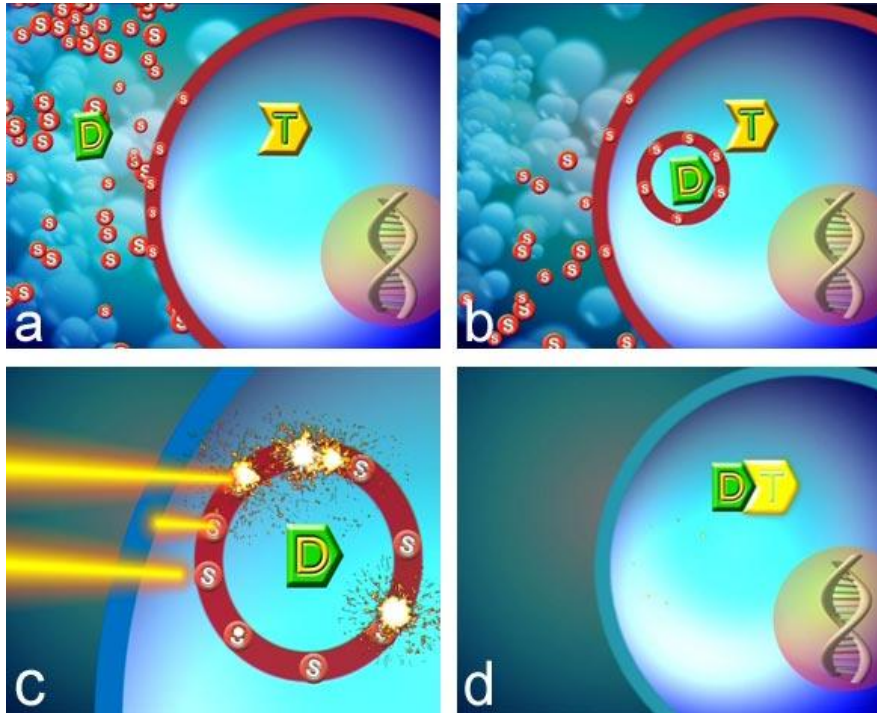


Fotokjemisk Internalisering (PCI); En norsk metode for legemiddellevering

Fra laboratoriet til klinikk



Prosjektoppgave

Det medisinske fakultet, Universitetet i Oslo

Våren 2014



Forfatter: Stud. med. Kaja Sandt Aksnes, kull V09

Veileder: Dr. Anette Weyergang

Summary

Title: *Photochemical Internalization (PCI); a Norwegian drug-delivery technology from bench to bedside.*

The purpose of this thesis was to study preclinical processes of the development of a new treatment for cancer, PCI, and contribute to make this treatment known to current medical doctors.

Literature on PCI was studied and forms the basis of the attached manuscript on PCI from bench to bedside. *In vitro* methods to conduct PCI was also acquired through the project. Hence, the results of this project are divided in two; (1) a manuscript which may be used as a draft for a future review article on PCI in a Norwegian Journal and (2) acquired methods in *in vitro* experimental cancer research with focus on PCI .

A number of publications from research-groups all over the world demonstrate PCI as an effective method, both *in vitro* and *in vivo*. PCI can be used to deliver already approved drugs as well as future substrates designed for maximal usage of the technology. PCI exert specificity towards tumor cells through a preferential retention of a photosensitizer in cancer cells in addition to site directed light exposure. The specificity of PCI can be further increased by the delivery of targeted therapeutics such as immunotoxins. PCI may overcome several of the major obstacles of our current cancer treatment such as generation of resistance and poor selectivity. The treatment can also be combined with conventional treatments such as radiotherapy and surgery.

In conclusion PCI is a promising, site-specific treatment of cancer. The first clinical study shows surprisingly positive results. Upcoming clinical studies will possibly contribute further to the establishment of this treatment for clinical use.

Sammendrag

Tittel: *Fotokjemisk internalisering (PCI); En norsk metode for legemiddellevering. Fra laboratoriet til klinikk.*

Hensikten med denne prosjektoppgaven var å studere prekliniske prosesser i utvikling av en ny behandlingsform for kreft, fotokjemisk internalisering (PCI), og samtidig bidra til tilgjengeliggjøring av denne nye behandlingsformen for dagens leger.

Relevant litteratur ble gjennomgått og danner grunnlaget for oppgavens teoridel der utviklingen av PCI følges fra laboratoriet til klinikk. Som en del av oppgaven ble *in vitro* metoder tilegnet for å kunne gjennomføre PCI i laboratoriet. Resultatet av dette prosjektet er derfor todelt; (1) en teoridel som potensielt kan brukes som et utkast til en senere oversiktsartikkel om PCI i et norsk tidsskrift og (2) tilegnede metoder i *in vitro* eksperimentell kreftforskning med fokus på PCI.

En rekke publikasjoner fra forskningsgrupper over hele verden viser god effekt av PCI som behandlingsmetode, både *in vitro* og *in vivo*. PCI kan brukes til å levere allerede godkjente legemidler så vel som fremtidige substrater spesielt designet for å utnytte metoden maksimalt. Metoden innehar stor grad av selektivitet overfor tumorvev både ved at fotosensitizeren akkumuleres i tumorcellene og at belysning kun skjer i områdene man ønsker behandling. Spesifisiteten kan økes ytterligere ved levering av målrettede substrater som immunotoksiner. Store utfordringer ved dagens kreftbehandling, som resistensutvikling og lite selektivitet, kan potensielt unngås med PCI. Metoden kan også kombineres med konvensjonelle behandlinger som ioniserende stråling og kirurgi.

Det kan konkluderes med at PCI er en lovende, selektiv, ny behandlingsform. Det første kliniske studiet viste overraskende gode resultater. Videre kliniske studier vil kunne bidra til å etablere PCI som godkjent behandlingsform.

Innholdsfortegnelse

1 INNLEDNING	7
1.1 Bakgrunn og hensikt.....	7
1.2 Presentasjon av problemstilling.....	7
1.3 Avgrensning og presisering av problemstilling, gjennomføring	7
1.4 Begrepsavklaring.....	8
1.4.1 PCI.....	8
1.4.2 PDT	8
1.4.3 FOTOSENSITISER.....	8
1.4.4 Endocytose	8
1.4.5 Bleomycin	8
1.4.6 Gelonin	9
2 METODE	10
2.1 Litteratursøk	10
2.2 Samtale med PCI BioTech	10
2.3 Praktisk oppgave; PCI av gelonin i colon carcinom-celler <i>in vitro</i>	10
2.3.1 Cellelinje og dyrkningsmedium	10
2.3.2 Prosedyre for splitting av celler.....	10
2.3.3 PCI av gelonin	11
3 RESULTAT.....	13
3.1 Resultat av litteratursøk.....	13
3.1.1 Innledning.....	13
3.1.2 Bakgrunn og oppfinnelse av PCI.....	13
3.1.3 Den fotokjemiske reaksjonen ved PCI er avhengig av PS, lys og oksygen.....	13
3.1.4 Hvordan virker PCI?.....	15
3.1.5 PCI er selektivt	16
3.1.6 PCI-indusert celledød	16
3.1.7 Hvilke legemidler kan leveres med PCI?	16
3.1.8 Ulike prosedyrer for utførelse av PCI.....	17
3.1.9 PCI <i>in vitro</i> og <i>in vivo</i>	18
3.1.10 PCI i klinikk	18
3.1.11 Fremtidig PCI (målrettede toksiner).....	21
3.1.12 Muligheter og begrensninger ved PCI.....	21
3.2 Eget forsøk med PCI <i>in vitro</i>	24

3.2.1 Presentasjon av data	24
3.2.2 Diskusjon av data	24
4 OPPSUMMERING OG KONKLUSJON	26
Referanser.....	28

1 INNLEDNING

1.1 Bakgrunn og hensikt

De fleste leger arbeider innenfor klinisk medisin og har begrenset kunnskap om preklinisk arbeid for utvikling av nye behandlingsmetoder. Denne prosjektoppgaven hadde som målsetning å studere prekliniske prosesser i utvikling av en ny behandlingsform for kreft, fotokjemisk internalisering (PCI), og samtidig tilgjengeliggjøre denne nye behandlingsformen for dagens leger. PCI er nå under utprøving i kliniske studier, noe som gjorde det mulig å følge utviklingen av PCI fra laboratoriet til klinikk.

Kreft er en av vår tids store helseutfordringer med en stadig voksende pasientgruppe i Norge. Mortaliteten for flere kreftformer er fremdeles høy og behandlingsbegrensende bivirkninger er ofte et problem for kurasjon. Det er derfor et behov for mer effektive behandlingsformer.

PCI er en ny og lovende behandlingsform utviklet i Norge. PCI er etablert ved Professor Kristian Bergs forskningsgruppe ved Radiumhospitalet, OUS. Den praktiske delen av denne oppgaven ble gjennomført i Professor Bergs lab (PCI på celler i kultur samt observasjon av arbeid utført på mus). Et litteraturstudium av PCI ble i tillegg gjennomført som basis for en oversiktsartikkel om PCI. Resultatene av denne prosjektoppgaven er derfor todelt og består både av en teoridel basert på en litteraturgjennomgang og erverving av in vitro metoder benyttet i eksperimentell kreftforskning for gjennomføring av egne studier av PCI på celler i kultur.

1.2 Presentasjon av problemstilling

Fotokjemisk Internalisering (PCI); En norsk metode for legemiddellevering. Fra laboratoriet til klinikk.

1.3 Avgrensning og presisering av problemstilling, gjennomføring

Denne oppgaven ble skrevet som en obligatorisk prosjektoppgave ved medisinstudiet, Universitetet i Oslo. 12 uker var avsatt fordelt på studiets 7., 8. og 11. semester. Det forelå føringer for godkjente fagområder og oppgavens omfang. Dette satte begrensninger for hva som var gjennomførbart både når det gjaldt lab-arbeid og fordypning i litteratur.

I teoridelen ble det valgt å fokusere på PCI utført med bleomycin. Som del av fordypningen i behandlingsformen og de prekliniske prosessene ble det innhentet publiserte artikler på dette området. Denne litteraturgjennomgangen danner grunnlaget for oversiktsartikkelen, som følger utviklingen av metoden fra grunnlegging til i dag.

Ut i fra målsetningen med oppgaven, å følge behandlingsformen fra laboratoriet til klinikk, var det et ønskelig delmål å tilegne seg metoder innenfor eksperimentell kreftforskning for å

kunne gjennomføre PCI *in vitro*. På denne måten ble de prekliniske prosessene tilegnet ved direkte «hands on»-erfaring, i tillegg til fordypning i fagartikler. Opplæring av praktisk lab-arbeid ble gjennomført av Dr Anette Weyergang, postdoktor i Kristian Bergs forskningsgruppe. Laboratorie-arbeidet ble gjennomført ved Radiumhospitalet, OUS. Data fra arbeidet er inkludert og vil bli diskutert i oppgaven.

Det ble også gjennomført en samtale med forskningsdiriktør i PCI Biotech, Anders Høgset. Dette for å få et innblikk i den kliniske forskningen på PCI som foregår, men som ennå ikke er publisert.

1.4 Begrepsavklaring

1.4.1 PCI

Fotokjemisk internalisering (PCI) er en metode der man utnytter den fotokjemiske reaksjonen mellom lys og en fotosensitiser som lokaliseres til en endocytotisk vesikkel, som leveringssystem for et terapeutisk agens som taes opp via endocytose (5).

1.4.2 PDT

Fotodynamisk terapi (PDT) er en metode der man utnytter den fotokjemiske reaksjonen mellom lys og en fotosensitiser som vil danne ROS, et svært cytotoxisk molekyl. Metoden er i dag en klinisk godkjent behandlingsform for en rekke hudlesjoner og cancerformer (6).

1.4.3 Fotosensitiser

En fotosensitiser (PS) er en kjemisk forbindelse som ved absorpsjon av lys vil gå over til en eksitert tilstand. Fotosensitiseren kan videre overføre sin absorberte energi til andre molekyler. På denne måten dannes reaktive oksygenforbindelser (ROS) som igjen gir cellulær skade (4, 7).

Videre i oppgaven forkortes fotosensitiser PS.

1.4.4 Endocytose

Endocytose er en spesialisert funksjon utført av cellemembranen. Opptaksmekanismen for makromolekyler og andre substanser som pga ladning (hydrofilitet, basiske) ikke kan taes opp ved hjelp av andre mekanismer. Substansen som befinner seg på cellens utside bindes til en reseptor på cellemembranen, før denne invagineres og avsnøres som en endocytotisk vesikkel. Den endocyterte substansen transporteres raskt til et tidlig endosom før den blir enzymatisk brutt ned i sene endosomer eller lysosomer (8-10).

1.4.5 Bleomycin

Bleomycin er et glycopeptid antibiotikum med molekylvekt på ca ~1,4 kDa, først isolert fra *Streptomyces verticillus* av Umezawa m fl i 1966 (11). Bleomycin har i flere tiår vært en

viktig del av kjemoterapibehandlingen ved flere ulike kreftformer. Bleomycins potente antitumor-egenskaper skyldes i all hovedsak at stoffet katalyserer dobbeltrådbrudd i DNA (11).

1.4.6 Gelonin

Gelonin er en type I ribosome-inactivating-protein (RIP) med molekylvekt på ca 30 kDa som finnes i frøene på planten *Gelonium Multiflorum* (12). Opptaksmekanismen i cellen for gelonin antas å være via endocytose (13). Gelonin mangler et translokasjonsdomene for å frigjøres fra endosomer til cytosol og har derfor relativt lav cytotoxicitet (14).

2 METODE

2.1 Litteratursøk

Litteratursøk ble gjennomført i PubMed i perioden juni 2012 – januar 2014. Søkeordene som ble benyttet var photodynamic therapy, photochemical internalisation og bleomycin, alene og i kombinasjon. Resultatet av søket ble gjennom hele prosjektiden supplert med forskningsartikler overlevert direkte fra veileder Dr Anette Weyergang i forskningsgruppen ved Radiumhospitalet. Det ble også gjort søk på Folkehelseinstituttets nettsider (15) september 2013 for å innhente fakta om forekomst og dødelighet av kreft.

2.2 Samtale med PCI BioTech

Det ble gjennomført en samtale med forskningsdirektør, Anders Høgset, på Radiumhospitalet i august 2012 (16). Dette ble gjort for å få informasjon om klinisk status innenfor forskning på PCI. Det foreligger per i dag ingen publikasjoner på klinisk PCI.

2.3 Praktisk oppgave; PCI av gelonin i colon carcinom-celler *in vitro*

2.3.1 Cellelinje og dyrkningsmedium

Alt arbeid med celler ble utført aseptisk i klasse I LAF-benk. Cellelinjen som ble brukt var CT26 (colon carcinom-celler fra mus). Cellene var adherente og ble dyrket i monolag i 75cm² flasker med filterkork (Nunc, Danmark) med RPMI (Sigma-Aldrich, St Louis MO) supplert med 10% føtalt kalveserum, 100U/ml penicillin, 0.23% D(-+)-Glucose og 1nM natrium pyruvat som vekstmedium. Cellene ble dyrket til ca 80% konfluens og splittet 2-3 ganger per uke.

2.3.2 Prosedyre for splitting av celler

Dyrkningsmedium, trypsin (Sigma-Aldrich) og Phosphate Buffered Saline (PBS) ble forvarmet til 37⁰C.

Gammelt medium ble sugd av celleflasken og 1ml PBS ble tilsatt langs monolaget for å vaske cellene. Flasken ble vippet slik at hele monolaget kom i kontakt med PBS-løsningen, som deretter ble sugd av.

1 ml trypsin ble så tilsatt monolaget. Trypsin er en protease som spalter celle-matrix-bindinger. Trypsinløsningen inneholdt også EDTA som binder Ca²⁺-ionene og dermed hemmer Ca²⁺-avhengige celle-celle-bindende proteiner, som f. eks. E-cadherin. Trypsinløsningen bidro derfor til å løsne cellene både fra underlag og hverandre. Celleflasken ble inkubert 3-5min ved 37⁰C, før den ble utsatt for et raskt støt mot håndflaten. At cellene med dette ble løst fra underlaget ble kontrollert med et mikroskop.

Ca 9 ml vekstmedium ble tilsatt celleflasken for å nøytralisere trypsin løsningen. 18 ml vekstmedium ble tilsatt i en ny 75cm²-flaske og 2 ml av celsuspensjonen fra den gamle flasken ble overført til denne nye flasken. Den nye flasken inneholdt da en ny passasje med celler. Dyrkningsflaskene ble merket med navn på cellelinje, navn på ansvarlig person, dato og pasasje-nummer.

2.3.3 PCI av gelonin

Dag 1

Utsåing av celler

Celler ble sådd ut i 96-brønners cellebrett, med 4000 celler per brønn. Cellene ble først løst med trypsin som beskrevet overfor og tilsatt 9 ml vekstmedium for å nøytralisere trypsinet. Suspensjonen ble så overført til et tellekammer. Cellene i tre diagonale ruter ble talt (hver inneholder 0.1µl), og gjennomsnittet multiplisert med 10 000 for å bestemme konsentrasjonen av celler i suspensjonen (celler/ml) Det ble så beregnet hvor mye av denne suspensjonen som skulle benyttes i utsåingsløsningen for å få 4000 celler per brønn når hver brønn skal ha 100µl medium. Cellene ble så sådd ut (4000 celler i 100µl medium per brønn). Cellene ble inkubert i seks timer ved 37⁰C for å få dem festet til brønnene.

Inkubering med fotosensitiser og gelonin

Siden PCI er en kombinasjonsbehandling av PDT og et legemiddel (her gelonin) ble effekten av både PDT, gelonin og PCI av gelonin undersøkt. Fotosensitiseren som ble benyttet var TPCS_{2a} og inkuberings-konsentrasjonen av denne var bestemt til 0,4 µg/ml. Gelonin ble benyttet i en inkuberingskonsentrasjon på 1µg/ml. Inkubasjonsløsningene ble klargjort før vekstmediet i brønnene ble sugd av og erstattet med inkubasjonsløsningene; 0.4µg/ml TPCS_{2a} for PDT prøver, 0,4µg/ml TPCS_{2a} og 1µg/ml gelonin for PCI prøver, 1µg/ml gelonin for gelonin prøver og kun vekstmedium for ubehandlede kontroller. Alle brønnene ble tilsatt 0,1ml av sine respektive løsninger. Cellene ble så inkubert 18 timer over natt ved 37⁰C.

Dag 2

Fjerning av fotosensitiser og chasing av celler

For å sørge for at majoriteten av fotosensitiseren er lokalisert til endosomer og lysosomer ved belysning og ikke sitter i cellens plasmamembran ble cellene før belysning vasket to ganger med vekstmedium og tilsatt nytt vekstmedium før de ble inkubert 4 timer ved 37⁰C. Denne prosedyren chaser fotosensitiseren fra plasmamembranen og inn i de endocytiske vesiklene.

Belysning av celler

Cellene ble belyst med en lampe, LumiSource (PCI Biotech, Oslo, Norge) som består av 4 lystoffrør (Osram L18/67 Blue) og gir blått lys med $\lambda_{maks} = 435 \text{ nm}$. Effekten er 9.6 mW/cm². Brønnene ble utsatt for økende belysningstid, fra 0s til 75s, med intervaller på 15s. Solbriller ble benyttet under belysingen. Etter belysning ble cellene inkubert 48 timer ved 37⁰C før effekten av behandlingen ble evaluert med MTT (se under).

Dag 4

Måling av viabilitet

Redusert viabilitet etter PDT- og PCI-behandlingene ble bestemt ved hjelp av (3-[4,5-dimetylthiazol-2- γ]-2,5 defenyltetrazolium (MTT). Dette er en kvantitativ kolorimetrisk metode for måling av viabilitet, som igjen korreleres til overlevelse. Metoden er basert på en enzymatisk spaltning av det gule tetrazoliumsaltet MTT ved hjelp av enzymer i cellenes mitokondrier (succinate-dehydrogenase). Spaltingen danner vannuløselige, mørk blå/lilla formazan-krystaller. Cellene må derfor være metabolsk aktive for at spaltingen skal finne sted.

Vekstmediet ble sugd av alle cellebrønnene og tilsatt MTT- 0,25mg/ml i vekstmedium. Cellebrettet ble satt til inkubasjon i fire timer ved 37⁰C før mediet ble sugd av og krystallene løst i 100 μ l DMSO (Sigma Aldrich) per brønn. Absorbansen av den blå/lilla fargen ble deretter målt med et spektrofotometer. Absorbansen er her en funksjon av konsentrasjon av blå farge, som igjen korrelerer direkte med antall metabolsk aktive celler i prøven. Absorbansen ble målt ved 570 nm ved hjelp av en multibrønn spektrofotometer-scanner (PowerWave XS2 Microplate Spectrophotometer, BioTek, Vermont, USA). Dataprogrammet som ble benyttet var Gen 51.08 (BioTek). Viabiliteten i prøvene ble kalkulert i forhold til ubehandlede kontrollceller. Tomme brønner, inkubert med MTT medium og siden med DMSO ble benyttet for å trekke fra bakgrunn i målingene. Dataene ble videre behandlet i Excel og fremstilt grafisk.

3 RESULTAT

3.1 Resultat av litteratursøk

3.1.1 Innledning

Kreftdødeligheten har endret seg lite siden 1950-tallet korrigert for økt levealder (15). Den er stadig høy; ca en av fire nordmenn dør av kreft uavhengig av kjønn. Over samme tidsperiode har kreftforekomsten økt. Kirurgi, strålebehandling og kjemoterapi er i dag de mest brukte behandlingsformene for kreft, men disse har ofte store begrensninger (4). De største utfordringene ved dagens kreftbehandling er skade av friskt vev, bivirkninger og toleranseutvikling (17). Repeterte behandlinger med kjemoterapi kan føre til resistens og ervervet multidrug resistance (MDR), en av kjemoterapiens største hindringer for kurasjon (5, 17). Det er internasjonalt et stort forskningsmiljø med mål om et bedre behandlingstilbud.

Forskning på fotokjemi som behandlingsmetode for kreft ble kjent i begynnelsen av det 20. århundre (4). Fotodynamisk terapi (PDT) er i dag en klinisk godkjent behandlingsform basert på en fotokjemisk reaksjon. PDT anvendes i dag verden over til behandling av premaligne og maligne hudlesjoner så vel som andre typer cancer (7, 17-19).

3.1.2 Bakgrunn og oppfinnelse av PCI

Det har de siste årene vært fremstilt en rekke nye substrater med den hensikt å gjøre kreftbehandlingen mer spesifikk. Mange av disse er hydrofile makromolekyler, som f eks gener, RNA, og proteiner med et intracellulært mål (cellekjernen, ribosomene, mikrotubuli). Hydrofile makromolekyler er impermeable for cellemembranen og taes opp ved endocytose. Deres effekt er ofte sterkt begrenset av at de transporteres i endocytotiske vesikler og degraderes i lysosomer før det terapeutiske agens har utført sin biologiske virkning (5, 7, 10, 17). På cellenivå er barrieren som utgjøres av den endocytotiske vesikkelen, trolig det største hinder for cytosolisk translokasjon av hydrofile makromolekylære terapeutiske agens (7). Degradering i lysosomer gjør at enkelte legemidler må administreres i store doser for å ha effekt, noe som fører til bivirkninger og toleranseutvikling (17). Det er derfor et behov for en mer effektiv endosomal frigjøring av av slike medikamenter (7, 17).

Fotokjemisk internalisering (PCI) er en metode utviklet for intracellulær levering av legemidler i kreftbehandling (10, 17). Metoden ble grunnlagt i 1995 på Det Norske Radiumhospitalet av Kristian Berg som oppdaget at endocytiske vesikler kunne ødelegges med fotokjemi (bruk av en fotosensitizer (PS) og synlig lys) (7, 17, 20, 21). Fotokjemisk induert frigjøring av substanser til cytosol kunne detekteres i et fotokjemisk doseområde som ikke induerte celledød og de frigjorte substansene så ikke ut til å ta skade av fotokjemien (7).

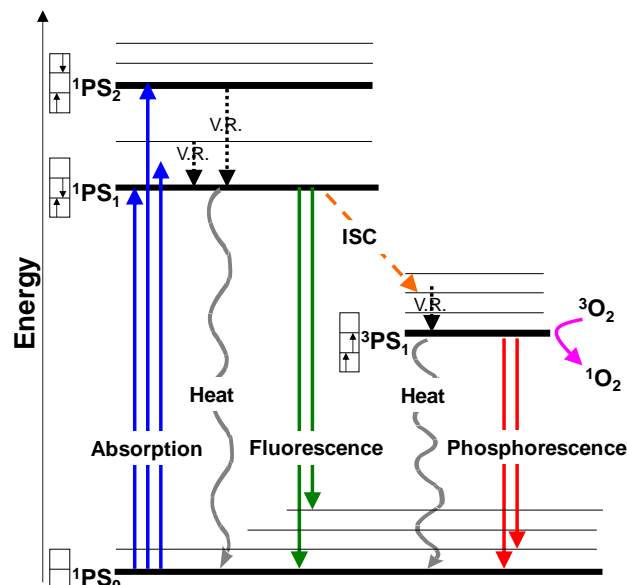
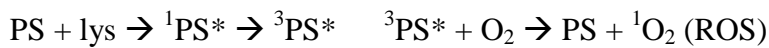
3.1.3 Den fotokjemiske reaksjonen ved PCI er avhengig av PS, lys og oksygen

PCI baseres på den fotokjemiske reaksjonen som finner sted når en PS utsettes for lys i nærvær av oksygen (7, 10, 17). En PS er en kjemisk forbindelse som ved absorpsjon av lys med riktig bølgelengde går over til en eksitert singlett tilstand ($^1PS^*$) (4, 7, 10, 18). $^1PS^*$ er i

en ustabil energitilstand og omdannes derfor raskt til en mer stabil eksitert triplet tilstand ($^3\text{PS}^*$). $^3\text{PS}^*$ kan videre overføre den absorberte energien til andre molekyler. I nærvær av oksygen genereres det reaktive oksygenforbindelser som igjen kan drepe cellen (4, 7, 10, 18).

Den viktigste reaksjonen for klinisk tilgjengelige fotosensitiserere i dag er antatt å være reaksjonen mellom $^3\text{PS}^*$ og molekylært oksygen (O_2) (7). Denne reaksjonen fører til dannelse av en singlet-form av oksygenet: $^1\text{O}_2$ (4, 7). Dette er en meget reaktiv og cytotoxisk form for oksygen som initierer en kaskade av reaksjoner som igjen danner flere andre reaktive oksygenforbindelser (ROS) (4, 7, 17). $^3\text{PS}^*$ konverteres i reaksjonen med oksygen tilbake til ikke-eksitert PS i grunntilstand, og er igjen klar til flere sykluser med eksitasjon og dannelse av ny ROS (7).

Den fotokjemiske reaksjonen kan skjematisert fremstilles slik:



Figur 1: Jablonski diagram. Fotosensitiser (PS) i grunntilstand ($^1\text{PS}_0$) absorberer energi fra lys og eksiteres til $^1\text{PS}_1$. PS i singlett tilstand omdannes til en eksitert triplet tilstand ($^3\text{PS}_1$), som videre kan overføre den absorberte energien til andre molekyler. Når $^3\text{PS}_1$ reagerer med molekylært oksygen ($^3\text{O}_2$) dannes $^1\text{O}_2$, en type reaktiv oksygenforbindelse (ROS) (4).

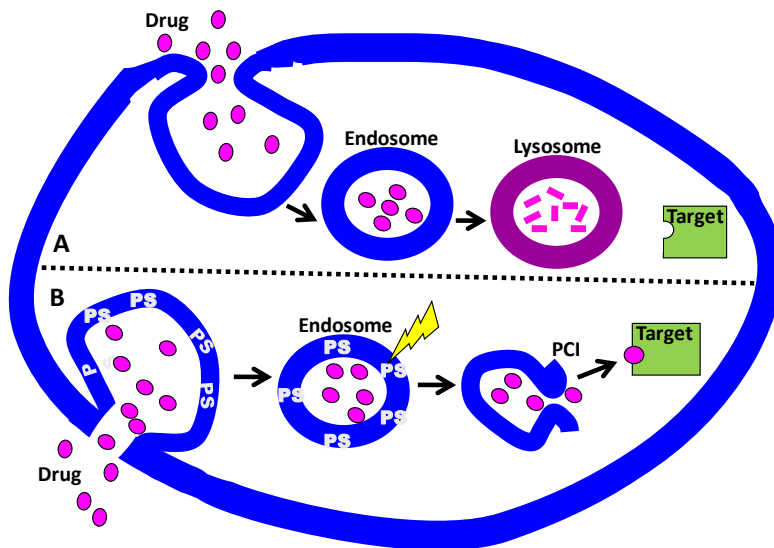
Fotokjemisk induerte ROS skader flere biomolekyler ved oksidering og både umettede fettsyrer, aromatiske aminosyrer, kolesterol og guanin er vist å oksideres av slik behandling (4, 7). Oksidering av slike biomolekyler fører til ødeleggelse av cellekomponentene som biomolekylene er en del av og både mitokondrier, lysosomer, plasmamembranen, ER og Golgi er vist å ødelegges etter fotokjemisk behandling (4, 6, 7). Dette kan igjen indusere cytotoxisitet via nekrose, apoptose og/eller autofagi (4, 6, 17). Ettersom $^1\text{O}_2$ har meget kort levetid, $<0,1\text{ms}$, og kun kan virke over korte avstander, 10-20nm, er den intracellulære

effekten av fotokjemien i stor grad bestemt av fotosensitiserens intracellulære lokalisering (6, 7, 17).

Ved PCI utnyttes PS som lokaliseres til endosomer og lysosomer (4, 7, 17). PCI-fotosensitiserere er amfifile og binder seg først til cellens plasmamembran. PSen taes deretter opp i cellene via endocytose og akkumuleres i membranene til endosomer og lysosomer (7, 10). Det finnes i dag en PCI-fotosensitiserer godkjent for klinisk utprøving av PCI-metoden; TPCS_{2a} (meso-tetraphenylchlorine med 2 sulfonatgrupper i cis-posisjon) (22).

3.1.4 Hvordan virker PCI?

PCI er et cytosolisk leveringssystem for legemidler fanget i endosomer og lysosomer (1, 4, 5, 7, 17). Ved PCI administreres både en PS og et medikament/terapeutisk agens (5, 7, 17). Det er viktig at medikamentet i stor grad er lokalisert til vesikkelens lumen og at fotosensitiseren lokaliseres til vesikkelens membran, dette oppnåes ved å inkludere et tidsintervall mellom administrering av komponentene og lyseksponeringen (17). Eksponering av lys ved riktig bølgelengde aktiverer PS som da gjennomgår overnevnte reaksjoner som igjen genererer ROS. Dette skader membranen i den endocytotiske vesikkelen og frigjør dermed det endocyterte medikamentet til cytosol der det kan utføre sin biologiske effekt (5, 7, 17). De eksakte mekanismene som ligger bak rupturen av den endocytotiske membranen er foreløpig ikke kjent (7).



Figur 2: Virkningsmekanisme for PCI.

A. Et legemiddel taes opp i cellen via endocytose og degraderes i lysosomet før det når sitt intracellulære mål. B. Levering av legemiddel med PCI. Legemiddelet endocytteres med PS lokalisert til vesikkelmembranen. Belysning fører til ruptur av endosomet med frigjøring av legemiddelet til cytosol der det når sitt intracellulære mål (3).

PCI består av to ulike modaliteter som virker synergistisk på hverandre. En fotokjemisk reaksjon som gir ruptur av endocytotiske vesikler og et medikament som frigjøres til cytosol slik at det kan nå sitt intracellulær mål (17).

3.1.5 PCI er selektivt

En av PCI's fordeler er den store graden av selektivitet ovenfor tumorvev. Dette skyldes hovedsaklig to faktorer: i) PS akkumulere 2-3 ganger mer i tumorvev sammenlignet med normalt vev. ii) Aktivering av PS og videre cytosolisk frigjøring av et legemiddel skjer kun i områder som belyses (6, 7).

De bakenforliggende mekanismene for at PS akkumuleres i tumorvev er ikke fullstendig kjent (4, 6). Flere egenskaper ved tumorvevet tenkes å bidra til en slik selektiv distribusjon. Blant disse er økt antall LDL-reseptorer som lett binder PS (4, 6), økt tilstedeværelse av makrofager som i stor grad fagocytterer PS (6), senket pH som vil gjøre PS mer lipofilt og dermed bidra til enklere diffusjon inn i tumorcellene (4, 6), lekk vaskulatur (6), nedsatt lymfatisk drenasje (6), stor mengde nysyntetisert kollagen som binder PS samt økt mengde lipider som lettere binder lipofile komponenter som PS (6).

3.1.6 PCI-indusert celledød

PCI stimulerer til celledød både gjennom legemiddelet som leveres og gjennom den fotokjemiske reaksjonen (17, 19).

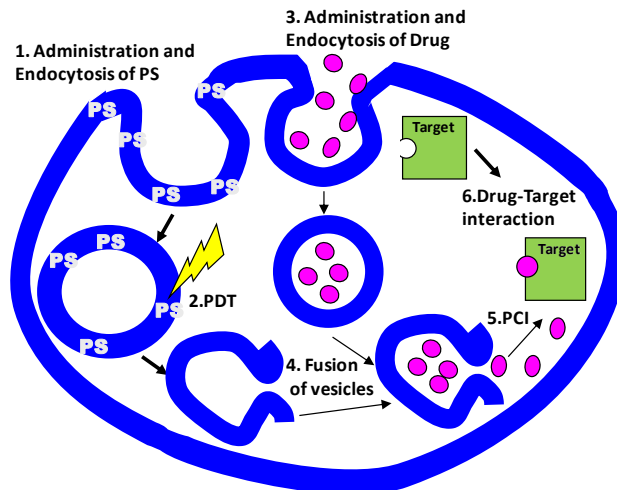
Bruk av PS og lys er vist å være effektiv i behandling av enkelte former for kreft, kjent som behandlingsformen fotodynamisk terapi, PDT (6, 17, 18). Reaksjonen mellom PS og lys induserer celledød direkte gjennom nekrose, apoptose eller autofagi (4, 6, 17). Reaksjonen mellom PS og lys kan også indusere celledød indirekte ved ødeleggelse av tumorvaskulatur (4, 6, 17) og aktivering av immunsystemet mot den behandlede tumor (4, 6, 17, 23, 24).

3.1.7 Hvilke legemidler kan leveres med PCI?

Flere egenskaper kjennetegner potensielle medikamenter for PCI levering. Legemidlene må i liten grad kunne diffundere fritt over plasmamembranen, men taes opp i cellen via endocytose og akkumulere i endocytiske vesikler (endosomer og lysosomer) (4, 19). Egnete legemidler for levering med PCI må i tillegg ha en intracellulær virkningsmekanisme og må også kunne diffundere fra blodkar inn i tumorvevet (4). PCI har *in vivo* og *in vitro* vist seg som et effektivt leveringssystem for proteiner (25-27), DNA (28-30), peptider (31), siRNA (32), PNA (33, 34) og enkelte cytostatika (1, 35, 36). Klinisk evaluering av PCI foregår på bleomycin (37-39), et hydrofilt makromolekylært cytostatikum som akkumulerer i endocytiske vesikler (11).

3.1.8 Ulike prosedyrer for utførelse av PCI

PCI er i utgangspunktet antatt å fungere best når fotosensitizeren og legemiddelet er lokalisert til den endocytiske vesikkelen når den eksponeres for lys (19). Standard protokoll er derfor at både PS og legemiddelet administreres før lyseksposering. Dette har blitt kalt «light after procedure» (4, 7, 17). Senere studier har imidlertid vist at PCI kan være like effektivt når legemiddelet gis rett etter den fotokjemiske reaksjonen (17, 19). Dette kalles «light first procedure» (4, 7, 17). En mulig forklaring av ”light first” effekten er at nydannede endocytiske vesikler som inneholder legemiddelet vil fusjonere med de permeable vesiklene som har vært utsatt for fotokjemi. Dermed får man utslipp av legemiddel til cytosol fra de ødelagte vesiklene (4, 7, 17, 19). Klinisk administreres bleomycin rett før lyseksposering. Behandlingsresponsen kan derfor antas å være en kombinasjon av ”light first” og ”light after” effekter (1).

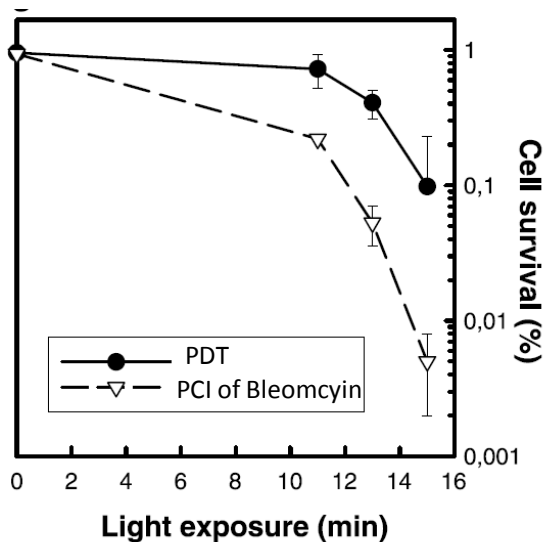


Figur 3: Antatte virkningsmekanismer bak «light first» effekten. PS administreres først og lokaliseres til den endocytiske vesikkelmembranen. Belysning gir permeable vesikler. Deretter administreres et legemiddel som endocytteres. De nydannede vesiklene som inneholder legemiddelet vil fusjonere med de permeable vesiklene som har vært utsatt for fotokjemi, slik at man får utslipp av legemiddelet til cytosol der det kan nå sitt intracellulære mål (3).

3.1.9 PCI *in vitro* og *in vivo*

PCI *in vitro*

PCI er vist å være svært effektivt av en rekke forskningsgrupper både i Europa, USA og Asia (17). PCI *in vitro* har vært forsøkt med over 100 ulike cellelinjer og med en rekke molekyler som plante-protein toksiner, immunotoksiner, cytostatika som bleomycin (Fig 4) og doxorubicin, peptider, ribozym- og oligodeoxynukleotider, og gener i kombinasjon med ulike vektorsystemer (4, 17, 19). Resultatene viser at PCI øker frigjøring av legemidlene fra endocytotiske vesikler og dermed øker den terapeutiske effekten (7, 17, 40).



Figur 4: PCI av Bleomycin *in vitro*. PCI av 0,14 IU/ml bleomycin i WiDr celler (1).

PCI *in vivo*

PCI *in vivo* er også vist av forskningsgrupper over hele verden i minst 15 forskjellige dyremodeller (xenografter og allografter) av ulike cancer opprinnelse (17, 41). PCI er *in vivo* vist å øke den terapeutiske effekten av både proteiner, DNA, siRNA og bleomycin og er i tillegg vist å kunne aktivere vaksiner (1, 4, 17, 42-44). Selbo et al. viste i 2001 67% complete response i atymisk mus med WiDr adenocarcinom xenografter (subcutant voksende tumor) (7). PCI av bleomycin er vist å gi opp til 90% kurasjon i atymiske mus med CT26 colon carcinom (allograft) (subcutant voksende tumor) (45). Behandlingen er vist å ha høy tolererbarhet. Inflammasjon i behandlet område observeres dagen etter belysning, men dette går vanligvis tilbake i løpet av 5 dager (7). Ingen effekter er observert utenfor det behandlede området og metoden er vist å gi god vevstilheling (7, 17).

3.1.10 PCI i klinikk

Klinisk PCI har hittil kun vært undersøkt i kombinasjon med bleomycin. Bleomycin er et ~1,4 kDa glycopeptid antibiotikum som i flere tiår har vært en viktig del av kjemoterapibehandlingen ved flere ulike kreftformer (11). Studier tyder på at bleomycin bindes til en proteinreseptor på celledmembranen, for så å taes opp i cellen via reseptormediert endocytose (11, 46). Bleomycin har sitt terapeutiske mål i cellens nukleus, hvor det binder seg

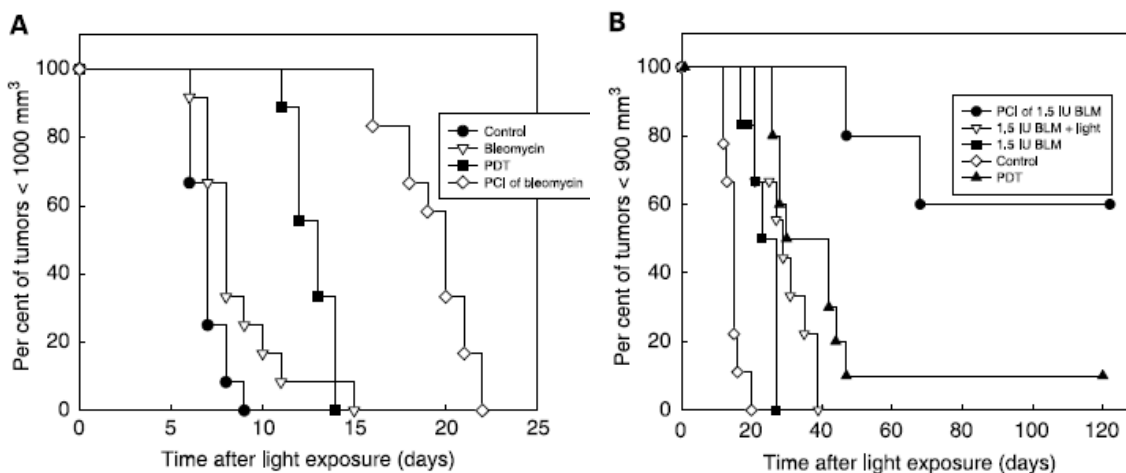
til DNA og katalyserer dobbelttrådbrudd av DNA (11). Sensitiviteten hos tumorceller overfor bleomycin er generelt høyst variabel grunnet manglende evne til fri diffusjon gjennom cellemembranen (1). Dette er et avgjørende trinn for bleomycins manglende effektivitet som forsøkes kompensert ved å øke dosering (1, 17).

Klinisk bruk av bleomycin er, til tross for lang tids anvendelse, begrenset på grunn av alvorlige bivirkninger. Dette er i hovedsak forårsaket av interstitiell pneumonitt, med en rapportert forekomst på 46%, med påfølgende lungefibrose hos 3% (11).

Interstitiell pneumonitt ved behandling med bleomycin er doseavhengig (11). Følgelig ligger det et stort potensiale i dosereduksjon for å unngå denne bivirkningen (5). Det er her PCI kan tenkes å bidra ved å effektivisere frigjøringen av bleomycin til cytosol. Så lite som rundt 500 bleomycin-molekyler i cytoplasma har blitt estimert til å være en cytotoxisk dose (1). Bleomycin har egenskapene til å utøve meget høy effektivitet og spesifisitet mot kreft i kombinasjon med PCI (1, 5, 17).

Forskning på PCI med bleomycin viser lovende resultater

PCI av bleomycin *in vivo* er vist svært effektivt i en rekke forskjellige ortotopiske og subcutane tumormodeller (1, 17, 45) (Fig 5). Ved histologisk analyse av musenes lungevev 6 uker etter behandling har man ikke sett tegn til lungefibrose (1). PCI av bleomycin er også vist svært effektiv i kombinasjon med ioniserende stråling såvel som kirurgi (47, 48).



Figur 5: PCI av bleomycin in vivo. PCI av 1,5 IU bleomycin i A) CT26- og B) TAX-1-tumores (1).

I de fleste tilfeller der man ikke oppnådde tumorfrihet *in vivo*, var det i periferien av det behandlede området at man så ny oppvekst av tumor (1). Dette kan skyldes at tumorceller overlevde behandlingen ved å unnsnippe belysning ytterst i kanten like ved tildekkingen (1). Nyveksten er imidlertid mindre enn den man ser ved PDT og lokalisert i dypere vevslag (45). Om mulig kan man bedre behandlingsresultatet eller oppnå full kurering med høyere doser PDT og/eller bleomycin (45). Kombinasjon med kirurgi og intra-operativ belysning, ser også ut til å gi bedre behandlingsresultater i dette området (7, 48).

Studier av PCI på mennesker/kliniske studier

Den første kliniske studien av PCI på mennesker ble utført ved University College Hospital i London og ble avsluttet i 2011 (NCT00993512). Dette var en fase I/II klinisk studie av PCI med bleomycin og Amphinex, og inkluderte pasienter med ulike cancertyper (osteosarkom, hode-halscancer og residiverende brystcancer). Hovedhensikten med studien var å bestemme maksimal tolererbar dose PS (16, 17, 37).

Av 11 pasienter ble det induisert komplett respons på den behandlede tumoren i 8 pasienter, 2 partielle responser og en progressiv sykdom 8 uker etter behandling. Dette er i følge klinikerne som utfører studien et overraskende godt resultat, spesielt tatt i betraktning at denne kliniske studien var en fase I/II studie med terminale pasienter der endepunktet var å finne doseringsnivået, ikke å studere behandlingseffekt. I en pasient med en 3.6 cm tykk tumor (HNSCC) ble det registrert nekrose ned til tiliggende normalvev etter PCI behandlingen, og i pasienter med brystcancerresidiv (subkutant) ble det dokumentert god terapeutisk effekt uten skade på overliggende hud. Ved belysning var pasientene under anestesi og ga uttrykk for å være svært lite smertepåvirket, også i etterkant. Den viktigste bivirkningen som ble observert var økt lysfølsomhet i huden, opptil fire uker etter behandling. Skade på underliggende muskelvev ble ikke detektert i noen av pasientene, og sammen indikerer disse funnene at PCI av bleomycin representerer en svært tumor-selektiv behandling (16, 49).

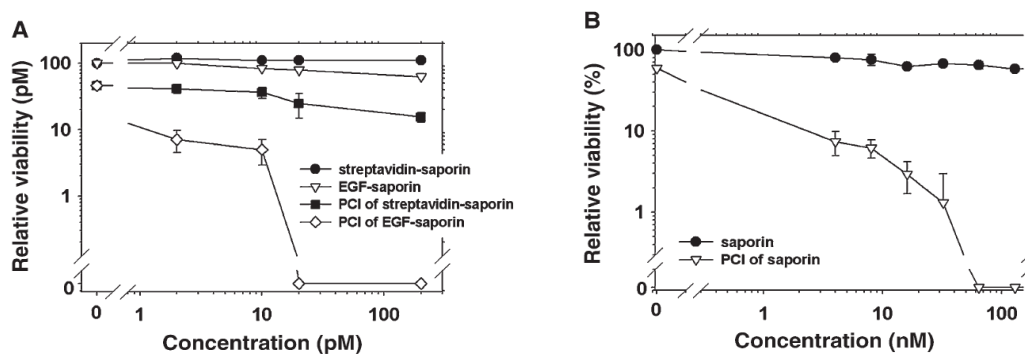
En utfordring man erfarte under den kliniske studien var at mange faggrupper måtte involveres for å få gjennomført PCI-behandlingen, noe som øker behovet for nøye organisering og videre kostnader med metoden. Behandlingseffekten og virkningsmekanismene bak PCI syntes i den kliniske studien også å være mer komplekse enn den som oppnås kun ved endocytotisk frigjøring av et medikament. Immunologiske effekter ser ut til å kunne være en viktig bidragende faktor for behandlingsrespons. Dette er noe man ønsker å kartlegge nærmere i fremtidige studier (16).

Pasientrekruttering til neste kliniske studie, en multisenter fase II-studie, er nå i gang. Denne nye studien inkluderer interstitiell belysning i tillegg til overflatebelysning (38).

3.1.11 Fremtidig PCI (målrettede toksiner)

Dagens kreftbehandling er stadig begrenset av uønskede reaksjoner og bivirkninger i normalt vev (4, 17). For å minimere disse har forskningen dreid i retning av å gjøre behandlingsformene mer selektive. En måte dette har vært gjort på er ved å binde det terapeutiske agens til en transportør som kun gjenkjennes av målcellene der den terapeutiske effekten er ønskelig (5, 17, 50).

I de siste ti-årene har man sett en utvikling av stadig mer funksjonelle målrettede legemidler mot kreft (5, 17). Målrettede toksiner (immunotoksiner) er en type av disse nye legemidlene (4, 17, 19). De består av et proteintoksin fra planter eller bakterier og en cellebindende del, som er enten et antistoff, en endogen ligand eller et fragment av en av disse (4). Immunotoksiner vil på grunn av sin cellebindende del kun bindes spesifikt til celler som uttrykker et spesifikt antigen (4). Den terapeutiske effekten av målrettede toksiner hindres ofte av at de fanges opp i endocytotiske vesikler og brytes ned i lysosomer (19, 51). Selektiviteten av PCI overfor tumorceller er antatt å kunne økes ytterligere ved å levere et legemiddel som i seg selv har høy selektivitet overfor cancerceller. Dette har absolutt vært vist med PCI av forskjellige immunotoksiner in vitro og in vivo (2, 17, 19, 52) (fig 6).



Figur 6: PCI av EGF-saporin in vitro. PCI av EGF-saporin i A-431 celler med økende toksin konsentrasjon (A) og økende lysdose (B) (2).

3.1.12 Muligheter og begrensninger ved PCI

En viktig fordel med PCI er at metoden er meget spesifikk. Bakgrunnen for dette er at PS akkumuleres i tumorvev, samt at man kun vil få aktivering av PS og levering av medikamentet i det belyste området (7, 17). PCI er også vist å øke effektiviteten av medikamentet som leveres, og nødvendig dose kan derfor reduseres (7, 17). Dermed bør PCI kunne gi færre systemiske bivirkninger enn behandling med legemiddelet alene i tilsvarende terapeutiske dose (7). Toleranseutvikling og ervervet MDR kan om mulig forhindres ettersom behandlingen er mer effektiv og derfor ikke trenger å pågå over lengre tid (17). PCI med målrettede toksiner vil kunne tillegge behandlingen ytterligere selektivitet overfor tumorceller (17).

PCI vil i fremtiden heller ikke begrenses til levering av medikamenter av en viss størrelse (7, 10, 19). Nye data tyder nå på at PCI også kan potensere effekten av mindre småmolekylære legemidler som tyrosin kinasehemmere (53). Dette gir større muligheter for klinisk anvendelse av metoden (7, 19).

Det finnes en rekke potensielt biologisk aktive molekyler med intracellulære mål som i dag ikke benyttes i kreftbehandlingen pga deres manglende evne til å diffundere fritt over plasmamembranen (7, 17, 19). Disse kan taes i bruk i klinikken ved levering med PCI. Videre vil man forvente lite bivirkninger av slike medikamenter, da deres virkning er helt avhengig av intracellulær levering med PCI (7, 19).

En begrensning ved PCI er hvor dypt lyset kan penetrere i vevet (7, 17). Maksimal penetrasjonsdybde for rødt lys (650-700nm) anses å være 2 cm i lav-pigmentert vev (7, 17). PCI allikevel ut til å gi en langt dypere nekrose enn PDT og et mer effektivt celledrap i tumorperiferien (5, 19, 45), da PCI i tillegg til den fotokjemiske komponenten også tilfører et medikament med cytotoksiske egenskaper. Antakelig kan tykkere vev behandles med lavere lysdoser enn ved PDT (5, 45). Den begrensede penetrasjonen kan imidlertid også sees på som en fordel, ved at man oppnår god kontroll på at behandlingen kun skjer i ønsket område (7, 17).

På grunn av den begrensede penetrasjonsevnen vil PCI i utgangspunktet være aktuell som behandling ved relativt overfladiske krefttyper. Man kan imidlertid utnytte PCI i kombinasjon med fiberoptikk og laserteknologi, og på denne måten muliggjøre belysning av innvendige organer som GI-traktus, lunger, urinveier og vagina/uterus (7). Større tumores kan også potensielt behandles om man benytter interstitiell belysning, der multiple lysfibre føres inn i tumor (17). Belysning på denne måten vil inkluderes i neste kliniske studie med PCI (38).

Fotosensitering av hud og øyne er beskrevet som de to mest forutsigbare systemiske bivirkningene av PDT (17, 54). Denne toksisiteten kan unngås ved å ikke utsette pasienten for direkte sollys (17). Utover fotosensitering har man sett få eller ingen systemiske bivirkninger (7). PS har lav cytotoksitet utenfor belyste områder og man har lang klinisk erfaring med at anvendelse av PS er trygt (6, 7). Ved PCI vil heller ikke PS lokaliseres til cellens nukleus og det er derfor liten mulighet for mutagene effekter (17). Videre har man etter tre ti-år med PDT ingen holdepunkter for at behandlingen induserer sekundær kreft, noe som er en alvorlig bivirkning ved både stråleterapi og cytostatikabehandling (17). De prekliniske studiene som foreligger på PCI antyder at metoden vil tolereres bedre enn stråleterapi og cytostatika (17). Dette gjelder også om man sammenligner med kirurgi, da PCI er svært lite invasivt (17).

En annen fordel med PCI om man sammenligner med konvensjonell kreftbehandling, som ioniserende stråling og kjemoterapi, er at PCI også vil virke på celler som ikke er i delingsfasen. En årsak til terapivikt ved strålebehandling og kjemoterapi er bl a at disse

behandlingene ikke er effektive når det gjelder drap av maligne celler som er i hvilestadiet (7, 10).

Om man ser på de økonomiske aspektene ved PCI er det en svært kostnadseffektiv behandlingsform (17). Av nødvendig utstyr trengs kun en laser eller lampe med filter, i tillegg til PS og legemiddelet man ønsker å levere. Behandlingen kan utføres i de fleste lokaler uten spesielle krav (17). Man kan også tenke seg den reduserte dosen av medikament som vil være nødvendig ved levering med PCI, som en kostnadsbesparende faktor (17). Antall liggedøgn på sykehus kan antagelig reduseres (17). At mange faggrupper er nødvendig for gjennomføringen av behandlingen kan imidlertid øke kostnadene (16).

Ved gjennomføring av PCI lokaliseres PS til den endocytotiske vesikkelmembranen, og medikamentet man ønsker å levere til vesikkelens innside (7). Likevel vil det alltid være en risiko for at medikamentene tar skade av fotooksidasjonen, iom at avstanden er kort fra vesikkelmembranen der ROS dannes (7, 10, 17). Særlig er dette en begrensning ved genterapi om vektoren for transport av genet er lipofilt, noe som vil medføre lokalisasjon nærmere vesikkelmembranen (7, 17). Destruksjon av genet kan imidlertid begrenses ved bruk av mer hydrofile vektorer (17). For andre medikamenter ser man at signifikante doser slippes ut fra den endocytotiske vesikkelen med sin virkning intakt om medikamentet er hydrofilt (17). Den fotokjemiske skaden av medikamentet som skal leveres kan reduseres ved å utføre PCI etter «light first»-metoden (7, 17).

Man kan se for seg ytterligere muligheter for behandling med PCI i og med at metoden er vist svært effektiv kombinert med konvensjonelle behandlingsformer, som ioniserende stråling og kirurgi (47, 48). Kirurgi vil ved mange lokaliserte cancerformer være førstevalg som behandling, men residiv kan være et problem, noe som er vist å minimeres i kombinasjon med PCI (48). Om man belyser under operasjonen har man dessuten enkel tilgang på tumorvevet, og kan forhåpentlig eliminere gjenværende, uopptagete tumorceller (7, 10) i tillegg til å nå dypere ned i vevet.

En annen positiv respons man har sett ved PCI er en kreft-vaksinerende effekt (17). Thong et al. publiserte i 2007 at PDT aktiverte en immunrespons hos en pasient med residiverende angiosarkom da man etter behandling så at en distal tumor, som ikke var belyst, ble eliminert (55). Selv om behandlingsformen er spesifikk overfor det belyste området, så man altså en behandlingsrespons også i andre cancerrammede områder, som kan tilskrives en tilleggseffekt i form av immunaktivering (55). Dette forventes å bidra ytterligere til behandlingsresultatet også ved PCI, med mulighet for at metastaser som ikke belyses direkte vil respondere på behandling (10, 55).

3.2 Eget forsøk med PCI *in vitro*

3.2.1 Presentasjon av data

Fire forsøk med PCI av toksinet gelonin ble gjennomført på CT26.CL25 celler *in vitro*. Et representativt forsøk er vist i fig 7.

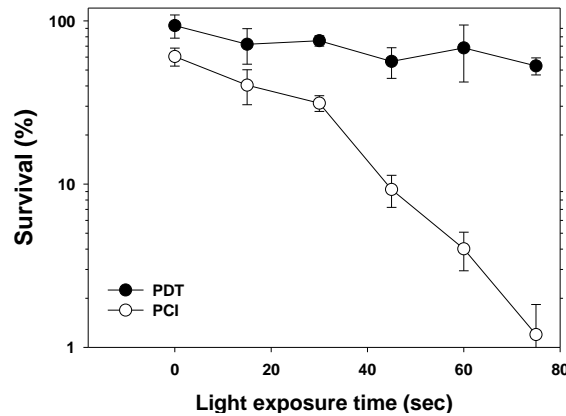


Fig 7: PCI av gelonin. Effekt av PCI av 1 $\mu\text{g/ml}$ gelonin i CT26.CL25-celler med økende lysdose, vist som % overlevelse. Representativt forsøk. Errorbars=SD.

Forsøket viser en synergistisk cytotoxisk effekt mellom gelonin og den fotokjemiske behandlingen (PDT). Allerede ved cellene som ble belyst i 15 sekunder, ser man en forskjell i overlevelse mellom PCI og PDT og denne forskjellen blir større ved belysning i 30 sekunder. Etter belysning i 45 sekunder var kun 10% av cellene som har fått PCI-behandling viable mot ca 70% av de som ble behandlet med PDT. Denne forskjellen fortsatte å øke med økende lysintervaller, frem til det lengste belyningsintervallet på 75 sekunder. Her hadde omtrent 60% av cellene behandlet med PDT overlevd, mot bare ca 1% av cellene som fikk PCI.

3.2.2 Diskusjon av data

Formålet med forsøket var å få erfaring med lab-arbeid og forstå metoden bedre ved å tilegne meg praktiske kunnskaper direkte. Forsøket viser at metoden fungerer og også er relativt enkel å utføre for en medisinerstudent med liten erfaring med *in vitro* arbeide med celler i kultur. Resultatet samsvarer med publisert materiale på samme cellelinje (56). Resultatene gir generelt for lite grunnlag for å kunne diskutere effekten av en metode. Det vil allikevel kort diskuteres egne data og gjennomføring av forsøk, da dette er en del av hva som ble satt som mål for prosjektoppgaven.

Det er i oppgaven valgt å vise data fra et representativt forsøk. Alle forsøkene viste samme tendens : en sterk synergistisk cytotoxisk effekt mellom gelonin og den fotokjemiske behandlingen (PDT).

Variasjon i antall utsådde celler per brønn ble evaluert som en feilkilde i eksperimentene. Dette var tydelig ved å studere forskjellen mellom parallellene i eksperimentene. Flere faktorer kan ha påvirket celleantallet i hver brønn, bl a ukorrekt celletelling, for grundig vasking av celler eller feil ved fortykning av cellesuspensjon.

En annen viktig feilkilde er eksponering av forsøket med lys. I arbeid med PS må man unngå at forsøket utsettes for uønsket lys. Det å jobbe i stummende mørke, er imidlertid vanskelig. Alt arbeid under hele gjennomføringen av forsøket måtte derfor foregå i dempet belysning. Det var ikke vinduer i laben, takbelysningen var avslått og døren hadde persienner nedtrukket. Mange personer gikk imidlertid flere ganger daglig inn og ut, noe som potensielt kunne slippe inn lys. Benken man belyste cellene ved var like ved døren. I tillegg kunne takbelysningen bli slått på ved en feiltagelse eller cellemateriale tilsatt PS bringes for nærme arbeidsbenker med lys ved forflytning. Den planlagte belysningen i forsøket ble gjort manuelt med stoppeklokke over lysbenk. Små avstander på cellebrettet mellom celler som skulle belyses og ikke, samt unøyaktig avlesning av stoppeklokke kan ha bidratt til endrede lysintervaller.

I denne oppgaven var formålet å fokusere på PCI utført med bleomycin. Allikevel ble gelonin benyttet ved lab-forsøkene av sikkerhetsmessige årsaker, da man ikke ønsket at en laborant med lite erfaring skulle arbeide direkte med cytostatika. Hvilket legemiddel som ble benyttet var ikke avgjørende for å kunne demonstrere metodens effekt.

4 OPPSUMMERING OG KONKLUSJON

Målsetningene for denne prosjektoppgaven var å følge PCI fra laboratoriet til klinikk, både gjennom utarbeiding av en teoretisk del basert på litteraturgjennomgang samt erverving av erfaring med *in vitro* metoder benyttet i eksperimentell kreftforskning.

Litteraturgjennomgangen i denne prosjektoppgaven har gitt en oversikt over utviklingen av PCI fra grunnlegging til videre laboratoriearbeid *in vitro* og *in vivo*. Det meste av litteraturen som ble benyttet er hentet fra Professor Kristian Bergs forskningsgruppe ved Radiumhospitalet, OUS. Det at teoridelen hovedsaklig baseres på resultater fra en forskningsgruppe kan bidra til usikkerhet i forhold til om materialet er stort og representativt nok, og videre rundt resultatenes styrke. Ettersom denne gruppen er klart ledende i feltet og deres resultater er reproduisert av andre grupper over hele verden, må den innsamlede litteraturen allikevel anses som representativ. Resultater fra enkelte utenlandske forskningsgrupper er benyttet i teoridelen som eksempler på dette og underbygger resultatene. Det er også inkludert flere oversiktsartikler som presenterer resultater fra en rekke ulike grupper. Ettersom kliniske data på PCI ennå ikke er publisert fikk jeg en oversikt over klinisk ståsted for PCI i en samtale med forskningssjef i PCI Biotech (16).

I dag er de viktigste behandlingformene for kreft kirurgi, kjemoterapi og strålingbehandling (4). Samlet viser litteraturen at PCI overkommer flere store utfordringer man ser ved slike konvensjonelle behandlingsformer, som samtidig skade av friskt vev, bivirkninger og toleranseutvikling/utvikling av multiresistente kreftceller (5, 7, 17). PCI kan kombineres med konvensjonelle behandlingsmetoder og bedret behandlingsresultatet er vist i kombinasjon med både kirurgi og strålebehandling (47, 48), såvel som ved levering av enkelte cytostatika (1, 17, 19).

PCI innehar videre en stor fordel i og med at metoden er svært spesifikk (7, 17), noe levering av målrettede toksiner kan øke ytterligere (2, 17, 19, 52). Målrettede toksiner levert med PCI vil ha et stort fremtidig potensiale som en svært spesifikk behandling for mange solide tumorer (17, 19). PCI er dessuten vist å aktivere vaksiner, noe som kan åpne for et nytt anvendelsesområde for metoden (42).

Forbedring og videreutvikling av alternative belyningsmåter er også et kapittel for fremtidig PCI. Moderne laserteknologi har banet vei for innvendig så vel som interstitiell belysning (7, 17).

Det representative forsøket inkludert i oppgaven viser at delmålet om å tilegne seg metoder for å kunne gjennomføre PCI *in vitro* ble oppnådd. Dette viser også at metoden er relativt enkel å utføre, ettersom jeg hadde liten erfaring som laborant ved prosjektets start. Samtidig har dette delmålet av oppgaven gjort det mulig å studere prekliniske prosesser og utviklingen

av behandlingsmetoden fra laboratoriestadiet på en annen måte en kun gjennom tilgjengelig litteratur.

Det kan konkluderes med at PCI er en meget lovende, ny behandlingsform som potensielt kan brukes i behandling av flere former for kreft. Det foreligger utbredt publisert forskningsmateriale som viser god effekt *in vitro* og *in vivo*, både på allerede godkjente legemidler innen kreftbehandling og andre terapautiske agens som i dag ikke er i klinisk bruk grunnet vansker med intracellulær overføring.

Publisert materiale på kliniske studier foreligger per i dag ikke, men det første gjennomførte kliniske studie av PCI med bleomycin har vist overraskende gode resultater (16, 37, 49). Rekruttering til neste studie er i gang (38) og representerer et viktig steg på veien mot klinisk bruk av PCI.

Referanser

1. Berg K, Dietze A, Kaalhus O, Hogset A. Site-specific drug delivery by photochemical internalization enhances the antitumor effect of bleomycin. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(23):8476-85.
2. Weyergang A, Selbo PK, Berg K. Photochemically stimulated drug delivery increases the cytotoxicity and specificity of EGF-saporin. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2006;111(1-2):165-73.
3. Weyergang A, Selbo PK, Berstad ME, Bostad M, Berg K. Photochemical internalization of tumor-targeted protein toxins. *Lasers in surgery and medicine*. 2011;43(7):721-33.
4. Weyergang A. Photochemical internalization of epidermal growth factor receptor-targeted drugs. Oslo: University of Oslo; 2009.
5. Berg K, Høgset A, Prasmickaite L, Weyergang A, Bonsted A, Dietze A, et al. Photochemical internalization (PCI): A novel technology for activation of endocytosed therapeutic agents. *Medical Laser Application*. 2006;21(4):239-50.
6. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, et al. Photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute*. 1998;90(12):889-905.
7. Hogset A, Prasmickaite L, Selbo PK, Hellum M, Engesaeter BO, Bonsted A, et al. Photochemical internalisation in drug and gene delivery. *Advanced drug delivery reviews*. 2004;56(1):95-115.
8. Hall JEG, Arthur C. *Textbook of Medical Physiology*. Pennsylvania: Elsevier Saunders; 2006.
9. Sand OS, Øystein V. ; Haug, Egil. *Menneskets fysiologi*. Oslo: Gyldendal Norsk Forlag AS; 2002.
10. Selbo PK. Photochemical internalisation: a novel drug delivery system. Oslo: University of Oslo; 2001.
11. Chen J, Stubbe J. Bleomycins: towards better therapeutics. *Nature reviews Cancer*. 2005;5(2):102-12.
12. Stirpe F, Olsnes S, Pihl A. Gelonin, a new inhibitor of protein synthesis, nontoxic to intact cells. Isolation, characterization, and preparation of cytotoxic complexes with concanavalin A. *The Journal of biological chemistry*. 1980;255(14):6947-53.
13. Madan S, Ghosh PC. Interaction of gelonin with macrophages: effect of lysosomotropic amines. *Experimental cell research*. 1992;198(1):52-8.
14. Lambert JM, Blattler WA, McIntyre GD, Goldmacher VS, Scott CF, Jr. Immunotoxins containing single-chain ribosome-inactivating proteins. *Cancer treatment and research*. 1988;37:175-209.
15. Folkehelseinstituttet. Fakta om kreft - forekomst og dødelighet Folkehelseinstituttet: Folkehelseinstituttet; 2013 [updated 01.11.2012; cited 2013 01.09.]. Available from: http://www.fhi.no/eway/default.aspx?pid=239&trg=List_6212&Main_6157=6263:0:25,6183&MainContent_6263=6464:0:25,6188&List_6212=6218:0:25,6185:1:0:0:::0:0.
16. Samtale med PCI Biotech v/ Anders Høgset. 2012.
17. Selbo PK, Weyergang A, Hogset A, Norum OJ, Berstad MB, Vikdal M, et al. Photochemical internalization provides time- and space-controlled endolysosomal escape of therapeutic molecules. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2010;148(1):2-12.
18. Andersen KEL, Hans Bredsted ; Thestrup-Pedersen, Kristian ; Wulf, Hans Christian. *Klinisk dermatologi og venerologi*. København: Munksgaard Danmark; 2010.
19. Norum OJ, Selbo PK, Weyergang A, Giercksky KE, Berg K. Photochemical internalization (PCI) in cancer therapy: from bench towards bedside medicine. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology*. 2009;96(2):83-92.
20. Berg K, Moan J. Lysosomes as photochemical targets. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1994;59(6):814-22.
21. Moan J, Berg K, Anholt H, Madslie K. Sulfonated aluminium phthalocyanines as sensitizers for photochemotherapy. Effects of small light doses on localization, dye fluorescence and

- photosensitivity in V79 cells. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1994;58(6):865-70.
22. Biotech P. What is PCI? - The PCI Technology PCI Biotech: PCI Biotech; 2014 [cited 2014 04.06.]. Available from: <http://pcibiotech.no/what-is-pci/>.
 23. Castano AP, Mroz P, Hamblin MR. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nature reviews Cancer*. 2006;6(7):535-45.
 24. Korbelik M. Induction of tumor immunity by photodynamic therapy. *Journal of clinical laser medicine & surgery*. 1996;14(5):329-34.
 25. Dietze A, Bonsted A, Hogset A, Berg K. Photochemical internalization enhances the cytotoxic effect of the protein toxin gelonin and transgene expression in sarcoma cells. *Photochemistry and photobiology*. 2003;78(3):283-9.
 26. Selbo PK, Sandvig K, Kirveliene V, Berg K. Release of gelonin from endosomes and lysosomes to cytosol by photochemical internalization. *Biochimica et biophysica acta*. 2000;1475(3):307-13.
 27. Selbo PK, Sivam G, Fodstad O, Sandvig K, Berg K. In vivo documentation of photochemical internalization, a novel approach to site specific cancer therapy. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2001;92(5):761-6.
 28. Bonsted A, Hogset A, Hoover F, Berg K. Photochemical enhancement of gene delivery to glioblastoma cells is dependent on the vector applied. *Anticancer research*. 2005;25(1A):291-7.
 29. Hogset A, Engesaeter BO, Prasmickaite L, Berg K, Fodstad O, Maelandsmo GM. Light-induced adenovirus gene transfer, an efficient and specific gene delivery technology for cancer gene therapy. *Cancer gene therapy*. 2002;9(4):365-71.
 30. Hogset A, Prasmickaite L, Tjelle TE, Berg K. Photochemical transfection: a new technology for light-induced, site-directed gene delivery. *Human gene therapy*. 2000;11(6):869-80.
 31. Berg K, Selbo PK, Prasmickaite L, Tjelle TE, Sandvig K, Moan J, et al. Photochemical internalization: a novel technology for delivery of macromolecules into cytosol. *Cancer research*. 1999;59(6):1180-3.
 32. Oliveira S, Fretz MM, Hogset A, Storm G, Schiffelers RM. Photochemical internalization enhances silencing of epidermal growth factor receptor through improved endosomal escape of siRNA. *Biochimica et biophysica acta*. 2007;1768(5):1211-7.
 33. Berg K, Folini M, Prasmickaite L, Selbo PK, Bonsted A, Engesaeter BO, et al. Photochemical internalization: a new tool for drug delivery. *Current pharmaceutical biotechnology*. 2007;8(6):362-72.
 34. Shiraishi T, Nielsen PE. Enhanced delivery of cell-penetrating peptide-peptide nucleic acid conjugates by endosomal disruption. *Nature protocols*. 2006;1(2):633-6.
 35. Adigbli DK, Wilson DG, Farooqui N, Sousi E, Risley P, Taylor I, et al. Photochemical internalisation of chemotherapy potentiates killing of multidrug-resistant breast and bladder cancer cells. *British journal of cancer*. 2007;97(4):502-12.
 36. Lou PJ, Lai PS, Shieh MJ, Macrobert AJ, Berg K, Bown SG. Reversal of doxorubicin resistance in breast cancer cells by photochemical internalization. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2006;119(11):2692-8.
 37. AS PB. Safety Study of Amphinex Based Photochemical Internalisation (PCI) of Bleomycin in Patients With Cutaneous Cancer *ClinicalTrials.gov*: PCI Biotech AS; 2009 [updated 17.06.2011; cited 2014 04.06.]. Available from: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00993512?term=amphinex&rank=2>.
 38. AS PB. A Study to Evaluate the Safety and Efficacy of PC-A11 in Patients With Recurrent Head and Neck Squamous Cell Carcinoma *CinicalTrials.gov*: PCI Biotech AS; 2012 [updated 26.09.2013; cited 2014 04.06.]. Available from: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01606566?term=amphinex&rank=4>.
 39. AS PB. Dose Escalating Study for Amphinex-based PCI of Bleomycin *ClinicalTrials.gov*: PCI Biotech AS; 2013 [updated 20.06.2013; cited 2014 04.06.]. Available from: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01872923?term=amphinex&rank=1>.

40. Biotech P. The potential of PCI PCI Biotech: PCI Biotech; 2014 [cited 2014 04.06.]. Available from: <http://pcibiotech.no/the-potential-of-pci/>.
41. DNR P-gv. Muntlig korrespondanse med PCI-gruppen ved DNR. 2013.
42. Biotech P. Vaccination - An innovative adjuvant system based on the use of a proprietary photosensitizer PCI Biotech: PCI Biotech; 2014 [cited 2014 04.06.]. Available from: <http://pcibiotech.no/vaccination/>.
43. Hakerud M, Waeckerle-Men Y, Selbo PK, Kundig TM, Hogset A, Johansen P. Intradermal photosensitisation facilitates stimulation of MHC class-I restricted CD8 T-cell responses of co-administered antigen. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2014;174:143-50.
44. Waeckerle-Men Y, Mauracher A, Hakerud M, Mohanan D, Kundig TM, Hogset A, et al. Photochemical targeting of antigens to the cytosol for stimulation of MHC class-I-restricted T-cell responses. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV*. 2013;85(1):34-41.
45. Norum OJ, Gaustad JV, Angell-Petersen E, Rofstad EK, Peng Q, Giercksky KE, et al. Photochemical internalization of bleomycin is superior to photodynamic therapy due to the therapeutic effect in the tumor periphery. *Photochemistry and photobiology*. 2009;85(3):740-9.
46. Pron G, Mahrour N, Orlowski S, Tounekti O, Poddevin B, Belehradec J, Jr., et al. Internalisation of the bleomycin molecules responsible for bleomycin toxicity: a receptor-mediated endocytosis mechanism. *Biochemical pharmacology*. 1999;57(1):45-56.
47. Norum OJ, Bruland OS, Gorunova L, Berg K. Photochemical internalization of bleomycin before external-beam radiotherapy improves locoregional control in a human sarcoma model. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2009;75(3):878-85.
48. Norum O-J, Giercksky K-E, Berg K. Photochemical internalization as an adjunct to marginal surgery in a human sarcoma model. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2009;8(6):758-62.
49. Muntlig korrespondanse med Kristian Berg, PCI-gruppen DNR. 2013.
50. Torchilin VP. Drug targeting. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2000;11 Suppl 2:S81-91.
51. Wu M. Enhancement of immunotoxin activity using chemical and biological reagents. *British journal of cancer*. 1997;75(9):1347-55.
52. Selbo PK, Sivam G, Fodstad O, Sandvig K, Berg K. Photochemical internalisation increases the cytotoxic effect of the immunotoxin MOC31-gelonin. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2000;87(6):853-9.
53. Weyergang A, Selbo PK, Berg K. Sustained ERK [corrected] inhibition by EGFR targeting therapies is a predictive factor for synergistic cytotoxicity with PDT as neoadjuvant therapy. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1830(3):2659-70.
54. Tsoukas MM, Lin GC, Lee MS, Anderson RR, Kollias N. Predictive dosimetry for threshold phototoxicity in photodynamic therapy on normal skin: red wavelengths produce more extensive damage than blue at equal threshold doses. *The Journal of investigative dermatology*. 1997;108(4):501-5.
55. Thong PS, Ong KW, Goh NS, Kho KW, Manivasager V, Bhuvanewari R, et al. Photodynamic-therapy-activated immune response against distant untreated tumours in recurrent angiosarcoma. *The lancet oncology*. 2007;8(10):950-2.
56. Weyergang A, Cheung LH, Rosenblum MG, Mohamedali KA, Peng Q, Waltenberger J, et al. Photochemical internalization augments tumor vascular cytotoxicity and specificity of VEGF/rGel fusion toxin. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2014.

Forsidefigur (PCI): Med tillatelse fra PCI Biotech.