

# BAKTERIOFAGI KOT NOSILCI TUMORSKIH ANTIGENOV: NOVA STRATEGIJA V IMUNOTERAPIJI RAKA

Andrej Cör<sup>1,2</sup>, Nuša Brišar<sup>2</sup>, Simona Kranjc Brezar<sup>3</sup>, Katja Šuster<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ortopedska bolnišnica Valdoltra, Ankaran, Slovenija

<sup>2</sup> Fakulteta za vede o zdravju, Univerza na Primorskem, Izola, Slovenija

<sup>3</sup> Onkološki Inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: andrej.coer@ob-valdoltra.si

Osnovni mehanizem delovanja protitumorskih cepiv temelji na aktivaciji tumorsko specifičnih T-limfocitov. Ti prepoznajo in uničujejo tumorske celice, potem ko jim ustrezne tumorske antigene predstavijo antigen predstavitvene celice (APC). V klinični praksi se je pokazalo, da so peptidna cepiva sicer obetavna in učinkovita pri sprožanju specifičnega imunskega odziva, a imajo številne omejitve. Njihova priprava je zahtevna, pogosto zelo draga, hkrati pa peptidi sami po sebi kažejo nizko imunogenost in slabo biokemično stabilnost. Zaradi teh pomanjkljivosti se raziskovalci usmerjajo k razvoju alternativnih nosilcev antigenov, pri čemer posebno mesto zasedajo virusni sistemi, saj jih APC učinkovito prepoznajo, internalizirajo, procesirajo na njih predstavljene tumorske antigene ter jih predstavijo imunskemu sistemu.

Med novejšje in inovativne pristope sodi uporaba bakteriofagov. Bakteriofagi (krajše fagi) so virusi, ki naravno okužijo zgolj bakterije in so zato varni za uporabo pri sesalcih, saj ne okužijo evkariontskih celic. V zadnjih letih so fagi najbolj prepoznavni zaradi svoje vloge pri premagovanju naraščajoče protibakterijske odpornosti, vendar imajo bistveno širši potencial. Fage je mogoče zelo enostavno genetsko prilagoditi, so izjemno stabilni in ponujajo veliko površino za predstavitev tujih antigenov. S tehniko predavitve na fagu lahko njihov genom spremenimo tako, da na površini izražajo različne peptide ali proteine. Ker so fagi že sami po sebi do neke mere imunogeni, njihova modifikacija dodatno spodbuja aktivacijo tako prirojene kot pridobljene imunosti, in sicer tako humoralne kot celične. Zaradi teh lastnosti se fagi uvrščajo med obetavne nanodelce za razvoj novih cepiv, vključno s protitumorskimi.

Namen naše raziskave je bil razviti cepivo na osnovi bakteriofagov ter preveriti njegovo protitumorsko učinkovitost na mišjem modelu malignega melanoma. Dodatno nas je zanimalo, ali se fagno cepivo lahko kombinira z drugimi oblikami imunoterapije raka, zlasti z genskimi pristopi, ki povečujejo imunske aktivacije v tumorju.

S pomočjo tehnike predavitve na fagu smo filamentozne bakteriofage M13 genetsko spremenili tako, da so na površini izražali tri različne tumorske peptide: MAGE-A1, gp100 in MAET-1/MELAN-A. Pripravili smo koktajl treh modificiranih fagov in terapevtski potencial tako pripravljenega cepiva preizkusili *in vivo* na mišjem modelu melanoma B16-F10 pri sevih C57BL. Cepivo smo preizkušali samostojno in v kombinaciji z genskim elektroprenosom (GET) plazmida, ki kodira citokin IL-12. GET omogoča učinkovit vnos plazmidne DNK neposredno v tkiva, kar privede do lokalne tvorbe IL-12, enega ključnih imunostimulacijskih dejavnikov, ki spodbuja diferenciacijo T-celic in krepi protitumorsko imunost.

Uspešnost izražanja antigenov na površini fagov smo potrdili s testom ELISA in masno spektrometrijo, imunski odziv pa smo dodatno ovrednotili z imunocitokemijo. Rezultati so pokazali, da je bila pri miših, ki so prejele modificirane fage, rast tumorjev značilno zavrta. Poleg tega se je življenjska doba teh miši izrazito podaljšala – petkrat v primerjavi z nezdravljenimi kontrolami in štirikrat v primerjavi z živalmi, ki so prejele nemodificirane fage. Še posebej obetavni so bili rezultati v kombinirani skupini: pri miših, ki so hkrati prejemale GET-IL-12 in fagno cepivo, smo pri 30 % živali dosegli popolni odziv, kar pomeni popolno regresijo tumorja. Pomembno je tudi, da zdravljenje ni povzročilo zaznavnih

neželenih učinkov, kar kaže na varnost uporabljenega pristopa.

Rezultati kažejo, da ima kombinacija gensko spremenjenih fagov in GET plazmida IL-12 velik terapevtski potencial. Z nadaljnjim razvojem fagnih cepiv se krepi možnost njihove klinične uporabe pri zdravljenju in preprečevanju melanoma, kot tudi drugih oblik raka.