

Studien har tagits fram med stöd av Jordbruksverket

## Förbättrade metoder för undersökningar av effekter av cancerläkemedel

**Stig Linder, Karolinska Institutet**

### **Method for determining apoptosis in 3-D tumor spheroids**

We have been working with the aim of developing 3-D *in vitro* models to be used in drug development in oncology. Previous work showed that *ex vivo* tumor slices could be used to determine the effects of drugs in human tumor tissue (1). The project has been performed at the Cancer Center Karolinska and in collaboration with the Dr Margarethe Fisher-Bosch Institute in Stuttgart.

The *ex vivo* tumor slice system could not be used to determine drug screening, simply because not sufficient number of slices could be generated and also due to tumor heterogeneity. We therefore have developed a method of generating 3-D spheroids in wells of 96-well plates that shows excellent reproducibility and can be used for screening. Apoptosis was measured as accumulation of caspase-cleaved cytokeratin-18 (CK18-Asp396) using the M30-Apoptosense® ELISA (PEVIVA AB, Bromma, Sweden). This work has been published (2).

### **Drug screening**

The spheroid screening method has been used in a number of projects in the laboratory.

(i) the alkaloid thaspine (from the bark of a South American tree) was found to be effective on tumor spheroids. We demonstrated that thaspine is a dual topoisomerase inhibitor (3).

(ii) acriflavine was identified in a screen for compounds effective on primary colon carcinoma cells (Hassan et al., manuscript). Similar to thaspine, acriflavine was also found to be a topoisomerase inhibitor. Acriflavine is more effective than conventional drugs on tumor spheroids.

### **Measuring tumor apoptosis in blood samples**

Tumor response in animal experiments are measured as reduction in tumor size. Size measurements are much more difficult in clinical studies (particularly in patients with advanced disease that have multiple metastases).

We have developed a method to measure apoptosis/cell death using blood samples (1, 4). The method is based on the M30-Apoptosense® ELISA. This method is used by pharma companies in phase I/II studies to determine drug efficiency. To facilitate translational studies, we have examined the possibilities to use the M30-Apoptosense® ELISA to measure tumor apoptosis in human xenografts in SCID mice. We demonstrated that the antibodies used in the M30-Apoptosense® ELISA do not recognize mouse or rat CK18 (5). Our "serum apoptosis method" is therefore specific for tumor apoptosis in mice carrying human tumor xenografts. The system is therefore an ideal tool for translational studies.

Continuous efforts are being carried out studying tumor apoptosis in clinical settings. We are working with different clinicians in Sweden, Austria, Japan and other places.

## **PET studies**

In addition to the blood biomarker studies, efforts have been initiated attempting to measure apoptosis *in vivo* using PET. The work is conducted in collaboration with Elias Arnér and Sharon Stone-Elander, KI.

## **Toxicology**

A major source of CK18 in the body is the liver. We are interested in determining whether our CK18 biomarkers can be used to measure liver toxicity in rodent and in humans. Preliminary evidence suggests that this is so.

## **Bestämning av tumörcellöd i provrörsförsök.**

Trots mycket stora forskningsinsatser har cancerbehandlingsresultaten inte radikalt förbättrats. Sjukdomar som melanom och bukspottskörtelcancer är mycket svåra att behandla och patienter med spridd sjukdom (metastaser) har oftast kort tid att leva. Det är av utomordentligt stor vikt att förbättrade cancerläkemedel utvecklas. För detta krävs bl.a. effektiva testmetoder. Det är idag relativt vanligt att substanser som funnit avdöda cancerceller i provrörsförsök testas direkt i möss. Vid provrörsförsöken används s.k. tumörcellslinjer som odlas i plastskålar. Även om detta är bekvämt så överensstämmer förhållande i plastskålarna mycket dåligt med de förhållanden som råder i tumörer. Celler som har förmåga att växa på plast är ofta förändrade och inte bra modeller för tumörceller från patienter.

För att utveckla en bättre testmetodik har vi arbetat med tumörvävnad som korttidsodlats i kultur. Tumörvävnaden har erhållits från mustumörer eller från cancerpatienter. Tumörpreparaten innehåller olika typer av celler som inte har selekterats för att växa på plast. Vi får därmed en situation som är mycket med "tumörlik".

Vi har även arbetat med att rekonstituera 3-D tumörvävnad från cellinjer (s.k. sfäroider). Fördelen med denna metod är att dess större reproducerbarhet. Vi har visat att sådan 3-D vävnad går att använda för drugscreening.

Ur djurskyddssynpunkt är vinsterna med våra metoder följande:

- (i) en tumör ger 20-40 olika preparat som kan behandlas med olika läkemedel (en mus kan alltså ge lika mycket data som 20-40 möss);
- (ii) musen behandlas inte med giftiga substanser utan enbart vävnadspreparaten.
- (iii) vi kan undvika att testa substanser i möss som visats sakna effekter i 3-D odlingar. Vi har funnit exempel på substanser med mycket god effekt på 2-D odlade celler som är fullständigt verkningslösa på 3-D kulturer. Sådana substanser är meningslösa att testa i djurförsök.