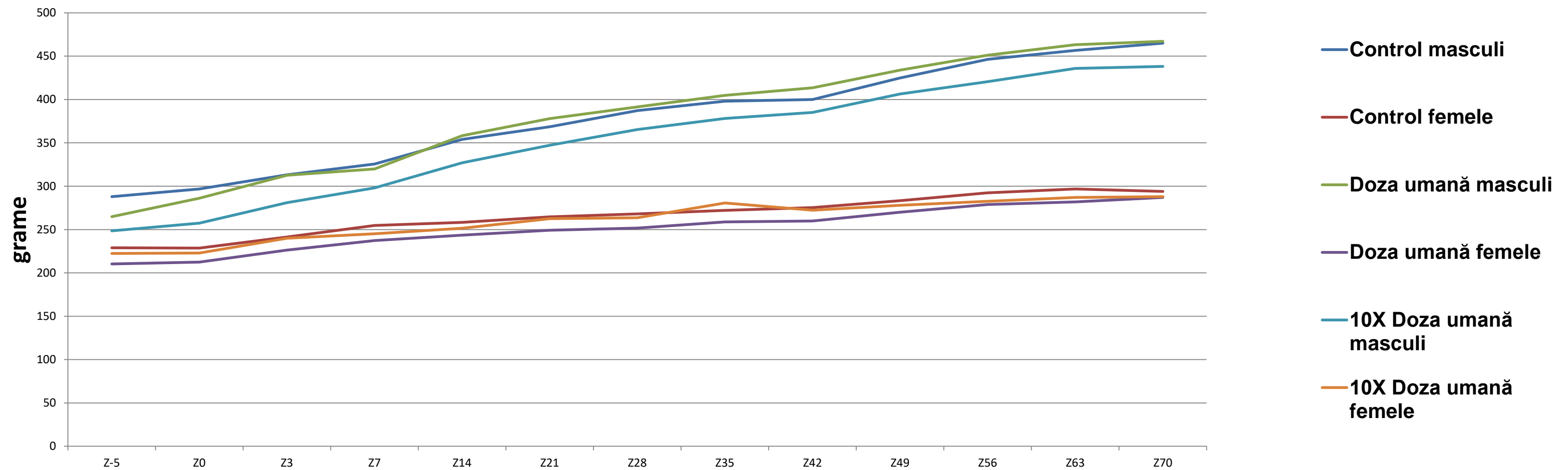


*Z =ziua cântării



Greutatea corporală – monitorizată la ziua -5, 0, 3, 7 apoi săptămânal până la ziua finală a fiecărui grup

Grup Revenire

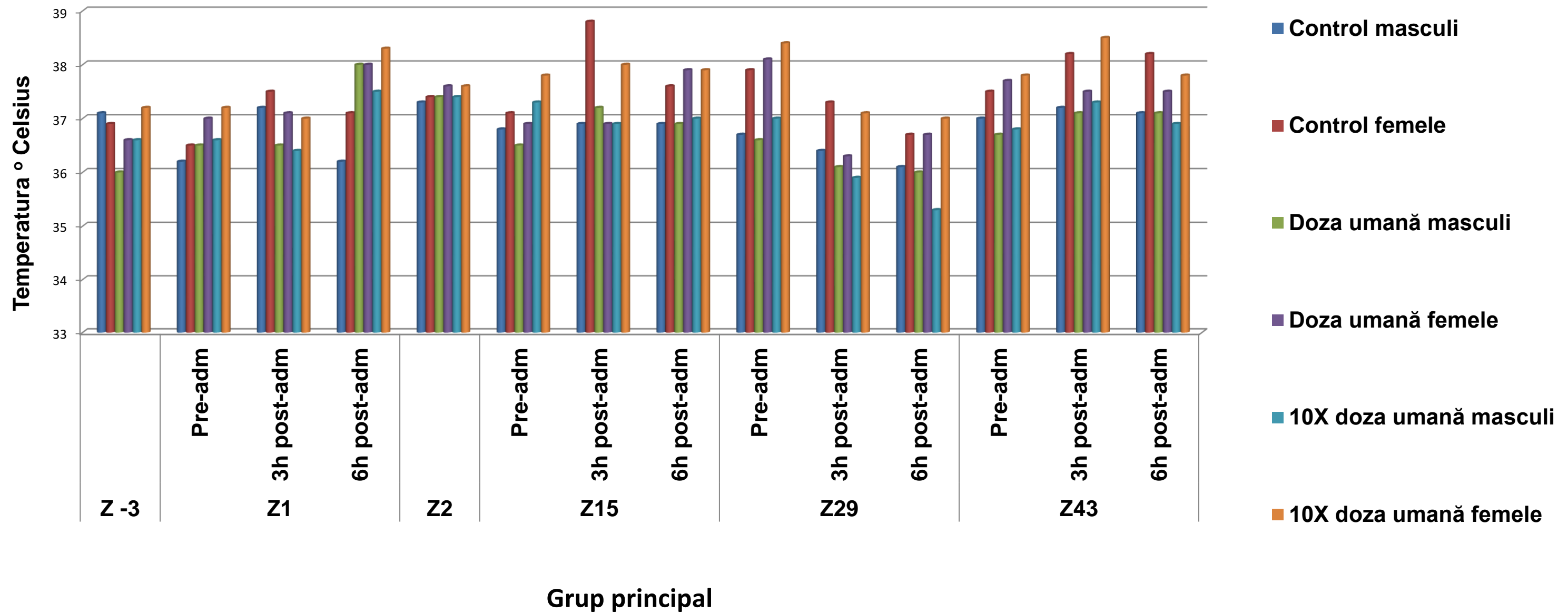


*Z =ziua cântării



Temperatura corporală – măsurată la ziua -3 și în zilele în care a fost administrat vaccinul la trei intervale de timp:

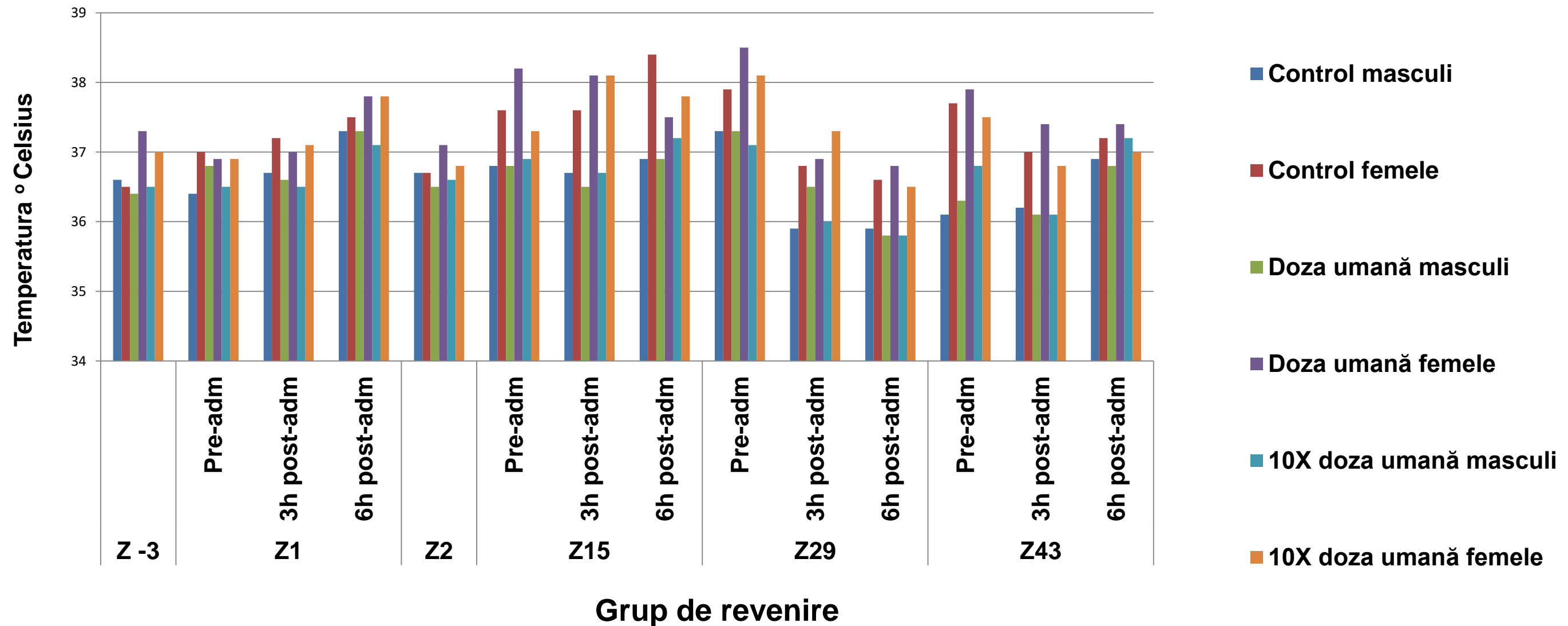
- ✓ Pre – administrare
- ✓ Post – administrare
 - la 3 ore
 - la 6 ore





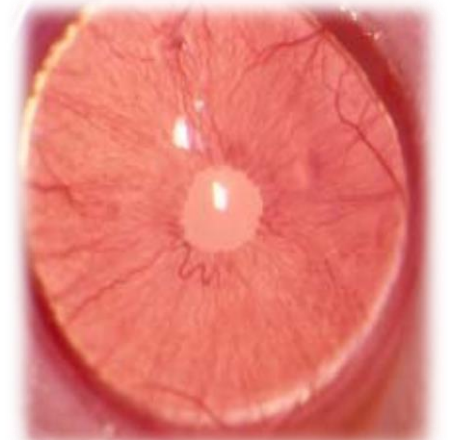
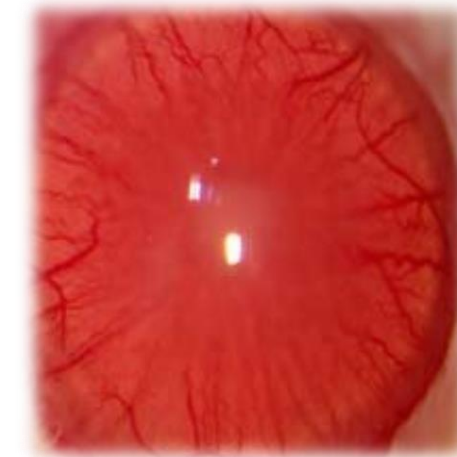
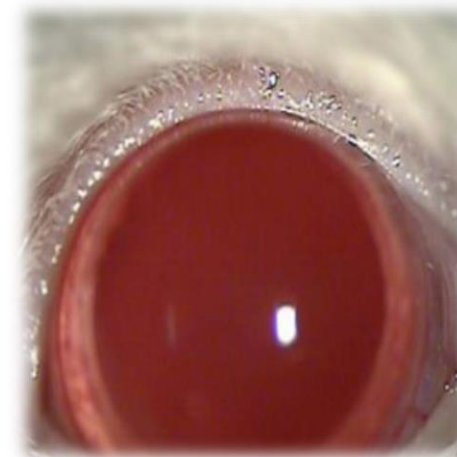
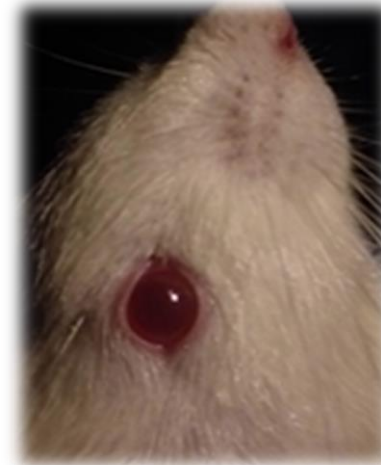
Temperatura corporală – măsurată la ziua -3 și în zilele în care a fost administrat vaccinul la trei intervale de timp:

- ✓ Pre – administrare
- ✓ Post – administrare | la 3 ore
| la 6 ore



Examenul oftalmologic – efectuat la ziua -3, 44 și 70

- Măsurarea presiunii intraoculare (tonometrie)
- Examinarea globului ocular cu oftalmoscopul, în camera obscură



	Control				Lot principal				Lot revenire			
	Masculi	Femele	Masculi	Femele	Masculi 1X	Femele 1X	Masculi 10X	Femele 10X	Masculi 1X	Femele 1X	Masculi 10X	Femele 10X
min	14,2	12	12,7	13,5	14	12,9	13,3	12,6	13	13,4	11,7	13
max	16,11	16,9	18,1	18,22	15,4	19,4	14,5	16,1	14,5	14,1	14,6	14,7

Valori minime și maxime ale presiunii intraoculare (mmHg)



Examenul hematologic

	Grup principal												Grup de revenire											
	Control - masculi		Control - Femele		Doza umană masculi		Doza umană femele		10XDoza umană masculi		10X Doza umană femele		Control - masculi		Control - Femele		Doza umană masculi		Doza umană femele		10XDoza umană masculi		10X Doza umană femele	
	ZO	ZF	ZO	ZF	ZO	ZF	ZO	ZF	ZO	ZF	ZO	ZF	ZO	ZF	ZO	ZF	ZO	ZF	ZO	ZF	ZO	ZF	ZO	ZF
RBCx10 ¹² /L	7,66	8,85	7,85	7,99	7,52	8,68	7,2	8,2	7,67	8,63	7,25	8,32	7,64	9,21	7,77	8,38	7,96	9,19	8,53	8,27	8,13	9,15	8,41	8,07
HCT %	43,04	46,96	43,43	42,34	42,85	46,65	39	42,89	43,31	45,63	39,31	43,59	42,33	47,53	42,43	44,51	45,32	48,2	47,06	43,96	47,18	47,03	46,27	42,38
HGB g/dL	15,1	16,62	15,68	15,06	14,96	15,89	13,92	15,31	15,21	15,99	14,09	15,43	15,06	16,53	15,39	15,63	15,85	16,62	16,49	15,45	16,14	16,34	16,12	14,82
MCV fL	56,28	53,12	55,39	53	57,02	53,63	54,12	52,23	56,99	52,87	54,21	52,4	55,4	51,67	54,72	53,12	56,9	52,47	55,23	53,12	58,24	51,38	54,98	52,49
MCH, pg	19,74	18,82	20,01	18,86	19,92	18,28	19,75	18,68	20,01	18,54	19,51	18,55	19,72	17,96	19,84	18,66	19,9	18,1	19,34	18,67	19,9	17,85	19,17	18,38
MCHC g/dL	35,1	35,43	36,13	35,58	35,01	34,17	36,47	35,74	35,1	35,07	36	35,42	35,62	34,81	36,34	35,14	35	34,49	35,02	35,19	34,2	34,76	34,85	35
RDW %	20,24	19,86	15,92	16,52	20,37	19,16	17,08	17,14	19,96	18,72	18,52	17,98	19,18	21,65	17,8	18,92	19,42	20,66	18,97	18,86	21,31	21,34	17,79	17,95
%RETIC RETIC	5,74	2,41	3,47	2,7	5,58	2,2	3,84	1,98	5,89	2,16	4,11	1,98	4,4	2,58	4,8	2,84	4,42	2,22	3,83	3,32	5,5	2,6	3,11	2,86
K/ μ L	404,28	212,51	271,05	215,17	570,24	187,97	272,5	160,12	390,52	186,84	292,91	161,41	320,06	237,56	241,36	236,95	348,92	202,27	323,14	271,64	377,54	238	261,72	232,67
WBCx10 ⁹ /L	9,44	7,07	9,76	3,64	9,51	7,6	7,35	5,92	10,54	7,08	7,13	7,23	10,19	6,69	8,5	4,75	11,05	7,94	9,24	4,54	11,72	7,27	7,64	4,19
%HETERO	11,38	14,75	5,36	6,92	12,03	12,21	4,35	6,12	12,33	14,53	6,98	10,61	11,86	13,59	5,81	8,12	10,41	13,88	7,71	15,58	20,56	18,05	9,51	11,34
%LYM	84,88	80,85	92,08	90,17	83,93	84,36	93,02	90,43	83,75	81,78	89,88	85,67	83,63	80,34	91,55	88,6	85,77	81,84	89,48	80,98	69,45	77,91	87,72	85,56
%MONO	3,31	2,47	2,19	2,4	3,57	2,98	2,21	2,93	3,36	3,21	2,46	3	3,91	5,29	2,23	2,91	3,35	3,66	2,35	3,13	9,07	3,57	2,45	2,56
%EOS	0,27	1,63	0,2	0,3	0,28	0,34	0,32	0,43	0,38	0,36	0,44	0,56	0,46	0,54	0,26	0,29	0,3	0,43	0,32	0,18	0,26	0,3	0,18	0,41
%BASO	0,16	0,27	0,17	0,2	0,16	0,11	0,07	0,09	0,16	0,12	0,21	0,14	0,12	0,24	0,13	0,08	0,16	0,16	0,12	0,13	0,17	0,17	0,14	0,11
HETEROx 10 ⁹ /L	1,08	1,04	0,5	0,26	1,07	0,97	0,36	0,33	1,31	1,04	0,51	0,91	1,23	0,97	0,48	0,37	1,14	1,15	0,65	0,71	2,26	1,29	0,71	0,53
LYMx10 ⁹ /L	8	5,71	9,01	3,27	8,06	6,36	7,74	5,4	8,83	5,78	7,15	6,05	8,5	5,32	7,8	4,22	9,48	6,46	8,33	3,66	7,95	5,68	6,71	3,53
MONOx10 ⁹ /L	0,31	0,16	0,21	0,09	0,33	0,23	0,19	0,17	0,34	0,23	0,19	0,22	0,39	0,34	0,18	0,13	0,37	0,28	0,2	0,15	1,03	0,26	0,18	0,1
EOSx10 ⁹ /L	0,02	0,12	0,02	0,01	0,02	0,03	0,02	0,03	0,03	0,02	0,03	0,03	0,05	0,03	0,02	0,01	0,03	0,03	0,02	0,01	0,03	0,02	0,01	0,01
BASOx10 ⁹ /L	0,02	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,004	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,004
PLT, K/ μ L	646,8	731	618,4	396	893,87	570,22	418,14	545,88	511,25	637,75	458,55	681,33	668,55	693,2	539,77	645,11	608,75	741,33	581	544,66	710,55	626,1	541,2	513,57
MPV, fL	7,62	8,17	7,69	8,23	7,77	8,49	9,12	8,42	7,91	8,47	8,32	7,83	8,2	7,89	7,68	8,15	8,18	7,83	7,82	8,17	8,03	7,78	7,66	8,52
PDW, fL	7,52	7,65	7,65	7,22	7,51	7,61	7,5	7,52	7,2	7,66	7,34	7,68	7,21	7,69	7,2	7,41	7,16	7,5	7,41	7,37	7,96	7,68	7,51	7,51
PCT%	0,48	0,51	0,47	0,31	0,66	0,41	0,31	0,39	0,4	0,46	0,33	0,53	0,55	0,54	0,41	0,45	0,46	0,58	0,45	0,37	0,56	0,48	0,41	0,31



Examenul biochimic

Valori medii Ziua 0

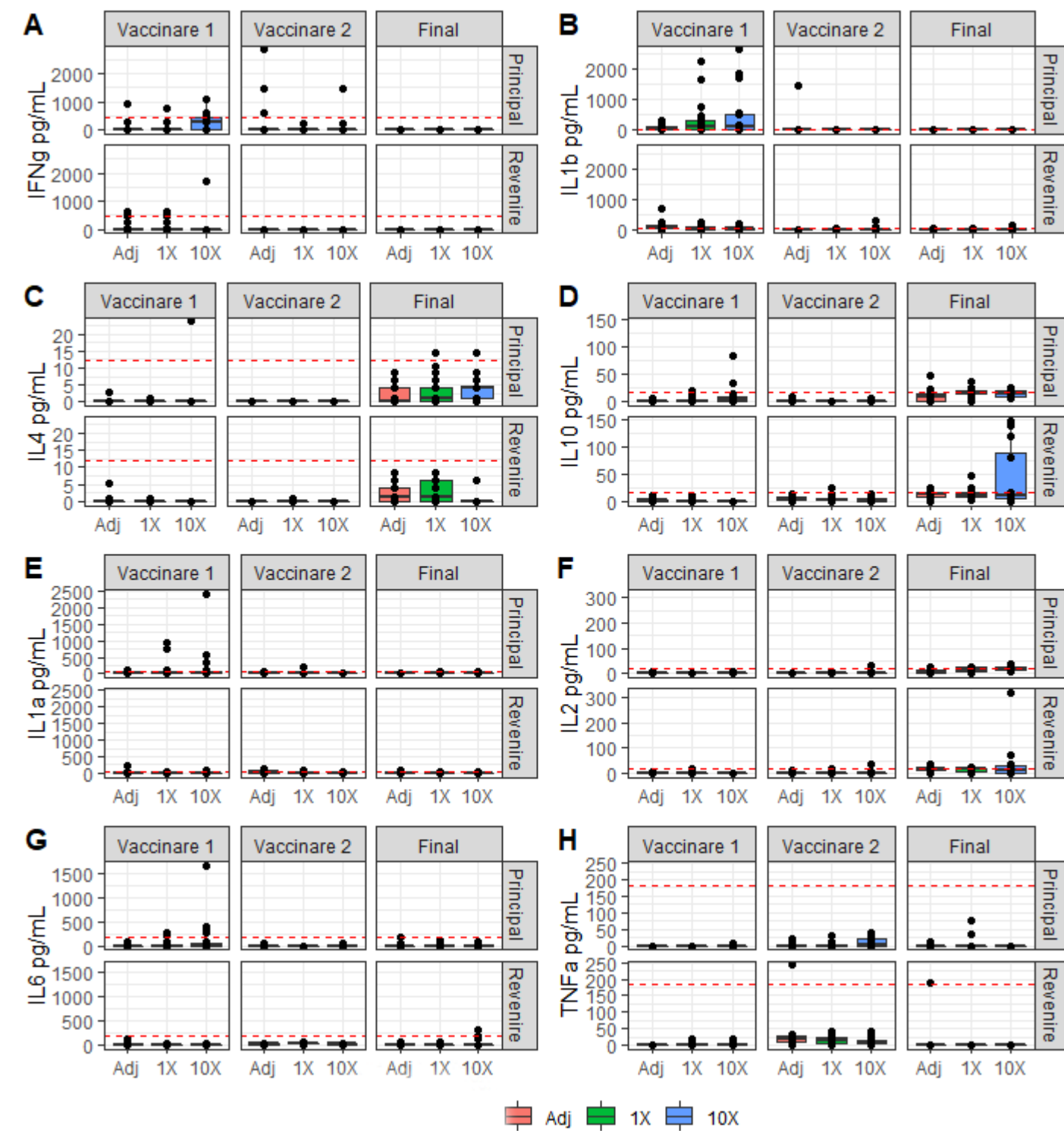
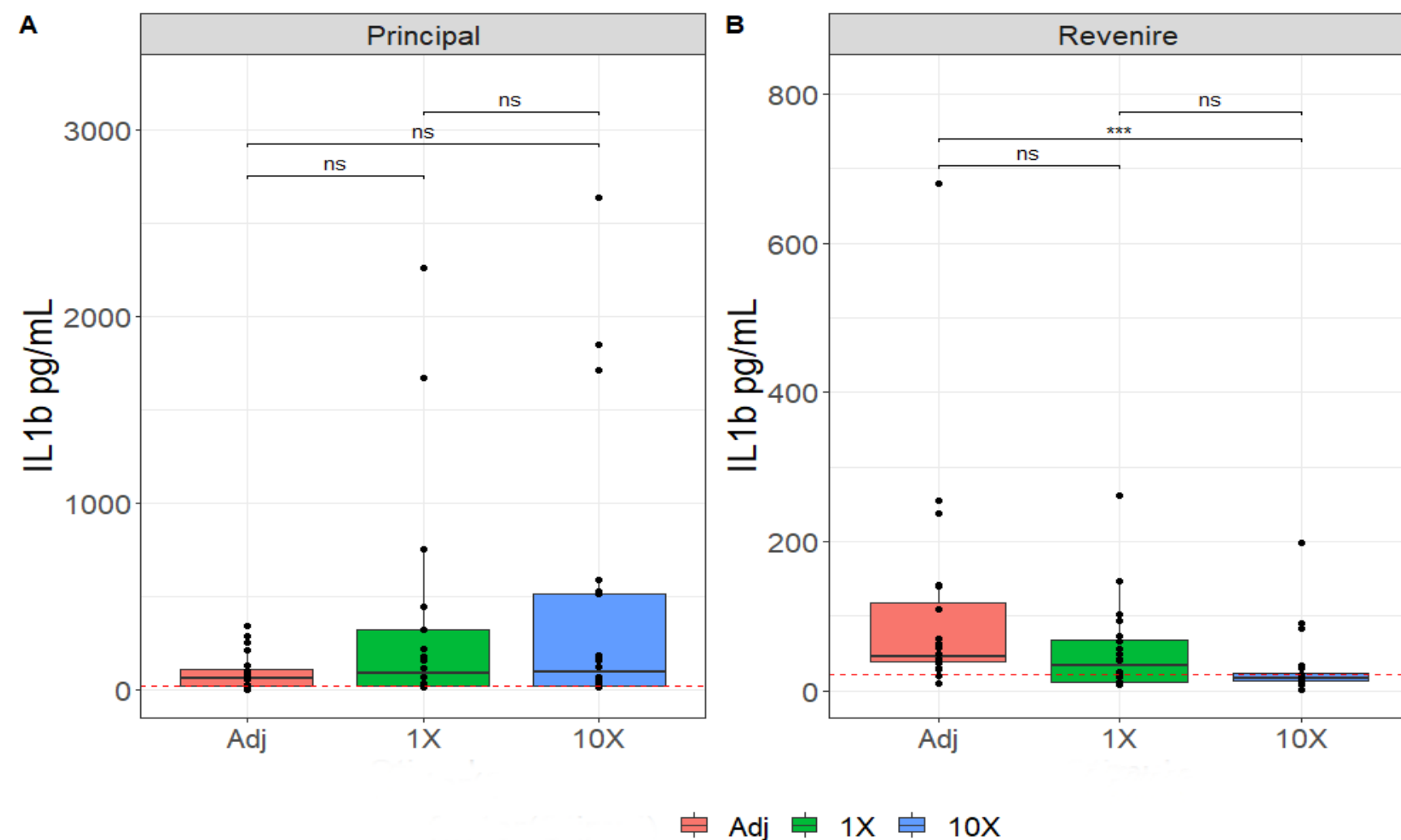
		GLU mg/dl	CREA mg/dL	BUN mg/dL	PHOS mg/dL	TP g/dL	ALB g/dL	GLOB g/dL	ALT U/L	AST U/L	ALKP U/L	TBIL mg/dL	CHOL mg/dL
Control masculi	Media	128,4	0,1	16,4	6,38	6,2	3,11	3,1	76,3	76,7	186,6	0,24	30
	SD	25,93	0,08	5,29	0,81	0,5	0,33	0,34	21,95	49,96	48,92	0,16	31,35
Control femele	Media	143,4	0,32	20,6	5,85	6,39	3,22	3,17	64,9	67,8	115,4	0,2	58,6
	SD	21,62	0,16	3,53	0,72	0,43	0,3	0,38	18,74	18,87	30,83	0,08	24,19
Doza umană masculi	Media	145,5	0,07	16,8	8,05	6,77	3,31	3,45	80	217,71	135,2	0,84	3,88
	SD	34,2	0,08	4,21	1,94	0,64	0,24	0,45	14,62	149,57	24,53	0,75	7,25
Doza umană femele	Media	167,8	0,29	18,9	6,71	6,67	3,61	3,05	51,7	163,6	130,6	0,33	44,85
	SD	46,91	0,13	2,28	1,13	0,39	0,31	0,42	21,28	219,94	67,68	0,52	28,94
10X doza umană masculi	Media	118,1	1,75	17,38	8,61	6,14	3,41	12,89	124,55	56,75	151,66	0,9	5,57
	SD	49,54	5,35	5,12	2,92	1,2	0,29	31,31	71,99	42,82	59,06	1,14	10,32
10X doza umană femele	Media	185,8	0,27	17,4	7,15	6,95	3,65	3,32	81,8	52,28	130	1,53	49,5
	SD	73,33	0,2	2,71	1,92	0,63	0,34	0,65	52,43	24,41	57,72	0,46	38,32

Valori medii Ziua finală

		GLU mg/dl	CREA mg/dL	BUN mg/dL	PHOS mg/dL	TP g/dL	ALB g/dL	GLOB g/dL	ALT U/L	AST U/L	ALKP U/L	TBIL mg/dL	CHOL mg/dL
Control masculi	Media	175,1	0,31	20,6	6,74	6,27	3,19	3,06	47,3	65,1	83,8	0,1	71,3
	SD	44,04	0,09	3,09	1,33	0,42	0,43	0,29	22,32	44	14,48	0,1	18,01
Control femele	Media	180,6	0,31	17,8	5,55	6,32	3,67	2,65	32,1	33,22	49,9	0,18	90,3
	SD	55,75	0,11	2,29	0,77	0,39	0,49	0,71	6,78	24,88	14,89	0,25	14,65
Doza umană masculi	Media	168,5	0,32	18,9	5,62	6,35	3,53	2,82	26,44	28	73,8	0,15	76
	SD	21,94	0,1	2,07	0,17	0,56	0,31	0,4	5,63	16,52	16,1	0,1	15,39
Doza umană femele	Media	175,8	0,34	21,1	4,94	6,98	3,87	3,09	31,9	42,1	58,6	0,16	94
	SD	29,21	0,11	2,13	1,01	0,2	0,27	0,3	8,11	24,36	16,15	0,12	32,19
10X doza umană masculi	Media	158,8	0,28	19,8	6,03	6,39	3,35	3,01	42,3	51,77	88,8	0,1	75,8
	SD	28,95	0,1	2,39	0,67	0,58	0,29	0,42	11,8	23,27	12,55	0,1	11,82
10X doza umană femele	Media	181,5	0,33	21,3	6,12	6,79	3,74	3,05	46,11	47,5	43,1	0,18	96,6
	SD	29	0,08	1,63	1,38	0,47	0,35	0,32	49,98	19,31	10,21	0,16	14,19

Examenul imunologic

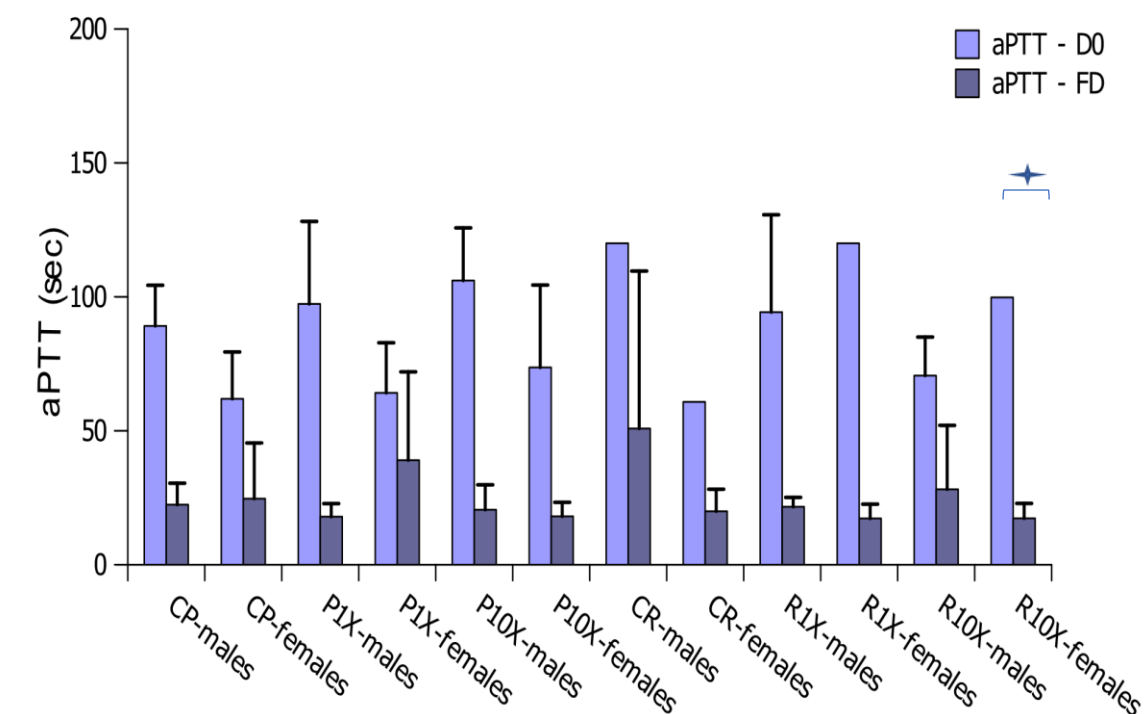
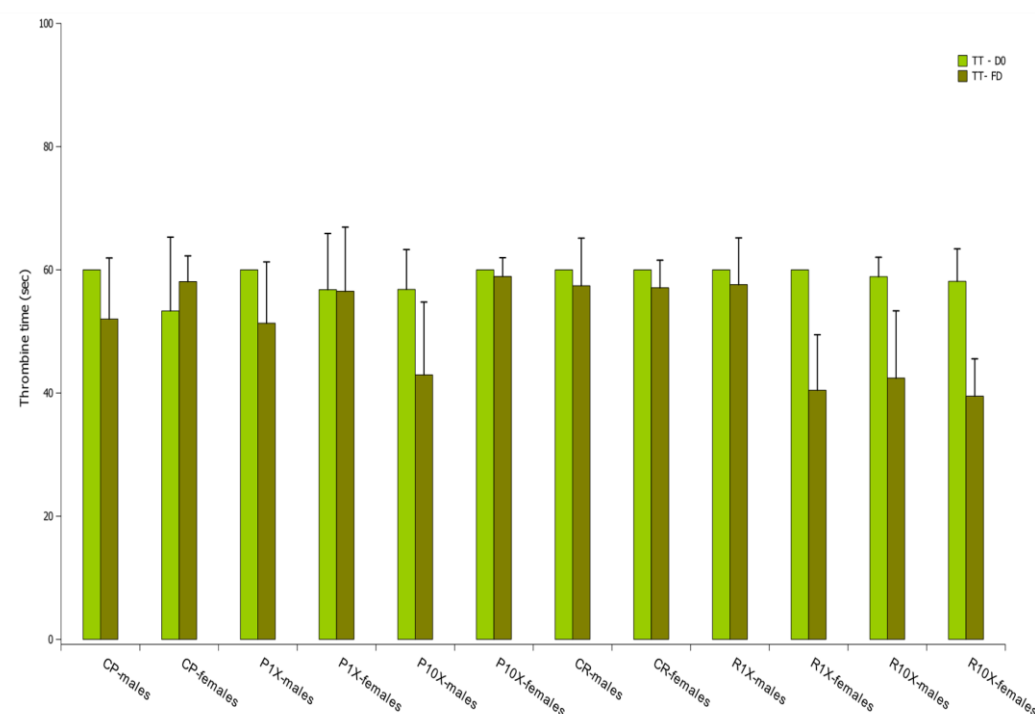
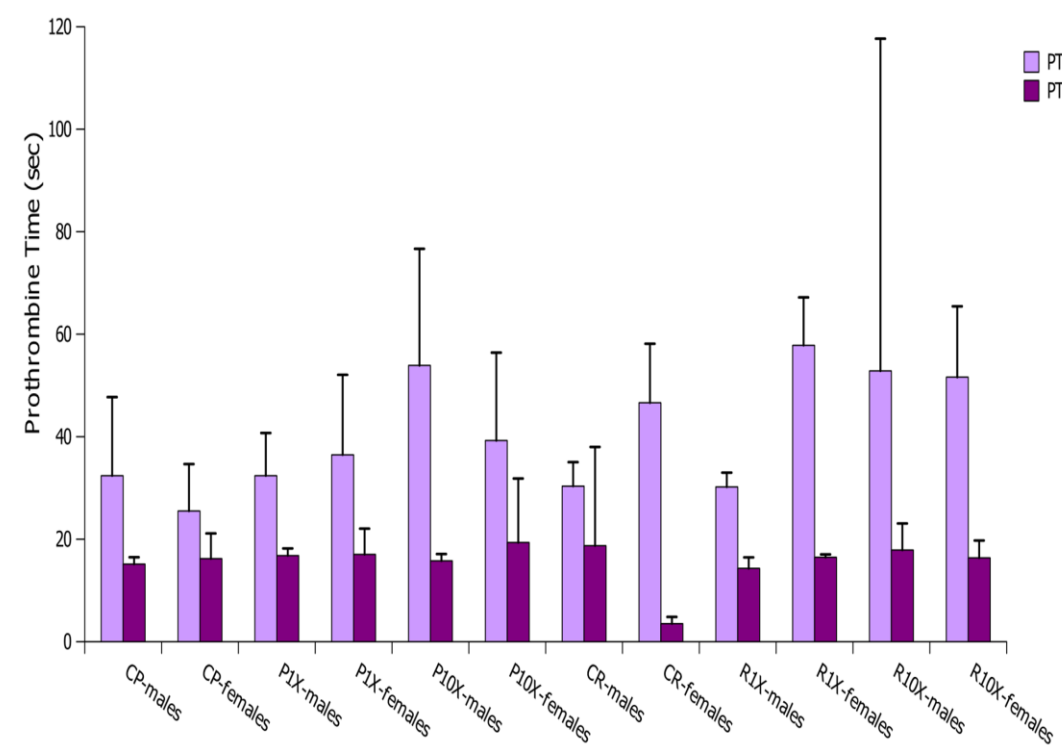
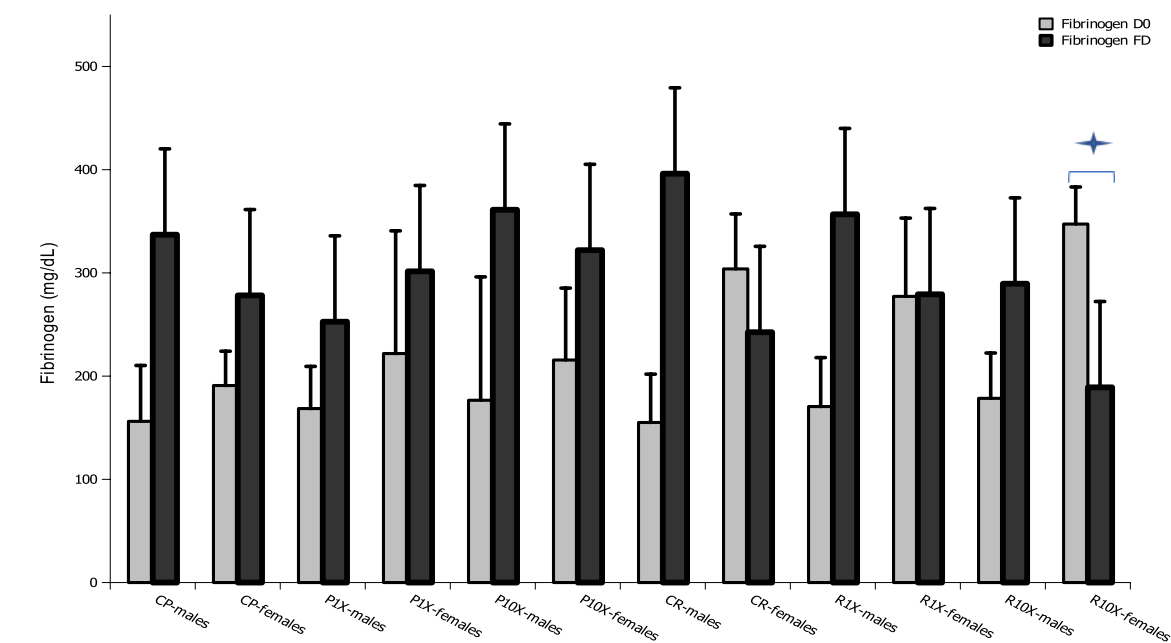
- Realizat din probe de sânge prelucrate în ser, recoltate la Z1, Z15 (la 6 ore de la administrarea substanțelor testate) și la ziua finală (Z46 pentru lotul principal și Z70 pentru lotul de revenire).
- Citokinele circulante din probe de ser au fost testate folosind kituri Rat Luminex Discovery Assay (LXSARM - R&D systems).
- Citokine alese: IFNg, IL-1b, IL-4, IL-10, IL-1a, IL-2, IL-6, TNFa.





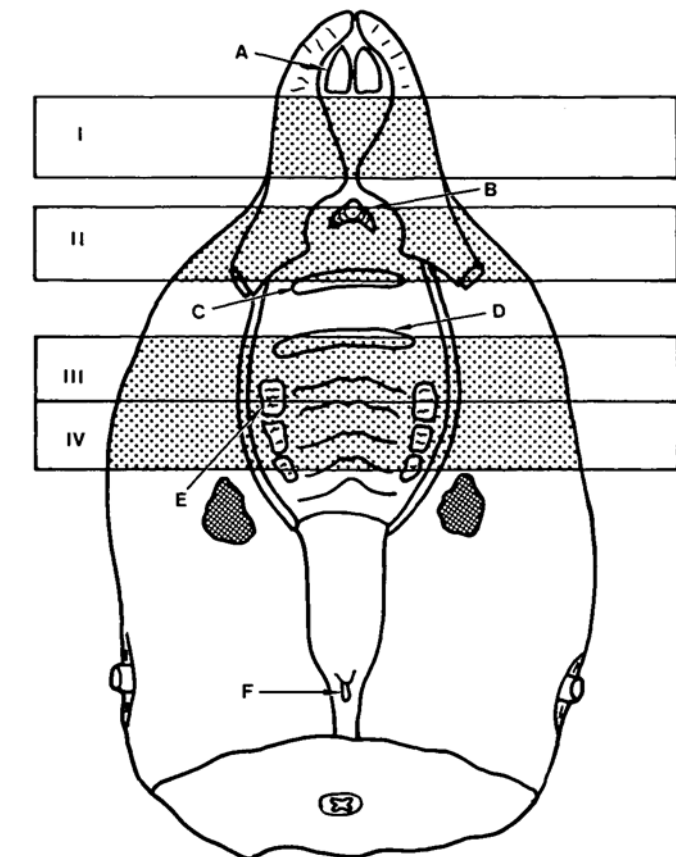
Analiza factorilor de coagulare – la ziua 0 și ziua finală

- Fibrinogen
- Timpul de protrombină
- Timpul de tromboplastină parțial activat
- Timpul de trombină



Examenul necropsic și histopatologic

- Organe precum creierul, tiroida, testicule, epididim, ovare, uter, splină, rinichi, ficat sau cord – cântărite.
- Au fost prelevate 36 probe (organe și țesuturi) de la fiecare animal.
- Examinare a cel puțin cinci secțiuni pentru fiecare organ
- Cavitățile nazale - hiperemie și de dilatație glande olfactorii la un singur șobolan
 - material amorf cristaloid, poligonal, bazofil, în cantitate redusă în ductul nasolacrimal .
- Examenul măduvei osoase
- Alte leziuni observate:
 - hiperemia multiviscerală și edemul alveolar;
 - grade diferite de îngroșare/reactivitate a spațiului interstițial și infiltratul inflamator cu celule mononucleare;
 - materialul proteic decelat la nivel tubular renal.



JOHN T. YOUNG. *Histopathologic Examination of the Rat Nasal Cavity*, 1981



Concluzii



Rezultatele obținute ne permit să concluzionăm că, în urma testului de toxicitate de doză repetată efectuat pe șobolani, vaccinul candidat împotriva SARS – CoV- 2 nu prezintă potențial toxic, ceea ce face posibilă trecerea acestuia spre următoarele faze de testare.



LAB RAT CHAT



Echipele implicate în proiect



Prof. Univ. Dr. PĂUNESCU Virgil
Prof. Univ. Dr. PANAITESCU Carmen
Conf. Univ. Dr. TATU Călin Adrian
Conf. Univ. Dr. BOJIN Maria Florina
Asis. Univ. GAVRILIUC Oana Isabella
CS III ANGHEL Simona
Lector Univ. ORDODI Valentin Laurențiu
CSIII TELEA Ada
CSIII CRISTEA Mirabela
Lector Univ. IVAN Alexandra
Asis. Univ. MĂRGINEANU Michael
Tehn. ZOGOREAN Roxana

Prof. Univ. Dr. POPA Mircea Ioan
CS II Dr. COMAN Cristin
CS I Dr. ONU Adrian
CS II Dr. STĂVARU Crina
CS CARAGHEORGHEOPOL Ramona Cerasela
CS DRAGOMIRESCU Cerasella Cristiana
ACS MUNTEAN Alexandru
ACS CHELMUȘ Raluca
ACS IONESCU Irina
ACS PREDA Mădălina
ACS IONIȚĂ Fabiola
ACS SUHĂIANU Vladimir
ACS ANCUȚA Diana - Larisa



Vă mulțumesc pentru atenție!

