



## SAHLGRENSKA AKADEMIN

### **Utveckla en in vitro metod för att mäta penetration av antikropp-nuklid-konjugat i tumörvävnad: initiala försök på ovarialcancer**

Examensarbete i medicin

Diana Abona

Läkarprogrammet

Göteborg, Sverige 2018

Handledare: Ragnar Hultborn

Avdelningen för Onkologi,  
Institutionen för kliniska vetenskaper,  
Sahlgrenska Akademin,  
Göteborgs Universitet

# Innehållsförteckning

Abstrakt	3
Introduktion	5
Specifik målsättning	14
Material och Metod	15
Resultat	27
Diskussion	27
Etik	32
Konklusion och Betydelse	33
Populärvetenskaplig sammanfattning	34
Tack	36
Referenser	37

## Abstract

Degree project, Programme in Medicine

**To develop an in vitro method to measure the penetration of antibody-nuclide conjugates in tumor tissue: initial attempts on ovarian cancer.**

Diana Abona, January 2017

Supervisor: Prof Ragnar Hultborn

Department of Oncology. Institute of Clinical Sciences

**Background.** Ovarian cancer is the fifth leading cause of cancer death and the most malignant of gynecological cancer. After standard treatment with surgery and intravenous chemotherapy, 70% of all women will relapse. Therefore it is important to develop new treatment methods for ovarian cancer.

**Aim.** The Targeted Alpha Therapy Group in Gothenburg develops a radioimmunotherapy based on the use of an alpha particle emitting nuclide, 211-Astatine, conjugated with ovarian cancer specific monoclonal antibodies, e.g. MX35. Since the alpha particle track length is only 70  $\mu\text{m}$  it is essential to know how deep into tumour cell clusters the antibody-nuclide complex can reach. Thus we wanted to develop a simple in vitro method that enables measuring of how deep into an experimental "micrometastasis", the vector of the alphaemitting nuclide, i.e. the antibody with various modifications with respect to size and affinity etc., can penetrate.

**Method.** Hollow fibers with a diameter of 1 mm and permeable to molecules up to 500 kD are used. Cultured human ovarian cancer cells, Ovar-3, in a dense suspension is added into the "fiber" with a pipette. The fiber containing Ovar-3 is then centrifuged at approximately 3000 g for 15 minutes resulting in a densely compacted cell cylinder, simulating a micrometastasis. The present work describes the procedures used to reach this goal. The use of this highly artificial micrometastasis model will be: The fiber with compacted tumour cells is introduced into a solution containing the murine ovarian cancer specific

antibody (MX35). After different exposure times, the fiber with the tumour cell cylinder is fixed in formalin. After usual dehydration, the fiber is embedded in paraffin and cut in 5-10  $\mu\text{m}$  sections. After rehydration, immunohistochemistry is made using anti-mouse IgG antibody with fluorescence or peroxidase analysis to see how deep the antibody penetrated into the compacted cell cylinder.

**Results.** We succeeded, after many attempts with different approaches, to produce a relatively well filled fiber with tumour cells.

**Conclusion.** The work has involved several methodological developments with the achievement of basic cell culture techniques and conventional histotechnology. We have not yet fully reached the goal of reproducibly establishing a fully-filled fiber with compacted cells. We will try with cells suspended in a medium of extracellular matrix, as well as to try different degrees of centrifugation, fixation as well as cryosection.

**Key words:** Ovarian cancer, Alpharadioimmunotherapy, Astatine-211

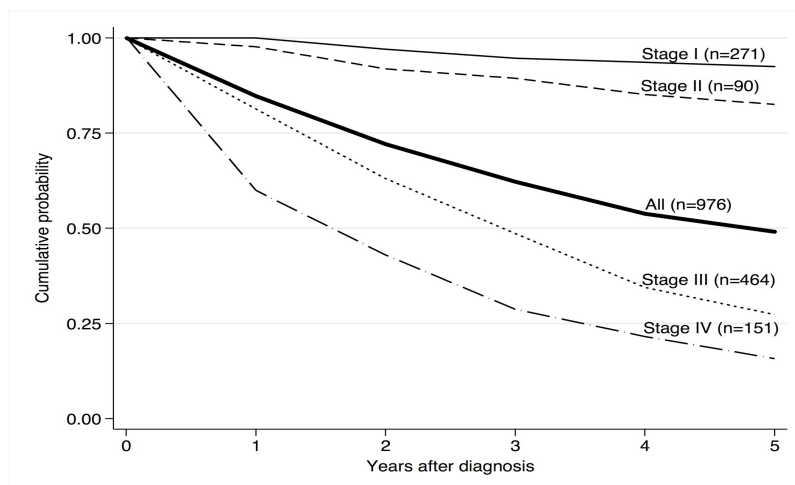
## Introduktion

Orsaken till död i cancer är i de flesta fall en metastasering till olika organ, cirka 22.000 dödsfall inträffar årligen i Sverige. (1) Då patienten initialt kommer till diagnos hittas i flertalet fall inga metastaser och primärtumören liksom regionala lymfkörtlar avlägsnas med kirurgi och/eller strålterapi. Tumören kan vara av en typ där sannolikheten är stor att osynliga så kallade ockulta mikrometastaser kan finnas. Dessa patienter erbjuds idag så kallad adjuvant medicinsk terapi, exempelvis vid många typer av bröstcancer eller tarmcancer.(2, 3) Denna typ av tilläggsbehandling som sedan 1980-talet studerats i kontrollerade randomiserade studier ger statistiskt en förbättrad överlevnadschans, men effekten är begränsad och merparten av patienterna har trots en tuff behandling inte nytta av den. (4) Nya behandlingstekniker är alltså av nöden.

## Ovarialcancer

Den cancerform som forskargruppen ”Targeted Alpha Therapy Group” i Göteborg, där detta arbete utförts, har koncentrerat sig på är ovarialcancer. I västvärlden är ovarialcancer den mest elakartade bland kvinnliga tumörer och klassad som den femte ledande orsaken till cancerdöd hos kvinnor i USA samt Norra och Västra Europa(5). I de flesta fall resulterar cancersjukdomen i dödlighet trots klinisk komplett remission efter kirurgi och intravenös cytostatikabehandling(6). Livstidsrisken för en kvinna att utveckla ovarialcancer är upp mot 2% där cirka 700 kvinnor i Sverige får diagnosen årligen varav 400-500 årligen dör(7) med en 5-års relativ överlevnad på 46% (8). Sjukdomen är vanligast hos kvinnor mellan 55-64 års ålder men hittas även hos kvinnor yngre än 20 samt äldre än 85. Trots den medicinska utvecklingen har överlevnadsförbättringen för avancerad ovarialcancer varit subtil de senaste 25 åren(6)

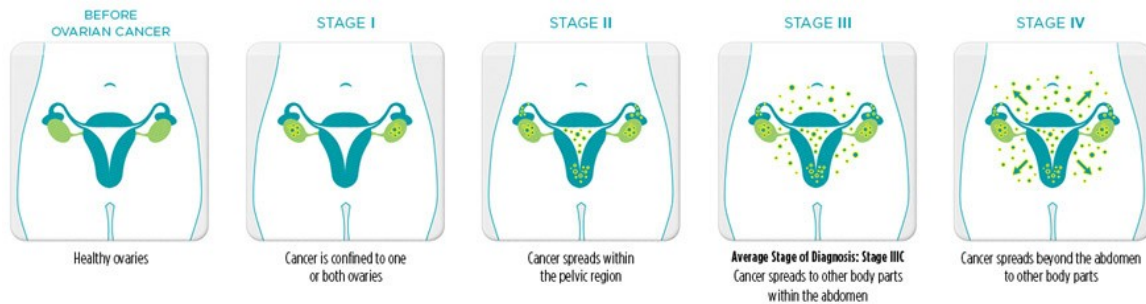
Golden standard behandling för ovarialcancer är idag kirurgi följt av intravenös cytostatikabehandling. (8) Prognosen för ovarialcancer styrs av vilket stadium den diagnostiseras i. Av de patienter som diagnostiseras är 60% redan i ett avancerat stadium (Stadie III- IV) med en 5 års överlevnad på <30%.(9) Patienter i stadium I har en 10% risk att återfalla i sin sjukdom medan patienter i stadium 4(fjärrmetastaser) har en risk upp mot 95% att dö inom 5 år.(10). Ett problem är att cancersjukdomen är en ”the silent tumour” vilket innebär att kvinnorna inte har några symptom eller ospecifika symptom som mensvärk, snabb mättnadskänsla eller ökande urinträngningar, vilket ger den tid till att bli invasiv och metastasera före diagnosen fastställs.(11)



**Figur 1.** Bilden visar 5-årsöverlevnaden av ovarialcancer från stadium I-IV. Bilden är tagen från Margaretha Åkesson, *Clinical outcome and prognostic factors in borderline ovarian tumour and invasive ovarian carcinomas in western Sweden.*

Kvinnorna i stadium III-IV behandlas i allmänhet med omfattande bukkirurgi innebärande avlägsnande av bägge ovarier, äggledare och uterus liksom noggrant avlägsnande av peritoneala tumörer. Åtgärden kallas cytoreduktiv kirurgi och den kan naturligtvis aldrig bli mikroskopiskt radikal. Med hänsyn till den dåliga prognosen efter enbart kirurgi ges idag

regelmässigt intravenös cytostatikabehandling över 18 behandlingsveckor men trots det kommer de flesta att återfalla i sin sjukdom. (12)



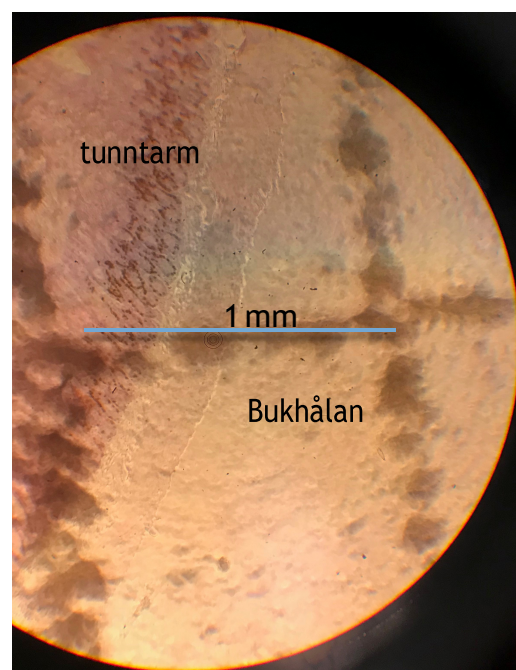
**Figur 2.** Beroende på äggstockscancers utbredning delar man upp den i olika stadier I-IV.

Som framgår av Fig.1 är den dålig vid stadium III och i synnerhet vid stadium IV. *Bilden är tagen av national ovarian cancer coalition.*

Vanligaste lokalisering för spridning är i bukhålan med förnyade bukbesvär av vätska i buken, ascites, vilket beror på att tumörcellerna lossnar från tumörerna på äggstockarna direkt in i bukhålan som mikrometastaser vilket i slutändan oftast kommer visa sig som en tydlig inkurabel peritoneal tumörväxt (peritoneal carcinos) och därmed död. De kan även sprida sig via lymfsystemet vilket är ovanligare.(6) Oftast är den intraperitoneala den enda spridningen och det kan bero på att de mikrometastaser som efter kirurgin var kvar i bukhålan inte nåddes av den intravenösa cytostatikan då dessa små metastaser inte är kärlförsörjda. Man har därför försökt behandla just bukhålan med intraperitoneal cytostatika, som visat ökad överlevnad, men behandlingen är förenad med så mycket biverkningar att den inte kommit till rutinmässig användning.(13)

Man har också försökt att strålbehandla bukhålan antingen med så kallad extern strålterapi över hela bukfältet framifrån och bakifrån, men i bukhålan finns många mycket strålkänsliga organ som tunntarm och njurar och metoden används inte som en primärbehandling med hänsyn till risken av sena biverkningar.(14)

Man har också försökt att injicera radioaktiva isotoper som kolloider direkt i bukhålan. De isotoper som använts är P-32 eller radioaktivt guld Au-198. Dessa isotoper är betastrålande, det vill säga, de sönderfaller med utsändande av elektroner med flera millimeter långa räckvidder. Det problem som då uppstod var att stamcellerna längst ned i botten av tunntarms kryptor, nåddes av elektronstrålningen, med tunntarmsskada som resultat. (15) Nya behandlingstekniker är alltså nödvändiga att utveckla!



**Figur 3.** Längst ner ser vi tritiummärkta prolifererande kryptceller som skulle kunna skadas vid betastrålning kommande från peritonealrummet (till höger i bilden). Fyrkanterna är 1mm i storlek vilket visar på hur nära kryptcellerna är i förhållande till peritonealrummet.

### **Radioimmunoterapi (RIT) och targeted therapy.**

#### **Antikroppar:**

Nästa steg i utvecklingen av nya behandlingsmetoder var att binda elektronstrålande isotoper till antikroppar som var specifika, tumörsökande så att inte hela peritonealytan och därmed tunntarm skulle exponeras, utan bara på de platser tumörceller fanns. Denna metod kallas för



radioimmuntoterapi (16). Användning av ”antikroppar” för bot av cancer var första gången illustrerat 1895 av Hericourt och Richet (17). Nobelpristagaren år 1943 var en svensk/ungersk kemist, De Hevesy som lyckades med att märka en antikropp med radionuklid (18).

Administrationssättet av radioimmunoterapi för ovarialcancer är intraperitonealt istället för intravenöst. Då uppnås relevant regional behandling i och med att ovarialcancer sprider sig just i bukhålan och även för att studier visat på att upptag av läkemedel och bindning av antikroppar till mikrometastaser i bukhålan och peritoneum visat sig vara bättre när de administrerats intraperitonealt jämfört med intravenöst (19, 20). Risken för exempelvis benmärgstoxicitet blir också mindre, då transporten av antikroppskonjugatet från bukhålan till blodcirkulationen tar så lång tid att nukliden hunnit till största delen ha sönderfallit.

En antikropp som visat god specificitet för ovarialcancer och som kan användas inom radioimmunoterapi är musantikroppen MX35 (21). Den har även visat sig ha en 90% homogen reaktivitet för ovarialcancer celler samtidigt som den knappt binder in till normalvävnaden (22). Cancer cellerna överuttrycker ett natriumberoende fosfotransportprotein 2B antigen (NaPi2b) som MX35 känner igen och binder till (23). Målet var att märka MX35 med en radionuklid som transporterar strålningen direkt till ovarial cancer cellerna. Det är detta som kallas för ”targeted therapy”. Naturligtvis kan principen användas med andra specifikt tumörsökande ligander, för närvarande använder TAT-gruppen en antikropp riktad mot folatreceptor A som är överuttryckt i ovarialcancer.

## **Radionuklider**

Radionuklider definieras av grundämnet med sitt definierade antal protoner i kärnan men har för många alternativt för få neutroner i kärnan, som därför blir instabil och sönderfaller med utsändande av elektroner (i vissa fall positroner) eller alfapartiklar, dvs heliumkärnor bestående av 2 protoner och 2 neutroner. Antingen sönderfaller kärnan till en stabil nuklid

eller så är även dotternukliden instabil och sönderfaller i sin tur vidare. Man talar då om en sönderfallskedja (24).

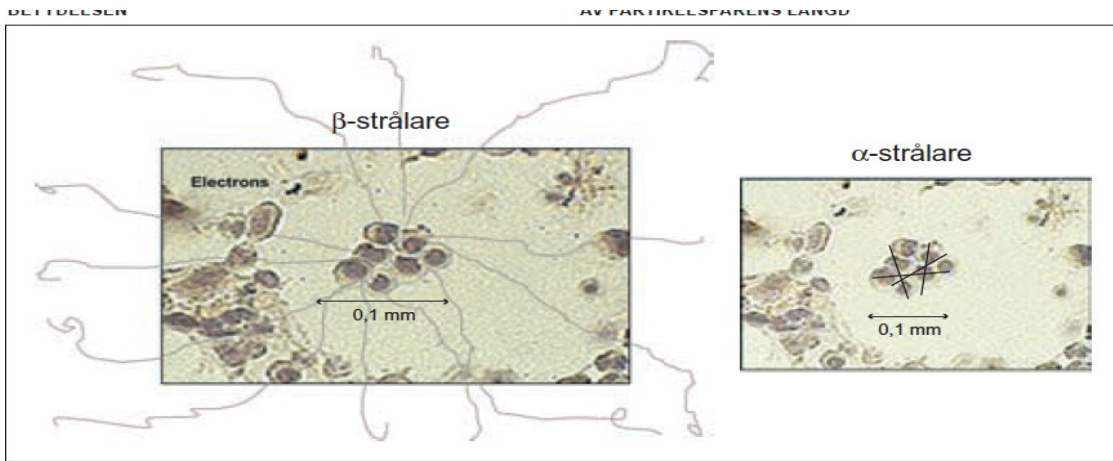
### **Betastrålare.**

Flera försök har gjorts med betastrålande radioimmunoterapi vilket visat god effekt på makrotumörer, framförallt lymfom med en tumörregression på 83% och dessa är nu registrerade som läkemedel till exempelvis Zevalin, en CD20 antikropp konjugerad med Yttrium-90 (Y-90) (25).

Vidare har så kallade fas I-II studier med betastrålande radioimmunoterapi som administrerats intraperitonealt hos kvinnor med ovarialcancer visat minskad tumörväxt (26), en fullständig remission efter klinisk uppföljning och ”thirdlook” utvärdering (27) samt fördröjd tid till återfall i peritoneum (28). Därför gjordes en fas III studie (randomisering mellan konventionell terapi mot tillägget av RIT) med den betastrålande isotopen Y-90 märkt med antikropp HMFG1 mot en ovarialcancerpitop på kvinnor med kirurgisk definierad (second-look) klinisk remission av ovarialcancer efter genomförd operation och intravenös cytostatikabehandling. Studien visade tyvärr varken någon förlängd överlevnad eller förlängd tid till återfall i bukhålan (29).

Ytterligare har en fas II studie gjorts på kvinnor med kvarvarande ovarialcancer efter kirurgi och cytostatikabehandling. Kvinnorna fick radioimmunoterapi behandling intraperitonealt med betastrålande isotopen I-131 märkt med monoklonala antikroppen OC-125. Studien visade obetydlig terapeutisk effekt (30).

Förklaringen till varför betastrålande radioimmunoterapi inte visat god effekt på ovarialcancer kan förklaras med att betastrålares elektroner oftast har en räckvidd på flera mm, men en ”mikrotumör” är betydligt mindre. I och med betastrålningens långa räckvidd kommer den absorberande dosen till mikrometastaserna att vara låg (31).



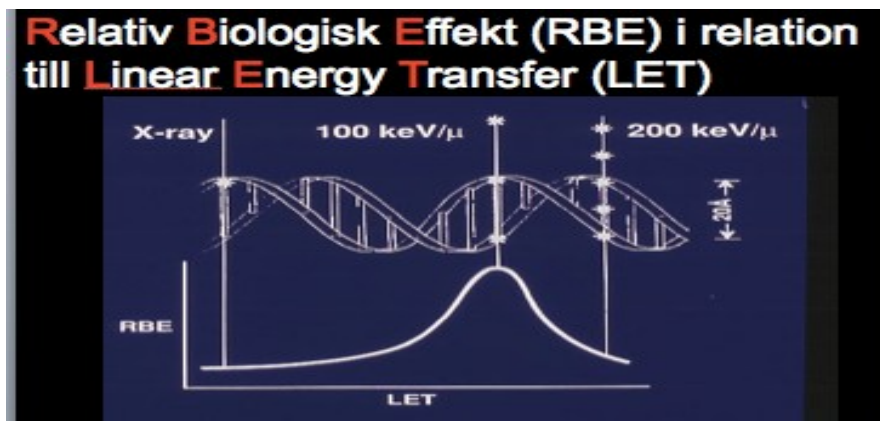
**Figur 4:** Tumörceller ses centralt med betastrålarens långa räckvidd till vänster som sträcker sig utanför tumörcellklustret jämfört med alfastrålarens korta räckvidd till höger som förhåller sig till tumörcellerna. *Bilden är tagen från Ragnar Hultborn, "Konform strålterapi på cellnivå med alfaradioligander".*

Betastrålande radionukliden Y-90 har en halveringstid på 64 h, vilket leder till att en större fraktion av sönderfallet kommer att ske utanför bukhålan och skada normalvävnaden framförallt benmärg och njurar (22).

### Alfastrålare

Det är nu gruppen "Targeted Alpha Therapy" kommer in med radioimmunoterapi och frågeställningen om isotoper med alfasönderfall istället för beta är fördelaktigare vid behandling av ockult spridd ovarialcancer. Man konjugerar nu ovarialcancersökande monoklonala antikroppar med en alfapartikel sönderfallande isotop, Astatine-211 (32).

Alfapartikeln är en heliumkärna med extremt hög energi och en räckvidd på ca 70µm vilket leder till mycket hög absorberad dos till de celler där antikroppen bundit och i dess omedelbara närhet utan att skada normalvävnaden (32). Alfastrålande partiklar har mycket täta jonisationer (tätjoniserade) vilket innebär att skadan i DNA som uppkommer är allvarligare än den som uppkommer efter elektroner (glesjoniserade), även vid samma dos, det vill säga Gray= Joule/kilogram. Detta kallas för att alfastrålningen har större "Relative Biological Effectiveness", RBE (31).



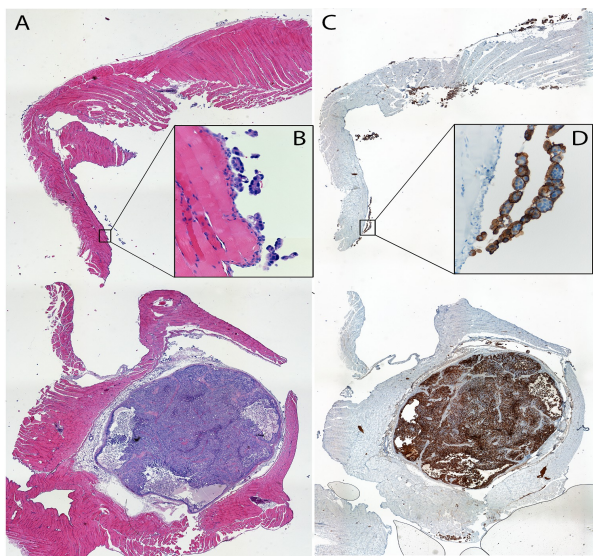
**Figur 5:** Vid samma dos, Gray, men med den täta energiöverföringen per längdenhet (LET), 100 keV/um orsakar alfapartiklar mycket täta jonisationer vilket innebär att skadan i DNA som uppkommer är allvarligare än den som uppkommer av elektroner från röntgenstrålning med mycket glesare jonisationer. Vi ser även att om vi höjer energin och därmed jonisationstätheten till 200 keV/um så blir inte skadan på DNA större, utan onödig energi slösas och den relativa biologiska effekten minskar.

### Target Alpha Therapy (TAT) Group

Gruppen som etablerades på 1990-talet är interdisciplinär och består av strålningsfysiker, radiokemister, strålbioologer, nukleärmedicinare och onkologer. Syftet för gruppens långsiktiga arbete är att skapa en ny behandlingsform, strålterapi konform för mikroskopisk cancermetastasering. Befintlig adjuvant kemoterapi är oftast otillräcklig och toxisk, varför behovet av nya tekniker är stort. TAT-gruppen har fokuserat på studier av behandling av ovarialcancer av två orsaker: dels är sjukdomen den mest allvarliga cancer som drabbar kvinnor med en dålig prognos, dels kan behandlingen fokusera på intraperitoneal terapi då återfallen där är det mest problematiska och risken för allvarliga systemiska biverkningar av en ny experimentell teknik är mindre om administrationen kan begränsas till bukhålan.

Alfastrålaren Astat-211 har även en kort halverings tid på 7,21 h, vilket innebär att största delen av sönderfallen kommer att ske lokalt i bukhålan och inte ge någon större systemisk skada när liganden tas upp av blod och lymfsystemet. (33)

Eftersom att alfastrålningens räckvidd är ca 70  $\mu\text{m}$  är en viktig frågeställning om hur djupt den bärande antikroppen penetrerar in i mikrotumörens vävnad. Detta är essentiellt eftersom om den bärande antikroppen med alfastrålande isotoper binder enbart på ytan av mikrotumören, då kan vi endast döda mikrotumörer med radie mindre än 70  $\mu\text{m}$ . Penetrerar däremot antikroppen in, då kan vi döda större mikrotumörer. Det som kallas ”mikroskopiska” tumörer kan variera från enstaka celler på peritonealytan till större mycket större, > 1 mm, cellklusters, se Fig 6.



**Figur 6.** Överst ses mikrometastaser i bukhålan i mus som enskilda celler dels färgade med Htx-Eosin dels med immunhistokemi (peroxidase), nederst ett betydligt större tumörkluster.

Därför vill vi skapa en enkel in vitro metod som mäter hur djupt en antikropp penetrerar in i en tumörvävnad och hur olika modifieringar av liganden liksom hur vi ger den kan påverka penetrationen

Radioimmunoterapi med alfapartikelstrålning har visat god effekt på immunsupprimerade, nakna möss som blivit intraperitonealt inokulerade med NIH:OVCAR-3 celler, vilket är en etablerad human cellinje av ovarialcancer inköpt från ”American Type Cell Collection” (ATCC). Resultat har visat minskad ascites (34), TFF (den andel, fraktion, av behandlade djur

som inte kunde påvisas ha någon tumör vare sig för blotta ögat eller vid granskning i mikroskop) upp mot 61% vid behandling med 200 kBq (33) samt 67% vid behandling med 400 kBq utan toxisk effekt jämfört med obehandlade kontrollmöss med 100% ascites och mikroskopisk tumörväxt varav 67% även hade makroskopisk tumörväxt (34).

Då bukhålan omges av peritoneum har frågan uppkommit hur hög den tolererbara dosen för peritoneum, mesothelet, är. Studier på möss visade varken makroskopisk eller mikroskopisk skada på peritoneum med absorberande doser upp mot 50 Gy men en långtidsrisk för utveckling av mesoteliom kan inte uteslutas (35).

I och med hög tumöreffekt och liten toxisk effekt på möss har en fas I studie på kvinnor med återfall av ovarialcancer gjorts, där man administrerade  $^{211}\text{At}$ -MX35 intraperitonealt. Resultatet visade ingen toxisk effekt (22). Någon värdering av terapieffekt går inte att göra på en Fas I studie.

### **Specifik målsättning.**

Att skapa ett enkelt in vitro-system för att kunna studera tumörspecifika monoklonala antikroppars/liganders penetration/diffusion in i en tumörvävnad för att därigenom *kvalitativt* bedöma hur molekylstorlek, antigenaffinitet, molekylladdning, radionuklidkonjugering påverkar denna. Möjligheten att förbättra penetrationen av nuklidmärkt antikropp genom så kallad pretargeting bör kunna evalueras. Matematiska modeller (36) över antikroppars inträngning bör kunna experimentellt valideras eller falsifieras.

## Material och metod

### Cellinje

Vi har använt oss av den humana ovarialcancerlinjen OVCAR-3 (NIH:OVCR-3: National Institutes of Health). Cell linjen är erhållen från American Type Culture Collection, ATCC (Rockville, MD). Cellerna är odlade i en T-75 odlingsflaska i en 37° C fuktig inkubator med 95% luft /5% CO<sub>2</sub> med RPMI( Roswell Park Memorial Institute) -1640 cellodlingsmedium som är bikarbonatbuffrat och innehåller 10% fetalt kalvserum (innehållande diverse tillväxtfaktorer), 1% L-glutamine och 1% pencillin-streptomycin (för att förhindra infektion).



**Figur 7:** T-75 odlingsflaskor i vilka OVCAR-3 odlas, liksom ovan en s.k. LAF-bänk där cellerna hanteras sterilt. *Bilden är tagen från ThermoFischer Scientific.*

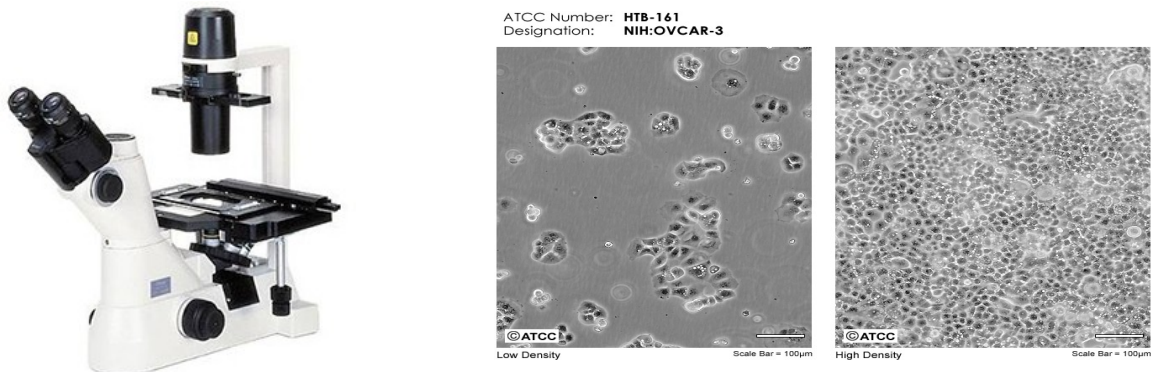
### Cellodling och subkultivering

Centralt i allt arbete med cellodling är sterilitet i alla moment, något som måste övas in. All hantering nedan sker i speciella dragskåp (LAF.bänk) med sterilfiltrerad luft och med ett lätt övertryck som förhindrar att luft kommer in utifrån under hanteringen.



**Figur 8:** Ett dragskåp, LAF-bänk, där alla moment har utförts sterilt. Bild tagen från Alate

Två gånger i veckan tar vi fram OVCAR-3 cellerna och gör en bedömning med hjälp av invertermikroskopi om vilka OVCAR-3 innehållande odlingsflaskor som skall få nytt medium och vilka som ska delas upp i nya odlingsflaskor pga för mycket tumörceller och för lite plats för tillväxt, det kallas för subkultivering.



**Figur 9.** Bilden till höger visar ett invertermikroskop. Bilden till vänster visar OVCAR 3-celler i faskontrast. Bilden till höger är från Bilimmed och bilden till vänster är från ATCC

**Cellodling:** Cellerna odlas i speciella Nunc Biolite odlingsflaskor , Fig 7. Vi suger med pipett bort det gamla RPMI-1640 medium som tumörcellerna livnärt sig på. Därefter tillsätter vi nytt 9 ml RPMI-1640.

**Subkultivering:** De odlingsflaskor där tumörcelltillväxten lett till konfluens, dvs en tät cellmatta, delar vi på två odlingsflaskor. Det första vi gör är att ta bort medium inne i



odlingsflaskorna med hjälp av en pipett kopplad till en sug. Därefter tillför vi 2ml Versene 1:500 (Gibco), en etylendiamintetraättiksyra som tar bort serumrester i flaskan och inhiberar trypsin, vilket används för att därefter lossa cellerna helt från odlingsflaskan. Vi tillför sedan 1 ml trypsin till odlingsflaskan för lossning av tumörcellerna. Vi väntar i 1 minut och tittar därefter i invertermikroskop för att se om tumörcellerna har lossnat. När det är gjort tillför vi 7 ml medium i flaskan som blandas med 1 ml lossade tumörceller. Därefter suger vi ut 6/8 delar som vi slänger och fördelar 2/8 delar i 2 flaskor, 1/8 del i vardera. Till slut tillför vi 9 ml RPMI-1940 medium i vardera odlingsflaska.

### **Procedurer för att fylla "hollow fiber" med celler:**

#### **Lossa celler från odlingsflaskan.**

1. Vi tar fram en odlingsflaska och ser i invertermikroskopi att den är "packad" med tumörceller.
2. Vi tar fram en pipett kopplad till en sug och tar bort medium i odlingsflaskan.
3. Därefter tillför vi 2 ml Versene 1:500 (Gibco) som tar bort serumresten vilket hämmar trypsineffekten och ser i mikroskopi om cellerna bildar ljusa grupperingar.
4. Vi tillför 1 ml 0.25% trypsin EDTA (Gibco) vilket lossar cellerna från dess yta i odlingsflaskorna. Efter 4 min ser vi i mikroskop att cellerna har lossnat.
5. Därefter tillför vi 10 ml RPMI 1640 (Gibco) för att skölja bort tumörcellerna från väggen så att de hamnar längst ner i odlingsflaskan.
6. Vi suger upp 10 ml medium blandat med tumörcellerna med en pipett och sätter ner det i ett centrifugrör.
7. Centrifugen ställer vi in på 3500 rpm, i 15 min, motsvar i vår centrifug cirka 2800 g
8. När centrifugeringen är klar och vi ser att vi fått en tät suspension av tumörceller i botten av röret suger vi med pipett bort mediumet över cellerna (supernatanten), vilket

resulterar i en tät cellsuspension i botten (pelleten) av röret. Celltätheten i denna är i storleksordningen 100.000 per ul.

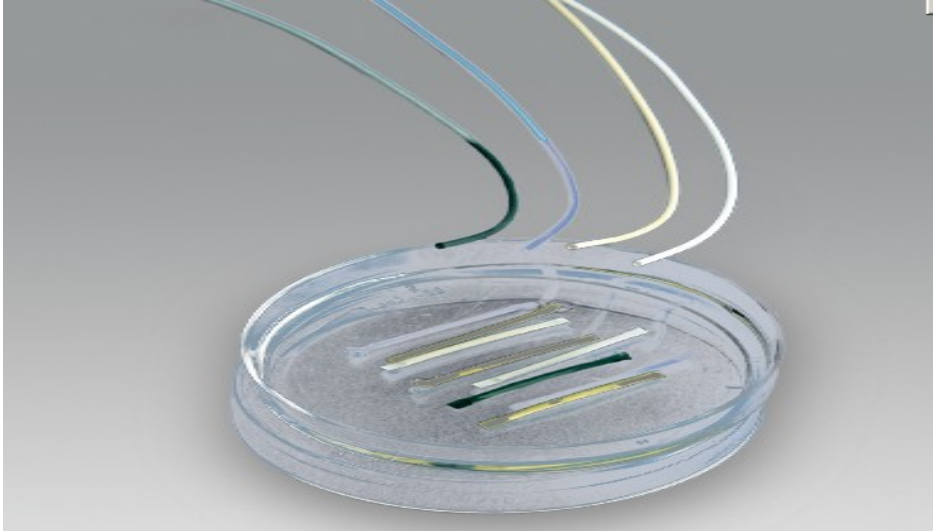


**Figur 10.** Bilden visar en tät suspension av ned snurrade cancerceller. Cancercellerna är i detta fall färgade med kristallviolett.

### **Hollow fiber.**

Den blå halvtransparenta modifierade polyetersulfon-fibern från Spectrum Labs är ett semi-permeabelt membran, med 1mm innerdiameter och väggjocklek 100 $\mu$ m. Porerna med en genomsläpplighet för molekyler under 500 kDa är små nog för att cancercellerna skall stanna kvar i fibern men stora nog för att en antikropp (MW cirka 120 kDa) skall kunna diffundera in. Tidigare försök med Hollow fiber innehållande prolifererande cancerceller har gjorts där fibern har implanterats in i peritoneum eller subcutant hos möss för att studera effekt av kemoterapeutiska farmaka. Under dessa in vivo förhållanden har visats att cancerceller växer i och fyller ut fibern (0.5 mm diam) efter sju dagars odling. (37)

Vi har in vitro inte lyckats åstadkomma proliferation och utfyllnad av cancerceller i fibern som numera endast kan fås i diametern 1 mm trots att vi funnit två grupper som angett att de lyckats (38, 39).



**Figur 11.** Hollow Fibers i olika färger med ett lumen vars innerdiameter är 1mm som vi packar med OVCAR-3. Bild är tagen från Spectrumlabs.

Vi beslöt oss därför att acceptera att inte ha en fullödig tumörvävnadsmodell som skulle direkt kunna liknas vid tumörcellskluster utan istället skapa ett in vitro system avsett att kunna *jämföra relativt* penetration/diffusion av antikroppar, fragment av antikroppar med lägre molekylvikt ned till sk affibodies liksom sådana molekyler med olika affinitet till cellernas antigen/receptorer. Även penetrationen av dessa molekyler i olika koncentrationer liksom i sk tvåstegsförlopp, pretargeting (först liganden, konjugerad med ex streptavidin stor molekyl, senare radionukliden konjugerad till biotin, liten molekyl), skulle kunna studeras *relativt till varandra*. Vi beslöt oss därför att skapa en kompakt cellpellet i den semipermeable fibern.

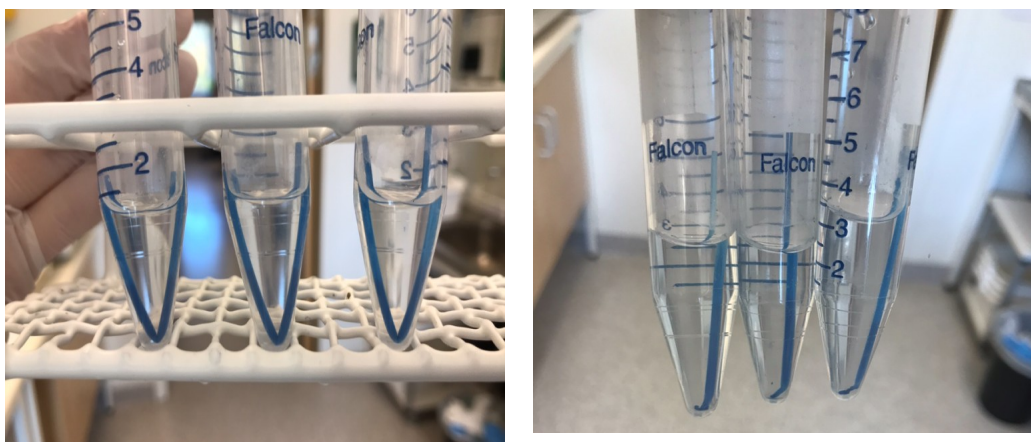
Man kan beräkna ungefär hur många celler som måste finnas i fibern för att de kompakterade skall ge upphov till exempelvis 5mm lång kompakterad cellpellet (cylinder) i fibern. Volymen

av denna cylinder blir enligt  $V = \pi \times r^2 \times h$  alltså cirka  $4 \text{ mm}^3$ . Om tumörcellens radie uppskattas till cirka  $7 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $7 \times 10^{-3} \text{ mm}$  blir cellens volym:

$\frac{4}{3} \times \pi \times (7 \times 10^{-3})^3$  dvs  $1.4 \times 10^{-6} \text{ mm}^3$ . Då behövs alltså 3 miljoner celler för att bilda 5mm kompakterade celler i fibern.

Om vi fyller en 50 mm lång fiber med 30  $\mu\text{l}$  av den täta cellsuspension (100.000 celler/ $\mu\text{l}$ ) vi fick i centrifugröret, se ovan, bör det efter centrifugering resultera i cirka en cirka 5 mm lång kompakterad cellcylinder

Vi har använt oss av en fin pipettspets (<1 mm diam) för att suga upp den täta cellsuspensionen från centrifugeringsröret som vi fyllt en 50 mm lång hollow fiber med. Initialt vick vi fibern på mitten så att den formar ett V. Då vi har haft svårigheter med att snitta den V-formade fibern, beslöt vi oss för att inte vika fibern utan smälta nedre änden så att öppningen försluts med hjälp av en upphettad pincett.



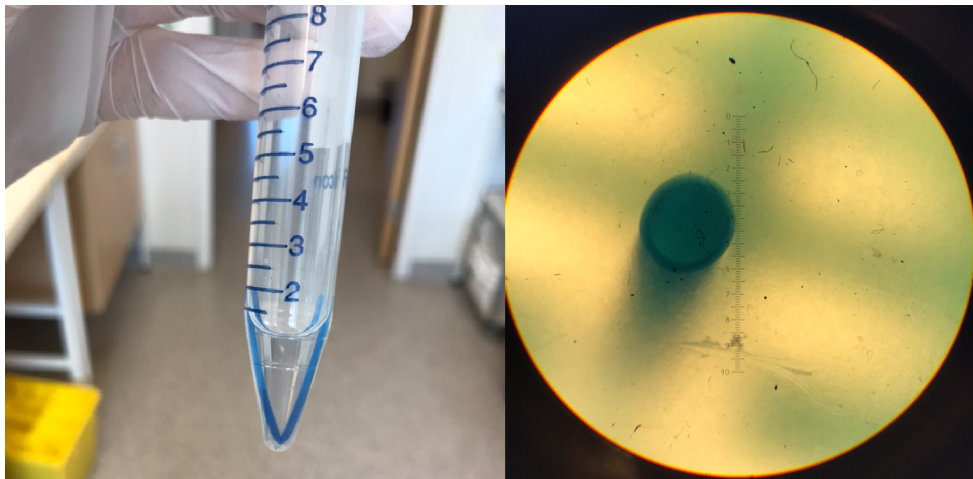
**Figur 12.** Tre nedsnurrade cellfyllda hollow fibrer. Bilden till vänster är hollow fibern dubbel vikt, formande ett V. Bilden till höger är när vi smält öppningen på nedre delen av hollow fibern och inte vikt den.

## Centrifugering.

Vi placerar fibern i ett rör med medium till samma höjd som nivån för cellsuspensionen i fibern för att förhindra att denna skall sprängas av centrifugalkraften. Centrifugröret med fibern placerar i centrifugen och snurras ner med 3500 rpm vilket motsvarar cirka 2800 g i 15 minuter. Därefter suger vi bort vattnet som omger fibern med en Pasteurpipett och tillför 5ml formalin för fixering i 24h.

Vi kontrollerade att den hoplödda fibern inte läckte genom att centrifugera på samma sätt som ovan med en kristallviolett lösning i fibern. Den omgivande vätskan färgades inte varför vi bedömde att tekniken borde fungera.

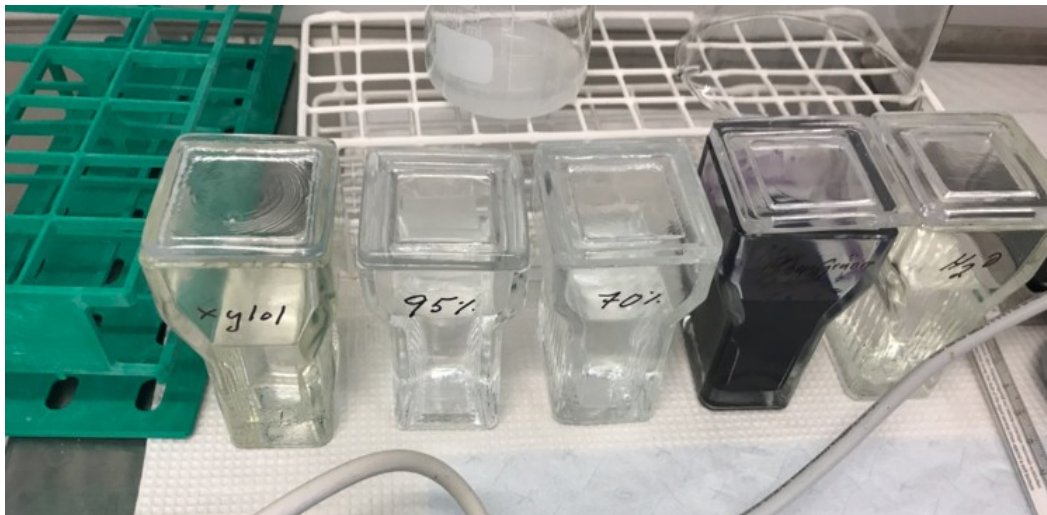
När vi har centrifugerat ner fibern fylld med cancerceller var det svårt att i den blå halvtransparenta fibern se till vilken nivå cellerna sedimenterat i fibern. Därför färgade vi i några försök in cellerna med kristallviolett som vi fyllt fibern med, centrifugerade som ovan, och kunde då se till vilken nivå cellerna befinner sig, vilket är essentiellt inför snittning av fibern. Utfallet överensstämde väl med beräkningarna, se ovan.



**Figur 13.** Bilden till vänster visar en tydlig nivå på var de infärgade cancercellerna befinner sig i fibern efter centrifugering. Bilden till höger visar när vi har snittat fibern till vänster horisontellt och placerat paraffinklotsen med fibern under mikroskop för direkt visualisering. Fibern är fylld.

## Dehydrering

Inför bäddning med paraffin som utgör stödet vid snittningen måste vi få bort allt vatten för att möjliggöra penetration av det hydrofoba paraffinet, metoden kallas dehydrering. Vi placerar fibern i 4 olika bad innehållande först vatten följt av 70% alkohol, 95% alkohol och sist Xylen. Vi har haft svårigheter att få paraffinet att tränga in i fibern inför snittning, därför har vi testat att ha fibern i de olika baden olika länge. Initialt 15 minuter, följt av 20 minuter, 30 minuter utan lyckat resultat inför snittning, det som visade bäst resultat var när fibern var i vardera bad i 1h.

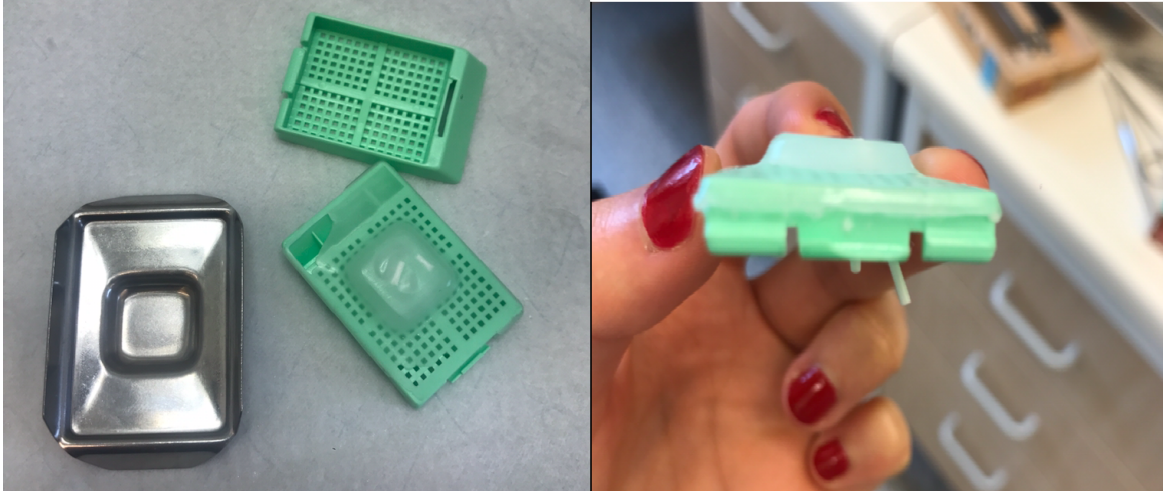


**Figur 14.** Bilden visar de olika baden med xylen, 95% alkohol, 70% alkohol, (rehydrering) kristallviolett inför färgning och vatten.

## Paraffinbäddning.

Vi placerar fibern vertikalt placerad genom hålen i den perforerade gröna kassetten, se Fig 15 nedan, som vi sedan placerar i en metallform med fiberspetsen mot metallformens botten. Mindre metallformar som ger mindre paraffinklotsar underlättar snittningen genom att ge mindre benägenhet till ihoprullning av det tunna snittet vid snittningen. Därefter håller vi paraffin över som smälts i 60<sup>0</sup> C. Vi låter det sedan stå smält i 1 timme för optimering av paraffininträngning i fibern. Har vi inte fibern i smält paraffin i 1 timme, har fibern inte

kommit med i snittet utan lossnat, endast paraffinsnittet med ett hål efter fibern kvarstår. Före snittningen lägger vi paraffinklotsen-kassetten på en frysplatta för stelning. När vi har lagt den paraffinbäddade kassetten i frysen istället för frysplatta har den spruckit.



**Figur 15.** Bilden till vänster visar metallformen som vi placerar den gröna kassetten i. Först placerar vi fibern stående i ett av hålen som vi sedan håller paraffin över. Bilden till höger visar slutresultatet av den stående fibern i stelnat paraffin.

### **Snittning/mikrotomen.**

Vi snittar klotsen med hjälp av en äldre slädmikrotom Microm HM 400, Fig. 16. Tjockleken på snitten har provats olika men valts till 10  $\mu\text{m}$ . Bredvid mikrotomen har vi ett vattenbad som vi placerar snitten i för att flyta ut samt is för nedkylning av klossen vilket minskar risken för att paraffinsnittet skall rulla ihop sig vid snittningen. Vi tar därefter upp de tunna snitten från vattenbadet och placerar dem på objektglas. Eftersom vi haft svårigheter att få till ett snitt av fibern fylld med celler har vi fått hjälp av en biomedicinsk analytiker, kunnig inom histoteknik som har snittat fibern med en modern rotationsmikrotom, detta gav oss bättre snitt av fibern och mindre benägenhet att fibern trycktes ihop. Vi har även testat att snitta tunnare vilket har resulterat att fibern inte kommit med i snittet.

Vi placerar objektglaset i ett 60<sup>0</sup> C värmeskap i 20 minuter för smältning av paraffin och för att snitten ska sitta fast inför färgning



**Figur 16.** Bilden visar den sladmikrotom vi använt för snittning av klotsen med den paraffininbäddade fibern.

### **Rehydrering/färgning**

För att få bort paraffinet från fibern placerar vi objektglaset i fyra olika bad innehållande först xylen följt av 95% alkohol, 70% alkohol, färgar med kristallviolett och sist sköljer med vatten. Vi har haft svårigheter med att få fibern att fästa på objektglaset efter de olika baden. Därför har vi gått ifrån att ha objektglaset stående vertikalt i 2 minuter i xylen och 1 minut i alkohol, till liggande i 30 sekunder i vardera bad. Vi har även testat att använda oss av ”coatade plus” objektglas för att motverka avlossning av fibern, men utan bättre resultat. Vi har även försökt att ”coata” objektglaset själva genom att doppa de i smält gelatinlösning, det visade att fibern satt kvar, dock blev det svårare att se snittet i mikroskop. Vi ändrade till 30 sekunder liggande i vardera bad och då blev majoriteten av de snittade fiberbitarna kvar och därför använde vi oss inte mer av gelatincoatade glas.





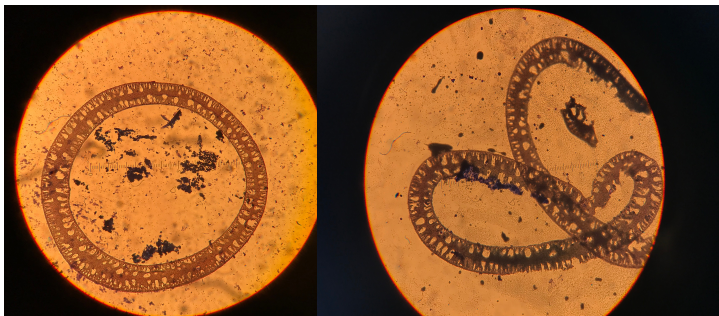
**Figur 17.** Bilden visar vår snittade fiber placerat på ett plus objektglas som skall färgas in för visualisering i mikroskop.

### **Montering.**

Montering görs för att preparatet skall kunna bevaras och sker genom att sätta en droppe monteringsmedium (Pertex) och lägga ett täckglas (0.16 mm) ovanpå. Objektiven på de flesta mikroskop är anpassade för täckglas av denna tjocklek.

### **Mikroskop.**

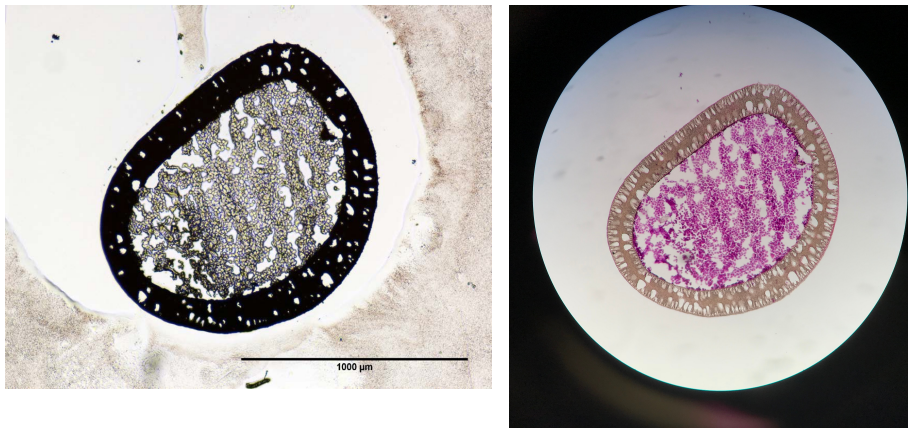
Vi betraktar sedan fibern i mikroskop (Zeiss) förstoringegrad 10x10 och 20x10.



**Figur 18.** Bilden till vänster visar en snittad rund fiber med få celler, snittad av en rotationsmikrotom. Fiber till höger visar en snittad fiber som har tryckts ihop och gått sönder, snittad av en slädmikrotom.

## Fryssnittning.

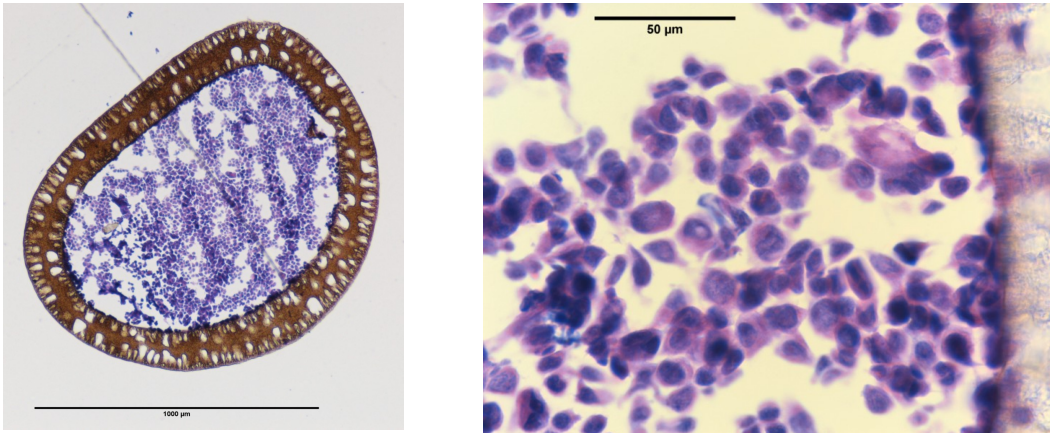
Vi har även tagit den nedsnurrade och V-vikta cellinnehållande fibern och placerat den i en plastform som vi fyllt med kryogel (Tissue Tek OCT) en frysgel innehållande vattenlösliga glykoler och hartser som bildar ett matrix runt fibern och ger en lämplig kryosnittning vid temperaturer på  $-10^{\circ}\text{C}$  och under. Fibern tillsammans med kryogelen har därefter placerats i frys för stelning för att därefter snittats med hjälp av en kryostat (ett mikrotom i ett frysskåp). Snitten placeras på ett objektglas som får lufttorka i rumstemperatur över natten, för att därefter färgas in med Hematoxylin-Eosin.



**Figur 19.** Bilden visar en med Ovar-3 celler fylld hollow fiber som stått i kryogel , bilden till vänster, och därefter snittats med ett kryostat och färgats med hematoxylin-eosin (Htx-Eosin)

## Resultat.

Det vi kommit fram till efter alla försök i olika varianter är en relativt fylld fiber med tumörceller. Att fibern inte är fullt packad med tumörceller kan bero på fixationsartefakter samt att tumörcellerna i fibern inte centrifugerats tillräckligt hårt.



**Figur 20.** Bilden till vänster visar en relativt välfylld hollow fiber med OVCAR-3 celler. Bilden till höger samma snitt i högre förstoring.

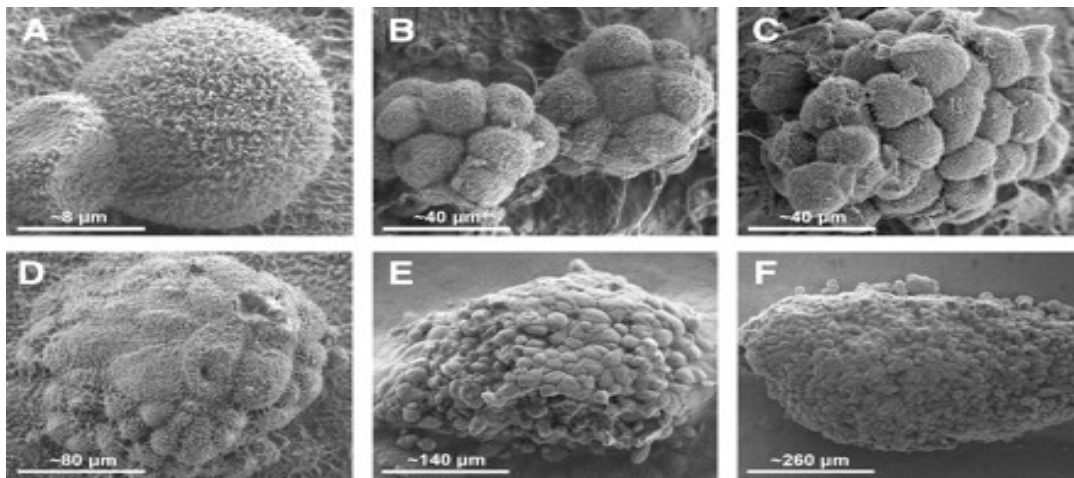
## Diskussion

Ovarialcancer är idag den mest maligna av gynekologiska cancrar varav uppemot 70% återfaller och dör.(40) Majoriteten dödsfall i cancer beror på att icke påvisade ockulta metastaser vid primärdiagnosen förbisågs eller otillräckligt adjuvant behandlades, för att så småningom tillväxa till manifest makroskopiska metastaser. Forskargruppen ”Targeted Alpha Therapy” har som mål att skapa en för ockult metastasering konform strålterapi. För detta utgör alfapartikel-strålningen en idealisk möjlighet då räckvidden av den tunga energirika partikeln är så kort, cirka 70 µm, varför nästan hela partikelns energi hamnar i den inmärkta tumörcellen och dess omedelbara närhet. Detta skiljer den från elektronerna från betastrålande isotoper, där den lätta, mindre energirika, elektronens räckvidd oftast är flera mm varför

energidepositionen i huvudsak hamnar utanför tumörcellerna som får alltför låg dos, utan istället i frisk vävnad med sidoeffekter som följd.

Dock finns ett problem med den korta räckvidden. Detta beror på att definitionen av ”ockult metastas” är allt det vi inte kunnat identifiera med vanliga diagnostiska metoder, dvs allt från enskilda celler upp till millimeter eller t.o.m. centimeterstora tumörcellskonglomerat.

Det är därför avgörande att kunna värdera hur djupt in i tumörvävnad som ligandkonjugatet kan penetrera. Om bindning endast sker på ytan kan endast mycket små tumörkluster, radien  $< 70 \mu\text{m}$  behandlas framgångsrikt. Elgqvist et al (31) har visat gradvis sämre behandlingsresultat med At-211-MX35 antikroppen om mössen med implanterad ovarialcancer behandlas med längre latens från implantationstillfället och där tumörcellsklustern gradvis blivit större ju längre denna latenstid varit, Fig. 21.



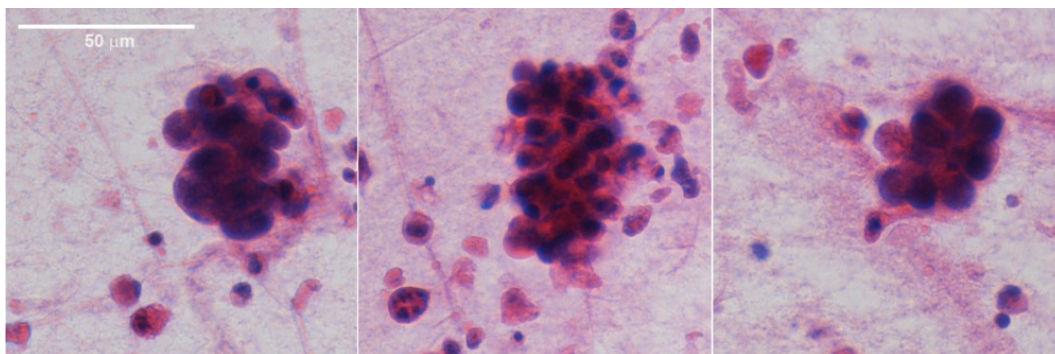
**Figur 21.** SEM bilder visar intraperitoneal tillväxt av ovarialcancer celler i mus, från enskilda celler till större tumörkluster. Panel A visar en enskild OVCAR-3 cell. Panel B-F visar på ökad storlek av tumörer beroende på intervall från implantationstillfället (B)1, (C)3, (D)4, (E)5 och (F) 7 veckor. Bilden är tagen från Jörgen Elgqvist Astatine-211 radioimmunotherapy of ovarian cancer.

Vi har i detta arbete påbörjat en metodutveckling för att *in vitro* kunna studera om vi kan modifiera våra radionuklidligander för att nå djupare in och att kunna jämföra dessa olika modifieringars betydelse.

Vi övervägde olika vägar att studera detta. En lockande väg var att skapa tumörcellssfäroider *in vitro* av tillräcklig storlek d.v.s. med en radie > 200  $\mu\text{m}$ . Ovarialcancer är en typ vars celler gärna vill bilda konglomerat och vara tillsammans där de bildar sfäroidkluster i olika storlek och form. Studier har visat att 3D sfäroider jämfört med 2D odling har en större resistens mot cytostatika.(41) Även fast vi tror oss ha skapat en 3D Hollow fiber behöver det inte vara säkert att den har samma egenskaper som en 3D sfäroid vilket skulle kunna ge oss olika resultat avseende penetrationsförmåga

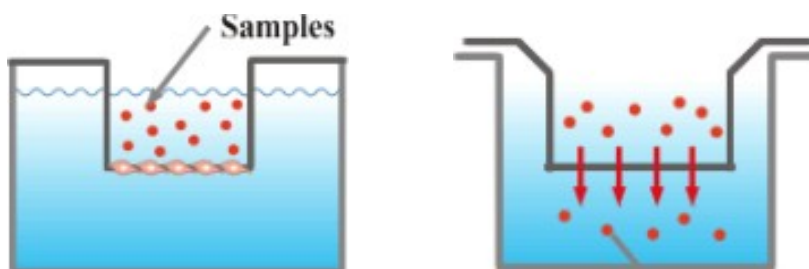
En av medarbetarna i gruppen började med detta men arbetet med att få fram reproducibla sfäroider av denna storlek var svårt och vi bedömde att detta inom ramen för vårt projekt inte var möjligt att genomföra då det krävs en heltidsforskning och resurser till det har vi inte.

Medarbetarna i Astatgruppen har också studerat de cellkluster som spontant uppkommer i bukhålan hos kvinnor med ovarialcancerorsakad ascites, Fig 22. Dessa kluster liknar dem vi också ser i våra musmodeller, dock är klustren oftast relativt små och mycket oregelbundna till formen vilket skulle omöjliggöra dem för vårt ändamål då det inte ger oss ett standardiserat svar med försök av antikroppspenetration.



**Figur 22.** Mikrotumörer från patient i utstryk från ascitestappning.

Om cancercellerna gick att odla i tjocka skikt på ett för antikroppar permeabelt membran, kunde man använda sig av en teknik där man tillförde radionuklidkonjugatet i mediet ”ovanför” cellmattan och sedan mätte hur snabbt det trängde ner till mediet beläget under det permeabla membranet, Fig. 23. Emellertid kan vi inte få Ovar-3 celler att bilda sådana tjocka skikt, så den vägen var inte framkomlig. Vi beslöt oss då att använda oss av sk hollow fibers.



**Figur 23.** Cancerceller odlade i botten där radionuklidkonjugat tillförs för att därefter kunna mäta hur snabbt de tränger nertill mediet beläget under det permeabla membranet.

Sammanfattningsvis ville vi skapa en modell som så nära som möjligt efterliknar mikrometastaserna i bukhålan vilket vi vill behandla. Dessa mikrometastaser är till stor del sfäroidformade och avaskulära med ett extracellulärt matrix som påverkar makromolekyler diffusion. Sfäroidmodellen kan tillverkas in vitro (41) alternativt att vi direkt tar clusters från bukhålan hos antingen patienten eller från ascites i möss. Problemet är dels att tillverkningen av denna sfäroidmodell kräver stora resurser, liksom hantering och snittning. Tar vi å andra sidan clusters från bukhålan är det oftast mycket luckra ofta sönderfallande strukturer som inte går att standardisera. Hade vi istället kunnat odla ut och fylla hollow fibern som tidigare studier gjort (37, 38) hade vi nått resultatet att ha reproducibilitet liksom också ett extracellulärt matrix och det är dit vi skall sträva genom att centrifugering av fibern nå en relativt hög cellkoncentration för att därefter se om vi kan få en cellproliferation som fyller ut fibern och dessutom ger extracellulärt matrix.

Varför vi inte lyckats fylla ut fibern kan bero på att den fiber som tidigare studier använt sig utav och som vi inte lyckats få tag på har en 0.5 mm i diameter, medan vår är 1 mm i diameter. Alltså gav deras fiber mycket bättre diffusionsförhållanden för syre, koldioxid samt näringstransport. Ytterligare använde de sig utav en orbital shaker som bidrog med ett kontinuerligt näringsflöde i fibern, vilket vi inte hade men som vi skall skaffa. (38) Andra studier med en hollow fiber på 0.5 mm som inte hade en orbital shaker använde sig istället utav en in vivo metod, där de direkt implanterade hollow fibern i mössen som gav goda tillväxtresultat. (37) Ett forskningsfält i sig är byggandet av organoider i antingen syntetiska scaffolds eller scaffolds framställda av biologiskt material där de cellulära komponenterna avlägsnats. (42)

En optimal modell hade därför varit att efterlikna ovanstående in vitro metod så att djur inte behöver offras, den skall vara enkel och reproducibel helst simulerande ett avaskulärt tumörkluster som patienten har från vilka recidiven uppstår. Dock behöver vi inte nödvändigtvis nå det målet utan snarare en modell där vi kan studera penetrationsskillnader mellan olika vektorer, inte absolutkvantifiera penetrationen.

Projektets svagheter och begränsningar har varit att vi inte hade tillräckligt med resurser för att exempelvis odla fram sfäroider. Vi hade inte tillräckligt med material som en orbital shaker för att ge optimala näringsförhållanden i hollow fibern för cellproliferation. Vi hade primitiv utrustning där modernare mikrotom skulle ha underlättat snittning av fibern. Ytterligare hade vi inte tillräckligt med tid för att kunna utveckla och slutföra en sådan avancerad metod.

## **Etik.**

Vid utveckling av nya cancerbehandlingar brukar dessa alltid först prövas på patienter med avancerad sjukdom där effekten av behandlingen kan påvisas med hjälp av ex datortomografi, magnetresonanstomografi eller positronemissionstomografi. Om goda effekter påvisas hos patienter med avancerad cancer går man vidare och studerar patienter som statistiskt har stor risk att ha mikroskopisk spridning, adjuvant terapi. Om dessa i randomiserade studier visar sig få en bättre överlevnad än kontrollgruppen, etableras behandlingen som standardterapi för sådana patienter.

Vid behandling av mikroskopisk, eller ockult cancer, som alfaradioterapi riktar sig mot, kan definitionsmässigt sådan värdering inte göras utan effekten kan endast bedömas som en eventuell fördröjning eller förhindrande av återfall. Detta gör också att man inte med säkerhet vet om patienten överhuvudtaget har en mikroskopisk spridning och därmed behöver ett behandlingstillägg eller inte.

Av etiska skäl är det därför oerhört angeläget att minimera riskerna för dessa patienter där vi alltså inte med säkerhet kan säga om de behöver den experimentella terapin.

Då behandling med alfapartikelstrålning inte använts inom onkologin för patienter med potentiell långtidsöverlevnad och eventuella risker ännu inte är helt klarlagda har det varit angeläget att studera tekniken på en patientgrupp som dels i flertalet fall inte överlever efter enbart konventionell terapi och dels förväntas ge minimal risk för systemisk biverkan, dvs att vi kan ge behandlingen lokalt i bukhålan med liten risk för bl.a. benmärgspåverkan.

Det är naturligtvis också angeläget att ha så god kunskap om behandlingens potentiella möjligheter genom prekliniska studier, vari detta projekt utgör en liten men viktig del, då det avser att kunna belysa möjligheten att behandla tumörkluster av olika storlek.



Av etiska, praktiska, och ekonomiska skäl ville vi utveckla en *in vitro teknik*, annars hade vi sannolikt kunnat få en god tumörtillväxt med utfyllande av fibern om denna med tumörcellssuspensionen fått tillväxa intraperitonealt alt subcutan hos möss varpå fibern tagits ut och penetrationsförsöken gjorts

## **Konklusion och Betydelse**

Vårt ursprungliga mål var att skapa en intakt tillväxande tumöreylinder i ”hollow fibers” som beskrivits i litteraturen och därefter med hjälp av immunohistokemi bestämma hur djupt en antikropp har penetrerat.(37, 43). Om vi använde Astatmärkt antikropp skulle man med alphakamera kunna visa hur djupt in alphapartiklarna frisätts. (44) En tredje endpoint är att immunhistokemiskt påvisa hur djupt in man kan se dubbelsträngsbrott,  $\gamma$ H2AX. (45)

Då vi trots upprepade försök inte lyckats odla celler utfyllande fibern beslöt vi oss för att acceptera en modell som *kvantitativt inte kan överföras till intakt tumör, men som kan användas för att studera relativa skillnader i djuppenetration med ovanstående endpoints.*

Denna modell utgöres alltså av kompakterade celler i ”hollow fiber”.

Arbetet har inneburit åtskillig metodutveckling med inhämtande av basal cellodlingsteknik och konventionell histoteknik, där vi ännu inte fullt ut nått målet att reproducibelt kunna etablera en komplett utfylld fiber med kompakterade celler. Vi kommer att pröva med celler suspenderade i ett medium av extracellulärt matrix, liksom pröva olika grad av centrifugering, fixering liksom kryosnittning.

Lyckas vi skapa en metod för att mäta hur djupt in i en mikrometastas vektorn för den alfastrålande nukliden d.v.s. antikroppen eventuellt modifierad avseende storlek och affinitet

etc. kan penetrera, kan vi bättre förutse hur stora cellkluster i bukhålan som med framgång kan behandlas.

## **Populärvetenskaplig sammanfattning.**

I Sverige dör årligen cirka 500 kvinnor i äggstockscancer. Dessa har behandlats med kirurgi och cellgiftsbehandling men återfaller då icke synbara cancerceller otillräckligt behandlades, för att tillväxa till en synbar spridd cancer, makrometasaser. Nya behandlingsmetoder behövs.

Försök med strålterapi, liksom cellgifter eller injektion av radioaktiva isotoper direkt in i bukhålan har gjorts, men dessa behandlingsmetoder är antingen ineffektiva eller förenade med så mycket biverkningar att de inte kommit till användning.

Radioimmunoterapi innebär att man kopplar en radioaktiv isotop till en antikropp, ett protein som specifikt binder till vissa molekyler på cellytan. Goda resultat har visats på större makrotumörer med elektronstrålande radioimmunoterapi som har en räckvidd på flera mm, men inte på små tumörer, mikrotumörer. Till följd av den långa räckvidden kommer den absorberande dosen till mikrometastaserna att vara för låg och dosen till normalvävnaden för hög.

Targeted Alpha Therapy (TAT) group har fokuserat på radioimmunoterapi av mikrometastaser baserad på användningen av en isotop som sönderfaller och utsänder heliumkärnor med extrem energi och kort räckvidd, ca 70 µm, en s.k. alfapartikel, varför nästan hela partikelns energi hamnar i tumörcellen och dess omedelbara närhet utan att skada normalvävnaden.

”Ockult, osynlig, metastas” är allt det vi inte kunnat identifiera, dvs allt från enskilda celler upp till många millimeter stora tumörcellskonglomerat.

Därför är det viktigt att veta hur djupt in i en tumörcellsvävnad antikroppen med den alfasönderfallande isotopen kan penetrera. Vi har försökt utveckla en metod som möjliggör undersökning av penetration av en antikropp in i ett experimentellt litet tumörcellskluster. Detta har stor betydelse i samband med alfaradioimmunoterapi av små mikrotumörer i bukhålan då dessa kan vara större än alfapartikelns räckvidd, 70 µm. Kommer antikroppen endast binda till de yttligaste cellerna, kan vi inte behandla mikrometastaser med radien större än 70 µm.

Jag har använt mig av ett 1 mm i diameter rör (hollow fiber) med en vägg tjocklek av 0.1 mm som är genomsläppligt för stora molekyler som antikroppar. Till en cirka 5 cm lång sådan fiber har tillsatts en blandning av äggstockscancer celler, Ovc3-3.

Denna ”fiber” har förslutits i ena änden, lagts i ett centrifugrör med vatten och centrifugerats vid 2800 g under 15 minuter. I ”fibers” nedre del har då bildats en kompakt cellcylinder några millimeters lång. Fibern har genomgått olika steg inför snittning. Alternativt har ”fibern” efter centrifugeringen bäddats i frysgel och fryssnittats. Infärgning av snitten gjordes för synliggörande av cellerna.

Jag har inte lyckats fullt ut att få cellerna tillräckligt kompakterade för att simulera en ”mikrometastas”, men när detta är gjort kan fibern med den kompakterade cellcylindern exponeras för en antikroppslösning, varpå man i snitt med infärgningsmetoder kan analysera hur djupt antikroppen penetrerat. Man kan då studera penetrationsförmåga hos antikroppar med exempelvis olika storlek och bindningsförmåga till cellyteprotein, antigen. Naturligtvis kan det absoluta inträngningsdjupet inte bestämmas för en verklig tumör men relativa skillnader bör kunna påvisas.

Lyckas vi skapa en metod för att mäta hur djupt in i en mikrometastas antikroppen, vektorn för den alfastrålande isotopen, eventuellt modifierad avseende storlek och bindningsförmåga

kan penetrera, så kan vi bättre förutse hur stora tumörklusters som är möjliga att framgångsrikt behandla.

## **Tack**

Ett Stort Tack till min handledare Ragnar Hultborn som både stöttat och hjälpt mig under hela arbetets gång. Vill även Tacka Ulla Delle, labingenjör och Susanne El hamwi, Biomedicinsk analytiker som hjälpt mig med det prekliniska arbetet och histoteknik. Sist men inte minst ett stort tack till forskaren Tom Bäck för det resultat med kryosnittning du hjälpt oss att åstadkomma.

## Referenser.

1. Cancerfonden. Cancer i siffror 2015 [Available from: <https://www.cancerfonden.se/publikationer/cancer-i-siffror>.
2. samverkan Rci. Nationellt vårdprogram bröstcancer 2017 [Available from: <http://www.cancercentrum.se/samverkan/cancerdiagnoser/brost/vardprogram/>.
3. samverkan Rci. Nationellt vårdprogram tjock- och ändtarmscancer 2016 [Available from: <http://www.cancercentrum.se/samverkan/cancerdiagnoser/tjocktarm-andtarm-och-anal/tjock--och-andtarm/vardprogram/>.
4. Peto R, Davies C, Godwin J, Gray R, Pan HC, Clarke M, et al. Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analysis of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials. *Lancet* (London, England). 2012;379(9814):432-44.
5. Runnebaum IB, Stickeler E. Epidemiological and molecular aspects of ovarian cancer risk. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2001;127(2):73-9.
6. Åkeson M. Clinical outcome and prognostic factors in borderline ovarian tumors and invasive ovarian carcinomas in western Sweden. 1 ed: Geson Hylte Tryck, Gothenburg; 2008.
7. Regionalt Cancercentrum Syd. Äggstockscancer 2017 [Available from: <http://www.cancercentrum.se/syd/cancerdiagnoser/gynekologi/kvalitetsregister/statistik/aggstock/>.
8. Andrew Berchuck MmM, Richard Barakat FACS. *Gynecologic oncology*. 6th ed: LWW; 2013.
9. Armstrong DK. *Relapsed Ovarian Cancer: Challenges and Management Strategies of Chronic Disease 2002*.
10. Ovarian cancer Research Fund Alliance. Recurrence 2017 [Available from: <https://ocrfa.org/patients/about-ovarian-cancer/recurrence/>.
11. Cancer Schmancer Movement. Ten Warning Signs of Ovarian Cancer | The Silent Killer 2017 [Available from: <http://www.cancerschmancer.org/articles/ten-warning-signs-ovarian-cancer-silent-killer>.
12. samverkan Rci. Nationellt vårdprogram äggstockscancer 2017 [Available from: <http://www.cancercentrum.se/samverkan/cancerdiagnoser/gynekologi/aggstock/vardprogram/>.
13. Binyamin S, Segev Y, Auslender R, Bitterman A, Lavie O. [INTRAVENOUS CHEMOTHERAPY VERSUS INTRAPERITONEAL CHEMOTHERAPY IN ADVANCED OVARIAN CANCER: UPDATE ON THE SITUATION WORLDWIDE AND IN ISRAEL]. *Harefuah*. 2015;154(9):594-8, 607, 6.
14. Sorbe B. Consolidation treatment of advanced ovarian carcinoma with radiotherapy after induction chemotherapy. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2003;13 Suppl 2:192-5.
15. Peters WA, 3rd, Smith MR, Cain JM, Lee RB, Yon JL, Jr. Intraperitoneal P-32 is not an effective consolidation therapy after a negative second-look laparotomy for epithelial carcinoma of the ovary. *Gynecologic oncology*. 1992;47(2):146-9.
16. Hultborn R. *Konform Strålterapi*. 2011;5:66-71.
17. Lahaie YM, Watier H. Contribution of physiologists to the identification of the humoral component of immunity in the 19th century. *mAbs*. 2017;9(5):774-80.

18. Nobelprize.org. George de Hevesy - Biographical 2017 [Available from: [https://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1943/hevesy-bio.html](https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1943/hevesy-bio.html).
19. Winner KK, Steinkamp MP, Lee RJ, Swat M, Muller CY, Moses ME, et al. Spatial Modeling of Drug Delivery Routes for Treatment of Disseminated Ovarian Cancer. *Cancer Res.* 2016;76(6):1320-34.
20. Flessner MF, Dedrick RL. Tissue-level transport mechanisms of intraperitoneally-administered monoclonal antibodies. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society.* 1998;53(1-3):69-75.
21. MattesMJ, LookK, FurukawaK, PierceVK, OldLJ, LewisJL, Jr., et al. Mouse monoclonal antibodies to human epithelial differentiation antigens expressed on the surface of ovarian carcinoma ascites cells. *Cancer Res.* 1987;47(24 Pt 1):6741-50.
22. AnderssonH, CederkrantzE, BackT, DivgiC, ElgqvistJ, HimmelmanJ, et al. Intraperitoneal alpha-particle radioimmunotherapy of ovarian cancer patients: pharmacokinetics and dosimetry of (211)At-MX35 F(ab')<sub>2</sub>-a phase I study. *J Nucl Med.* 2009;50(7):1153-60.
23. Yin BW, Kiyamova R, Chua R, Caballero OL, Gout I, Gryshkova V, et al. Monoclonal antibody MX35 detects the membrane transporter NaPi2b (SLC34A2) in human carcinomas. *Cancer immunity.* 2008;8:3.
24. Sten Carlsson S-ES. *Nuklearmedicin: Skälery och Sibbamåla*; 2007.
25. DeNardo GL, DeNardo SJ, Lamborn KR, Goldstein DS, Levy NB, Lewis JP, et al. Low-dose, fractionated radioimmunotherapy for B-cell malignancies using 131I-Lym-1 antibody. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals.* 1998;13(4):239-54.
26. Jacobs AJ, Fer M, Su FM, Breitz H, Thompson J, Goodgold H, et al. A phase I trial of a rhenium 186-labeled monoclonal antibody administered intraperitoneally in ovarian carcinoma: toxicity and clinical response. *Obstetrics and gynecology.* 1993;82(4 Pt 1):586-93.
27. Crippa F, Bolis G, Seregini E, Gavoni N, Scarfone G, Ferraris C, et al. Single-dose intraperitoneal radioimmunotherapy with the murine monoclonal antibody I-131 MOv18: clinical results in patients with minimal residual disease of ovarian cancer. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990).* 1995;31a(5):686-90.
28. Oei AL, Verheijen RH, Seiden MV, Benigno BB, Lopes A, Soper JT, et al. Decreased intraperitoneal disease recurrence in epithelial ovarian cancer patients receiving intraperitoneal consolidation treatment with yttrium-90-labeled murine HMFG1 without improvement in overall survival. *International journal of cancer.* 2007;120(12):2710-4.
29. Verheijen RH, Massuger LF, Benigno BB, Epenetos AA, Lopes A, Soper JT, et al. Phase III trial of intraperitoneal therapy with yttrium-90-labeled HMFG1 murine monoclonal antibody in patients with epithelial ovarian cancer after a surgically defined complete remission. *J Clin Oncol.* 2006;24(4):571-8.
30. Mahe MA, Fumoleau P, Fabbro M, Guastalla JP, Faurous P, Chauvot P, et al. A phase II study of intraperitoneal radioimmunotherapy with iodine-131-labeled monoclonal antibody OC-125 in patients with residual ovarian carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 1999;5(10 Suppl):3249s-53s.
31. Elgqvist J. *Astatine-211 Radioimmunotherapy Of Ovarian Cancer 2006 sfsdf*
32. Targeted alpha therapy group. 2014 [Available from: <http://tat.gu.se/svenska>.
33. Elgqvist J, Andersson H, Bernhardt P, Back T, Claesson I, Hultborn R, et al. Administered activity and metastatic cure probability during radioimmunotherapy of ovarian cancer in nude mice with 211At-MX35 F(ab')<sub>2</sub>. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006;66(4):1228-37.

34. Elgqvist J, Andersson H, Back T, Hultborn R, Jensen H, Karlsson B, et al. Therapeutic efficacy and tumor dose estimations in radioimmunotherapy of intraperitoneally growing OVCAR-3 cells in nude mice with (211)At-labeled monoclonal antibody MX35. *J Nucl Med.* 2005;46(11):1907-15.
35. Cederkrantz E, Angenete E, Back T, Falk P, Haraldsson B, Ivarsson ML, et al. Evaluation of effects on the peritoneum after intraperitoneal alpha-radioimmunotherapy with (211)At. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals.* 2012;27(6):353-64.
36. Palm S, Back TA, Lindegren S, Hultborn R, Jacobsson L, Albertsson P. Model of intraperitoneal targeted alpha-particle therapy shows post-therapy cold antibody boost (PT-CAB) enhances microtumor radiation dose and treatable tumor sizes. *J Nucl Med.* 2017.
37. Mi Q, Pezzuto JM, Farnsworth NR, Wani MC, Kinghorn AD, Swanson SM. Use of the in vivo hollow fiber assay in natural products anticancer drug discovery. *J Nat Prod.* 2009;72(3):573-80.
38. Casciari JJ, Hollingshead MG, Alley MC, Mayo JG, Malspeis L, Miyauchi S, et al. Growth and chemotherapeutic response of cells in a hollow-fiber in vitro solid tumor model. *Journal of the National Cancer Institute.* 1994;86(24):1846-52.
39. Hassan SB, de la Torre M, Nygren P, Karlsson MO, Larsson R, Jonsson E. A hollow fiber model for in vitro studies of cytotoxic compounds: activity of the cyanoguanidine CHS 828. *Anti-cancer drugs.* 2001;12(1):33-42.
40. Ovarian Cancer Research Fund Alliance. Recurrence 2016 [Available from: <https://ocrfa.org/patients/about-ovarian-cancer/recurrence/>].
41. Raghavan S, Ward MR, Rowley KR, Wold RM, Takayama S, Buckanovich RJ, et al. Formation of stable small cell number three-dimensional ovarian cancer spheroids using hanging drop arrays for preclinical drug sensitivity assays. *Gynecologic oncology.* 2015;138(1):181-9.
42. Ong SM, Zhao Z, Arooz T, Zhao D, Zhang S, Du T, et al. Engineering a scaffold-free 3D tumor model for in vitro drug penetration studies. *Biomaterials.* 2010;31(6):1180-90.
43. Howat WJ, Lewis A, Jones P, Kampf C, Ponten F, van der Loos CM, et al. Antibody validation of immunohistochemistry for biomarker discovery: recommendations of a consortium of academic and pharmaceutical based histopathology researchers. *Methods (San Diego, Calif).* 2014;70(1):34-8.
44. Back T, Jacobsson L. The alpha-camera: a quantitative digital autoradiography technique using a charge-coupled device for ex vivo high-resolution bioimaging of alpha-particles. *J Nucl Med.* 2010;51(10):1616-23.
45. Kuo LJ, Yang LX. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. In vivo (Athens, Greece). 2008;22(3):305-9.