

IMUNOTERAPIJA Z BAKTERIOFAGI, KI NA PLAŠČNIH PROTEINIH PREDSTAVLJAJO TUMORSKI PEPTID MAGE-A1 ZA ZDRAVLJENJE MALIGNEGA MELANOMA

Nuša Brišar^{1,2}, Katja Šuster³, Simona Kranjc Brezar^{2,4}, Andrej Cör^{2,3}

¹ Fakulteta za vede o zdravju, Univerza na Primorskem, Polje 42, 6310 Izola, Slovenija

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

³ Ortopedska bolnišnica Valdoltra, Jadranska cesta 31, 6280 Ankaran, Slovenija

⁴ Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: nusa.brisar@fvz.upr.si

Obetavni pristop za izboljšanje uspehov zdravljenja na področju imunoterapije raka predstavlja uvedba nanotehnologije in nanodelcev. Eni od takih nanodelcev so prokariotski virusi bakteriofagi, ki imajo velik potencial za genski inženiring in odpirajo nove možnosti pri razvoju vakcin. Z razvojem tehnologije predstavitve na bakteriofagu (angl. phage display) lahko bakteriofage uporabimo kot ciljne nanonosilce za predstavitev tumorskih antigenov imunskim celicam. Cilj raziskave je bil razvoj gensko spremenjenih nelitičnih filamentoznih bakteriofagov M13, ki na svoji površini izražajo tumorske peptide MAGE-A1161-169 v fuziji z velikimi pVIII ali malimi pIII plaščnimi proteini bakteriofaga kot potencialno vakcino za zdravljenje malignega melanoma. Za pripravo bakteriofagne vakcine smo uporabili tehnologijo predstavitve na bakteriofagu, in sicer kombinacijo fagemida in pomožnega filamentoznega bakteriofaga. Gostiteljsko bakterijo *Escherichia coli* z uspešno transformiranim rekombinantnim fagemidom pComb8-MAGE-A1 ali pComb3XSS-MAGE-A1 smo okužili s pomožnimi bakteriofagi VCSM13 in po prekonočni inkubaciji novonastale rekombinantne filamentozne bakteriofage očistili s kromatografskimi kolonami. C57BL/6 miši smo intraperitonealno vakcinirali z 1012 pfu (angl. plaque forming units) rekombinantnih fagov/miš trikrat v zaporednih dvotedenskih intervalih, kot kontrolo smo uporabljali divji tip bakteriofaga M13 in PBS. Sedem dni po vsaki dozi vakcine smo odvzeli serum in ga analizirali z metodo ELISA. Prisotnost proteinske fuzije izražene na rekombinantnih bakteriofagih smo potrdili s prenosom Western (protein pIII-MAGE-A1) in z LC-MS/MS (protein pVIII-MAGE-A1). Dokazali smo, da je intraperitonealna aplikacija bakteriofagne vakcine varna, pri poskusnih živalih ni bilo opaženih stranskih učinkov. Kljub različni gostoti prikaza tumorskega peptida v fuziji s pIII v primerjavi s pVIII sta oba aktivirala humoralno imunost, saj smo dokazali tako prisotnost proti-fagnih in proti-MAGE-A1 protiteles, katerih odziv se je povečeval od prve do tretje doze bakteriofagne vakcine. Dokazali smo, da se proti-MAGE-A1 protitelesa vežejo tudi na naravno izražene epitope na površini tumorskih celic B16F10 *in vitro*. Imunoterapija z gensko spremenjenimi filamentoznimi bakteriofagi, ki na svoji površini izražajo tumorski peptid MAGE-A1 je varna ter pri poskusnih živalih sproži humoralni imunski odziv. Menimo, da bakteriofagne vakcine predstavljajo obetaven način zdravljenja malignega melanoma samostojno ali v kombinaciji z drugimi že obstoječimi pristopi zdravljenja.