

KOMBINIRANO ZDRAVLJENJE SOLIDNIH TUMORJEV Z INTRATUMORALNIM GENSKIM ELEKTROPRENOSOM PLAZMIDNE DNA Z ZAPISOM ZA PROTITELESA ANTI-CTLA4 IN OBSEVANJEM

Simona Kranjc Brezar^{1,2}, Boštjan Markelc^{1,3}, Tanja Jesenko^{1,2}, Tim Božič^{1,2}, Paul Declerck^{4,5}, Liesl Jacobs⁵, Maja Čemažar^{1,6}, Kevin Hollevoet^{4,5}, Gregor Serša^{1,3}

¹ *Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija*

² *Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana, Slovenija*

³ *Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena pot 5, 1000 Ljubljana, Slovenija*

⁴ *Laboratorij za terapevtska in diagnostična protitelesa, KU Leuven - Univerza v Leuvnu, Leuven, Belgija*

⁵ *Pharm.Abs - Center za protitelesa KU Leuven, KU Leuven - Univerza v Leuvnu, Belgija*

⁶ *Fakulteta za vede o zdravju, Univerza na Primorskem, Polje 42, 6130 Izola, Slovenija*

Elektronski naslov: skranjc@onko-i.si

Rekombinantna monoklonska protitelesa (mAbs) so eden izmed najbolj obetavnih imunskih pristopov zdravljenja raka. Po odobritvi protitelesa Ipilimumab anti-CTLA-4 (citotoksični T-limfocitni protein 4) za zdravljenje melanoma s strani FDA se je področje močno razširilo in razvita so bila mAb, usmerjena proti več drugim imunskim kontrolnim točkam (IKT). Zaviralci imunskih kontrolnih točk (ZIKT) se uporabljajo za zdravljenje različnih vrst raka. Vendar imajo mAbs več pomanjkljivosti, vključno z visokimi proizvodnimi stroški, pogostim visokim odmerjanjem, omejeno učinkovitostjo kot posamezna zdravila in sistemsko toksičnostjo po *i.v.* infuziji. Sistemsko toksičnost, povezano z imunskim sistemom, je mogoče zaobiti z intratumoralnim vbrizgavanjem mAb, ki sicer ohranjajo podobno učinkovitost, vendar še vedno zahtevajo pogosto odmerjanje. Po drugi strani pa plazmidna DNK (pDNA), ki kodira protitelesa IKT, predstavlja obetavno alternativo običajnim proteinom mAb. Za dostavo plazmidne DNA, ki nosi zapis za protitelesa IKT v celice in tkiva, vključno s tumorji, lahko uporabimo genski elektroprenos (GEP), ki temelji na elektroporaciji, s katero povečamo vnos v celice. ZIKT so še posebej učinkoviti pri zdravljenju tumorjev z že obstoječo protitumorsko imunostjo ("topli tumorji"), pri tumorjih brez protitumorske imunosti ("hladni tumorji") pa je njihova učinkovitost omejena. Z radioterapijo lahko sprožimo začetek prehoda iz hladnih v vroče tumorje in tako olajšamo delovanje ZIKT. Da bi preučili terapevtski potencial kombinacije intratumoralnega GEP ZIKT in radioterapije, smo izvedli GEP plazmidne DNA, ki kodira mišja protitelesa mAb proti CTLA-4 (p(aCTLA4)), in ga kombinirali z dvema režimoma obsevanja, enkratnim odmerkom 10 Gy in frakcioniranim odmerkom 3×5 Gy, pri mišjem raku debelega črevesa MC38. Najprej smo primerjali dva predhodno določena sklopa parametrov električnih pulzov GEP, in sicer enega za dostavo pDNA v tumorje (8 električnih pulzov, 600 V/cm, 5 ms, 1 Hz) ter drugega za elektrokemoterapijo ((EKT), 8 električnih pulzov, 1300 V/cm, 100 μ s, 1 Hz). Raven anti-CTLA4 mAb v plazmi po GEP p(aCTLA4) v

tumorje je bila podobna ne glede na uporabljene parametre električnih pulzov, vendar pa smo zaradi izrazitega protitumorskega delovanja kontrolne plazmidne DNA (pCtrl) po GEP v tumorje, v preostalih poskusih uporabili parametre sklopa EKT. Pri kombinaciji GEP p(aCTLA4) z obsevanjem je imela kombinacija s frakcioniranim odmerkom 3×5 Gy večji imunostimulacijski in izrazitejši protitumorski učinek kot kombinacija z enkratnim odmerkom obsevanja 10 Gy. Poleg tega je bila le kombinacija frakcioniranega obsevanja z GEP p(aCTLA-4) učinkovitejša od kombinacije s GEP pCtrl.

Potrdili smo, da je intratumorski GEP p(aCTLA4) lahko potencialna alternativa sistemski infuziji ZIKT in da je v kombinaciji z obsevanjem mogoče doseči protitumorski učinek. Prihodnje raziskave se bodo osredotočile na določitev optimalnega režima za "stimulativno" delovanje GEP p(aCTLA4) po obsevanju in tudi na možnost uporabe pDNA, ki bi nosila zapis za druge ZIKT, da bi dosegli boljši protitumorski učinek.

P9