

# PRIPRAVA IN TESTIRANJE TUMORSKE VAKCINE Z OBSEVANJEM

Tinkara Remic<sup>1,2</sup>, Gregor Serša<sup>1,3</sup>, Maja Čemažar<sup>1,4</sup>, Katja Uršič<sup>1,5</sup>, Kristina Levpušček<sup>1,2</sup>,  
Urška Kamensšek<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup> Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup> Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, Ljubljana, SI-1000 Ljubljana, Slovenija

<sup>3</sup> Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena pot 5, 1000 Ljubljana, Slovenija

<sup>4</sup> Fakulteta za zdravstvene vede, Univerza na Primorskem, Polje 42, 6310 Izola, Slovenija

<sup>5</sup> Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva ulica 101, 1000 Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: tremic@onko-i.si

---

## Izvleček

Namen raziskave je bil pripraviti in testirati novo tumorsko vakcino, pripravljeno iz z obsevanjem ubitih tumorskih celic, z adjuvantnim genskim elektroprenosom IL-12. Učinkovitost vakcine smo testirali v kombinaciji z radioterapijo. Raziskave smo izvedli na dveh imunološko različnih tumorskih modelih B16-F10 in CT26, na singenih miši C57Bl/6 in Balb/c. Za oba tumorska modela smo uspešno pripravili učinkovito tumorsko vakcino. S terapevtsko vakcinacijo v kombinaciji z obsevanjem smo dosegli značilen doprinos vakcine k protitumorskemu učinku obsevanja na B16-F10 (sinergizem). S preventivno vakcinacijo smo preprečili izrast do 56 % CT26 tumorjev. Z izbranim optimalnim obsevalnim ( $5 \times 5$  Gy) in vakcinacijskim ( $1 \times$  za B16-F10 ter  $3 \times$  za CT26) režimom smo potrdili lokalni in sistemski imunski odziv na vakcinacijo. Rezultati raziskave so pokazali potencial razvite tumorske vakcine v kombinaciji z obsevanjem ter so osnova za nadaljnje raziskave.

**Ključne besede:** tumorska vakcina, obsevanje, genski elektroprenos, IL-12

---

## Uvod

Avtologne tumorske vakcine so vrsta terapevtskih vakcin za zdravljenje raka. Pripravljene so iz spremenjenih in z obsevanjem inaktiviranih ali liziranih bolnikovih tumorskih celic, ki so pomemben vir tumorskih antigenov (1, 2). Namen raziskave je bil pripraviti in testirati novo tumorsko vakcino, pripravljeno iz z obsevanjem ubitih tumorskih celic, z adjuvantnim genskim elektroprenosom (GEP) plazmida z zapisom za imunostimulatorni citokin interlevkin-12 (IL-12) (3). GEP je varna ne-virusna metoda vnosa genov v celice in najbolj raziskan je ravno GEP IL-12 (4, 5), ki je trenutno že v klinični fazi preizkušanja (6). Razvito vakcino smo kombinirali z radioterapijo. Z vakcino smo nameravali aktivirati imunski odziv proti tumorskim antigenom, z radioterapijo pa usmeriti aktiviran imunski odziv proti zdravljenemu tumorju (1, 7).

## Materiali in metode

Raziskave smo izvedli na imunološko različnih tumorskih modelih B16-F10 in CT26, na singenih miši C57Bl/6NCrl ali Balb/cAnNCrl v skladu z navodili in dovoljenjem Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano Republike Slovenija (U34401-1/2015/43 in U34401-35/2020/8). Tumorsko vakcino smo pripravili iz z obsevanjem ubitih tumorskih celic in dodali plazmidno DNA z zapisom za mišji IL-12.

Vakcinacijo smo izvedli z injiciranjem vakcine v podkožje na hrbtu miši in s kontaktno več-točkovno elektrodo aplicirali nizkonapetostne električne pulze (24 pulzov, 170 V/cm, 5,64 Hz, 150 ms) za adjuvantni genski elektroprenos IL-12, prisotnega v vakcini. Terapevtski učinek vakcine smo testirali v kombinaciji z obsevanjem (IR). Najprej smo inducirali podkožne tumorje. S terapijo smo pričeli, ko so tumorji dosegli velikost 30-40 mm<sup>3</sup>. Vakcinacijo smo izvedli v kožo oddaljeno od tumorja. Tumorje smo obsevali z dozo 15 Gy. Protitumorski učinek smo spremljali z merjenjem velikosti tumorja in izračunom volumna ( $V=a \times b \times c \times \pi/6$ ). Za določitev preventivnega učinka vakcine smo najprej aplicirali vakcino in nato inducirali tumorje in spremljali njihov izrast. Z izbrano kombinacijo optimalnih režimov na obeh tumorskih modelih smo nato določili lokalni in sistemski imunski odziv na vakcinacijo: z imunohistokemično analizo smo v koži na mestu vakcinacije in v tumorjih določili prisotnost grancim B+ efektorskih limfocitov (celice NK in celice T ubijalke), CD68+ makrofagov ter FoxP3+ celic T zaviralk, s testom FluoroSpot pa prisotnost tumorsko specifičnih efektorskih limfocitov v bezgavkah (GrB+/IFN $\gamma$ + celice NK in celice T ubijalke).

## Rezultati

Terapevtska vakcinacija je značilno doprinesla k protitumorskemu učinku obsevanja pri tumorskem modelu B16-F10 ( $2.97 \pm 1$  dni daljši zaostanek v rasti tumorjev kot po obsevanju,  $P < 0,05$ ), ne pa tudi pri modelu CT26 (ns). Po drugi strani pa smo s preventivno vakcinacijo preprečili izrast do 56 % CT26 tumorjev, ne pa tudi B16-F10 tumorjev. Po optimizaciji obsevalnega in vakcinacijskega režima smo za B16-F10 tumorski model izbrali  $5 \times 5$  Gy in  $1 \times$  vakcinacijo ( $2,17 \pm 0,38$  dni daljši zaostanek v rasti tumorjev kot po obsevanju,  $P < 0,05$ ) za CT26 pa  $5 \times 5$  Gy in  $3 \times$  vakcinacijo ( $8,45 \pm 1,2$  dni daljši zaostanek v rasti tumorjev in  $2 \times$  višjo ozdravljivost tumorjev - 60 %, kot po obsevanju,  $P < 0,05$ ). Med optimizacijo režimov smo pri B16-F10 modelu opazili večji vpliv spremembe obsevalnih režimov na učinkovitost kombinirane terapije, za razliko od CT26 modela, kjer je sprememba režima vakcinacije imela večji vpliv na učinkovitost terapije. Z izbranim režimom smo na B16-F10 modelu na mesto vakcine privabili makrofage in efektorske limfocite ( $P < 0,05$ ). V B16-F10 tumorjih smo zaznali trend povišanja makrofagov, efektorskih limfocitov in celic T zaviralk, vendar le po kombinirani terapiji (ns). Prav tako smo po kombinirani terapiji dobili značilno povišano količino efektorskih limfocitov v bezgavkah ( $P < 0,05$ ). Na CT26 modelu smo z izbranim režimom na mesto vakcinacije prav tako privabili makrofage ( $P < 0,05$ ), nismo pa zvišali prisotnosti efektorskih limfocitov. Ta se je zvišala šele s kombinacijo z radioterapijo ( $P < 0,05$ ). Zanimivo je, da smo v tumorjih pri tem modelu zaznali trend znižanja količine makrofagov po kombinirani terapiji (ns).

## Razprava

Priprava tumorske vakcine se je izkazala za velik izziv zaradi različnega odziva obeh tumorskih modelov, predvidoma zaradi različne intrinzične imunogenosti izbranih modelov (8). Predpostavljamo, da pri manj imunogenem B16-F10 tumorskem modelu z obsevanjem izpostavimo tumorske antigene in vzpostavimo bolj imunoreaktivno tumorsko mikrookolje ter s tem omogočimo delovanje vakcine (7, 9). Zato smo pri tem modelu med optimizacijo terapevtskih režimov opazili večji vpliv sprememb v obsevalnem režimu na učinkovitost kombinirane terapije. Temeljno vlogo obsevanja

pri kombinirani terapiji smo dodatno potrdili z imunohistokemično in s FluoroSpot analizo, kjer smo s kombinirano terapijo značilno zvišali prisotnost imunskih celic na mesto vakcinacije in tumorsko specifičnih imunskih celic v bezgavkah. Pri bolj imunogenem CT26 tumorskem modelu pa smo s preventivno vakcinacijo omogočili, da imunski sistem prepozna že izpostavljene tumorske antigene na tumorskih celicah in jih lahko uniči. Zato je pri tem modelu sprememba režima vakcinacije bolj vplivala na učinkovitost kombinirane terapije, kot pa sprememba obsevalnega režima. Z optimizirano kombinirano terapijo smo tudi pri tem modelu na mesto vakcinacije privabili makrofage, medtem ko se je nakazalo, da v tumorjih s kombinirano terapijo celo znižamo količino makrofagov v primerjavi s samo radioterapijo. Za boljše razumevanje mehanizmov delovanja razvite vakuine so potrebne nadaljnje raziskave. Raziskava je pa nakazala, da bo za pripravo avtolognih vakcin pripravljenih z biopsijo tumorjev, potreben zelo individualen pristop, ki bo upošteval tako intrinzične lastnosti samih tumorskih celic, kot tudi lastnosti tumorskega mikrokolja.

## Zahvala

Zahvaljujem se sodelavcem iz Oddelka za eksperimentalno onkologijo za njihovo pomoč, ter finančni podpori Javne agencije za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (P3-0003).

## Literatura

1. Wennerberg E, Vanpouille-Box C, Bornstein S, et al. Immune recognition of irradiated cancer cells. *Immunol Rev* 2017; 280(1): 220-30.
2. Remic T, Sersa G, Ursic K, Cemazar M, Kamensek U. Development of tumor cell-based vaccine with IL-12 gene electrotransfer as adjuvant. *Vaccines* 2020; 8(1): 8-14.
3. Trinchieri G. Interleukin-12: A proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 1995; 13(1): 251-76.
4. Pavlin D, Cemazar M, Sersa G, et al. IL-12 based gene therapy in veterinary medicine. *J Transl Med* 2012; 10(1): 1.
5. Sersa G, Teissie J, Cemazar M, et al. Electrochemotherapy of tumors as in situ vaccination boosted by immunogene electrotransfer. *Cancer Immunol Immunother* 2015; 64(10): 1315-27.
6. Search of: IL-12 electroporation - List Results - ClinicalTrials.gov. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?recrs=&cond=&term=IL-12+electroporation&cntry=&state=&city=&dist=>
7. Cadena A, Cushman T, Anderson C, et al. Radiation and Anti-cancer vaccines: a winning combination. *Vaccines* 2018; 6(1): 9.
8. Mosely SIS, Prime JE, Sainson RCA, et al. Rational selection of syngeneic preclinical tumor models for immunotherapeutic drug discovery. *Cancer Immunol Res* 2016; 5(1): 29-41.
9. Formenti SC, Demaria S. Combining radiotherapy and cancer immunotherapy: a paradigm shift. *J Natl Cancer Inst* 2013; 105(4): 256-65.