

GENSKI ELEKTROPRENOS REPORTERSKE mRNA V B16F10 IN CT26 CELIČNI LINIJI

Ajda Medved^{1,2}, Urša Lampreht Tratar^{1,3}, Matjaž Peterka⁴, Urban Bezeljak^{4,5}, Nastja Štemberger⁴, Tjaša Marušič^{5,6}, Maja Čemažar^{1,7}

¹ Onkološki inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

² Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Ljubljana, Slovenija

³ Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Ljubljana, Slovenija

⁴ COBIK, Ajdovščina, Slovenija

⁵ Sferogen d.o.o., Ajdovščina, Slovenija

⁶ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Ljubljana, Slovenija

⁷ Univerza na Primorskem, Fakulteta za vede o zdravju, Izola, Slovenija

Interlevkin 12 (IL-12) je imunostimulatorni citokin, ki ima potencial za zdravljenje raka v kliniki, saj je vključen v različne mehanizme, ki izničujejo učinek imunosupresivnega tumorskega mikrookolja. Na sistemski ravni je IL-12 toksičen, zato je glavni interes predkliničnih raziskav razvoj dostavnih metod, kot je genski elektroprenos (GET), s katerim dosežemo optimalno koncentracijo IL-12 v tumorskem mikrookolju in hkrati zmanjšamo sistemsko izpostavljenost. Prvi korak pri uvajanju terapije v klinično prakso je neklinična *in vitro* ocena terapevtske molekule in metode dostave, ki služi kot osnova za nadaljnje *in vivo* testiranje. Plazmidna DNA (pDNA), ki kodira IL-12, se je že izkazala za skladno z Evropskimi smernicami glede kakovosti medicinskih izdelkov in je v kombinaciji z GET primerna za klinična testiranja (1). Genska terapija na osnovi mRNA služi kot alternativna metoda terapijam na osnovi pDNA. mRNA transkripti imajo v nasprotju s pDNA višjo stopnjo transfekcije, nižjo toksičnost in ne zahtevajo vstopa v jedro, saj prepis v protein poteka v citoplazmi, kar zmanjša tudi tveganje za insercijsko mutagenozo. mRNA molekule so bile zaradi dovzetnosti za hidrolitično razgradnjo predhodno obravnavane kot neprimerne za terapevtsko uporabo. Stabilnost molekul je zelo pomembna za nadzor genske ekspresije in jo je mogoče izboljšati s številnimi kemijskimi modifikacijami, kot so dodajanje kape (capping), optimizacija zaporedja in podaljšanje poliA repa (2). Namen naše raziskave je bil določiti učinkovitost transfekcije mRNA GET ter viabilnost melanomskih (B16F10) in karcinomskih (CT26) celic po mRNA GET. V ta namen smo zasnovali reportersko mRNA molekulo, ki kodira zeleno fluorescirajoči protein (EGFP mRNA), s podaljšanim poliA repom in N7-metilgvanozinom (Cap 0) na 5'-koncu. EGFP mRNA v različnih koncentracijah (0,06, 0,125, 0,25, 0,5 in 1 mg/ml) smo dodali celicam in preko ploščate elektrode razmika 2 mm dovajali pulze, generirane z generatorjem električnih pulzov CLINIPORATOR® (IGEA S.P.A., Carpi, Italija). S pomočjo pretočne citometrije (FACSCanto II pretokovni citometer (BD Biosciences)) smo določili učinkovitost transfekcije ob različnih časovnih točkah (4 do 168 ur) po GET. Viabilnost celic je bila določena 3 dni po GET s PrestoBlue™ Cell Viability Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA ZDA) testom. Rezultati transfekcijske učinkovitosti in viabilnosti celic po GET z reportersko mRNA so pokazali najvišji delež transfekcije in najdaljše izražanje zelenofluorescirajočega proteina pri koncentraciji 0,5 µg/µl, ki pa ni imela velikega vpliva na viabilnost celic. Ti rezultati tako postavljajo osnovo za nadaljnje *in vitro* in *in vivo* poskuse s terapevtsko mRNA.

Zahvala

Raziskava je potekala v okviru raziskovalnega programa P3-0428 in raziskovalnega projekta L3-50111, ki ju financira ARIS.

Literatura

1. Kos S, et al. *Pharmaceutics*. 2021; 13,10 1739.
2. Boo SH, et al. *Expert Mol Med*. 2020;52:3.

p13