



Plastik træner immunforsvaret mod kræft

Anne Hansen, NanoDTU

Niels B. Larsen, Institut for Mikro- og Nanoteknologi

Kræft er en alvorlig sygdom, som hvert år slår mange tusinde danskere ihjel. I håbet om at udvikle en bedre behandling arbejder læger og forskere sammen om at udvikle en vaccine mod kræft. Vaccinen, der i dag bruges som forsøgsbehandling, aktiverer patientens eget immunforsvar til at gå i kamp mod kræftcellerne. Desværre er vaccinen dyr at fremstille og endnu ikke effektiv nok. Ved hjælp af nanoteknologi forsøger forskerne at lave en værkstøjskasse med teknikker og udstyr i billigt plastik, som kan bruges til en bedre og hurtigere fremstillingsmetode af en vaccine mod kræft.

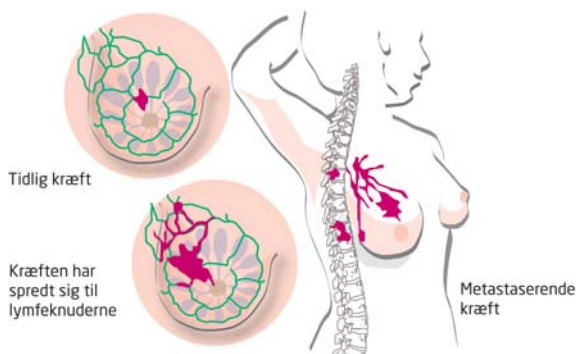
Hvert år får næsten 35.000 danskere besked af lægen om, at de har kræft, og mere end 15.000 mennesker dør af kræft hvert år. 230.000 danskere levede pr. 31. december 2003 med en kræftdiagnose, hvilket svarer til mere end 4 % af den danske befolkning. Tallene viser tydeligt, at kræft er en sygdom, som berører rigtigt mange danskere. De menneskelige konsekvenser er store, ikke blot for kræftpatienterne selv, men også for deres pårørende, når patienterne skal igennem lange, hårde sygdomsforløb og behandlinger og i sidste ende måske dør af den alvorlige sygdom. De kræftbehandlinger, der findes i dag, er nemlig i mange tilfælde slet ikke gode nok. Det gælder blandt andet for behandlingen af brystkræft og lungekræft.

Kræft

Hvis et organ eller væv får brug for nye celler, begynder umodne celler at dele og *differentiere* sig, det vil sige at udvikle sig til højt specialiserede celler, eksempelvis lever- eller hudceller. Kontrollen med cellernes deling og differentiering er streng. Kun der, hvor der er behov, aktiveres cellerne. Kontrollørerne er proteiner, der fungerer som en slags kontakter, der tænder og slukker for celledelingen. Kontrollen kan imidlertid svigte, hvis der sker mutationer i de gener, som koder for proteinerne. En mutation kan enten skabe et *hyperaktivt* gen, så der laves for meget af det protein, der aktiverer celledelingen, eller mutationen kan 'slukke' for genet, så det bliver *inaktivt*, og det protein, der normalt undertrykker celledelingen, forsvinder. Men selv om kontrollen med celledelingen svigter, op-

står der ikke nødvendigvis kræft. En kontrolmekanisme sørger nemlig for, at beskadigede celler begår selvmord (*apoptose*). Celledød er således lige så vigtig som celledeling for cellernes funktion og dermed kroppens sundhed. Hvis begge kontrolmekanismer derimod svigter, bliver cellerne udødelige, og celledelingen kan ske helt uhæmmet. Kræft opstår altså, når 1) kontrollen med celledelingen svigter, og 2) der sker fejl i de beskadigede cellers selvmordsmekanisme, så de bliver udødelige. Kræften bliver for alvor farlig, når en tredje kontrolmekanisme også svigter, nemlig den, der sørger for, at celler ikke vandrer rundt i kroppen, men bliver i det væv eller organ, hvor de hører hjemme. Så kan kræftcellerne sprede sig til andre steder i kroppen og danne nye svulster (*metastaser*) (figur 1). Når kræftcellerne metastaserer – altså spreder sig – bliver det meget sværere at behandle kræften.

Figur 1. Kræften har spredt sig til andre steder i kroppen og dannet nye svulster (metastaser).



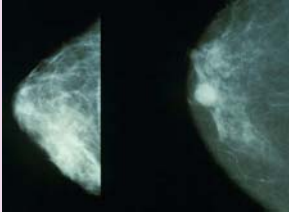
Behandling af kræft

Kræftpatienter tilbydes i dag primært tre typer behandling – kirurgi (operation), strålebehandling og medicinsk behandling – enten alene eller i kombination. Patienter, der har været igennem en operation, får ofte efterfølgende strålebehandling eller medicinsk behandling for at nedsætte risikoen for metastaser andre steder i kroppen. Desværre er det langt fra altid, at behandlingen virker, og især strålebehandling og kræftmedicin har alvorlige bivirkninger. Derfor bruges der milliarder af kroner på kræftforskning, og forskere over hele verden arbejder hårdt på at udvikle nye og bedre behandlinger. Et af de 'hott' forskningsområder er udviklingen af metoder, der lærer patientens eget immunforsvar at genkende og dræbe bestemte typer kræft. Det kaldes for immunterapi og virker i princippet på samme måde som de vacciner, vi alle sammen får, når vi skal ud at rejse eller som små bliver vaccineret mod børnesygdomme.

På Herlev Hospital tilbydes kvinder med alvorlig brystkræft (*boks 1*) som forsøgsbehandling en vaccination imod kræft. Håbet er at lære kroppens immunforsvar at genkende kræftcellerne som fjender, så de angriber og dræber dem. Behandlingen kaldes for immunterapi eller *dendritcellevaccination* og har vist lovende resultater. Endnu er vaccinationen dog kun en forsøgsbehandling, og en række problemer skal løses, før terapien bliver standardsupplement til den øvrige kræftbehandling. Forskerne har udviklet en værktøjskasse med nanoteknologiske teknikker og materialer, som kan bruges til at

automatisere fremstillingen af dendritcellevaccinen samt på andre måder forbedre den. Dette kapitel handler om udviklingen af vaccinen. Men først skal vi se lidt på principperne bag kræftvacciner.

Boks 1. Brystkræft



Figur 2. Mammografi (røntgenundersøgelse) af brystvæv. Til venstre ses et normalt bryst, mens der er fundet kræft i brystet til højre.

Brystkræft er den mest almindelige form for kræft hos danske kvinder. Hvert år får cirka 4.000 kvinder konstateret brystkræft, og i gennemsnit rammes hver 9. kvinde af brystkræft. Kræften opstår i mælkekirtlerne

og -gange og er meget alvorlig, fordi den kan sprede sig gennem *lymfesystemet* til lever, lunger og andre organer. Behandlingen af brystkræft er næsten altid en operation, hvor hele eller dele af brystet fjernes ofte efterfulgt af strålebehandling eller medicin for at mindske risikoen for tilbagefald.

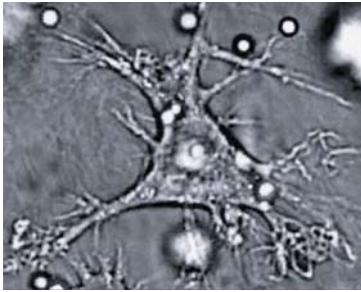
Udviklingen af en vaccine mod kræft

I 1900 foreslog den tyske læge og nobelprismodtager Paul Ehrlich, at molekyler, som reagerer med *tumorer*, kan bruges i kræftbehandling. Hans ide var, at kemiske stoffer kan fungere som 'anti-giftstoffer', der binder til og neutraliserer fremmede, sygdomsfremkaldende organismer. Derved forudsagde han faktisk en type kræftbehandling – passiv immunterapi, som dog først blev taget i brug i 1982. Passiv immunterapi forlænger patientens levetid og forbedrer livskvaliteten, men helbreder desværre ikke. Det skyldes, at passiv immunterapi kun vækker det uspecifikke immunforsvar, mens det specifikke immunforsvar, som er nødvendigt, hvis en kræftvaccination skal være effektiv, ikke aktiveres.

Dendritceller og T-celler

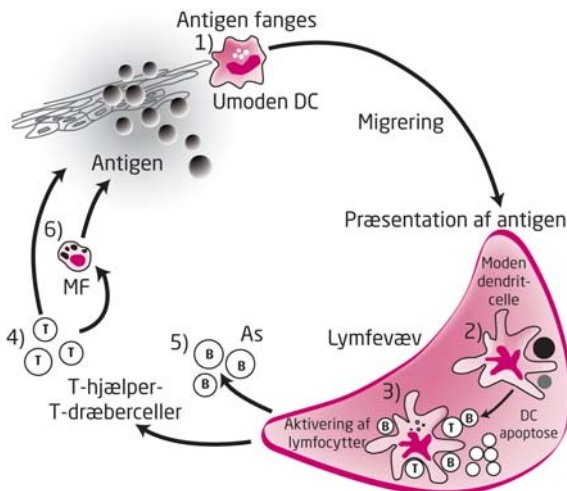
Immunforsvaret består af en række forskellige typer hvide blodceller, der cirkulerer rundt i kroppen via blodet og lymfesystemet. Blandt de hvide blodceller er B-cellerne, som frigiver *antistoffer*, der specifikt binder og neutraliserer fremmedstoffer i kroppen. En anden type hvide blodceller er T-cellerne, som bekæmper syge celler i kroppen. T-cellerne er alle fra naturens side lidt forskellige, og hver af dem genkender defor kun ét bestemt antigen, det vil sige en proteinstump fra fremmede eller syge celler i kroppen. Der findes to slags T-celler: T-hjælpeceller og T-dræberceller. Hvis en T-hjælpecelle støder på et antigen, den genkender, tilkalder den andre immunceller, blandt andet B-celler, *makrofager* (der æder fremmede organismer) og T-dræberceller. Når T-dræberceller møder et genkendeligt antigen, deler de sig hurtigt til en stor gruppe ens celler, der bevæger sig hen til det sted i kroppen, hvor T-hjælpecellerne har slået alarm. Når de møder en celle med det samme antigen på overfladen, bliver cellen dræbt, og stumperne af den døde celle bliver ryddet

op af makrofager i nærheden. Ingen af T-cellerne gør noget, før de er blevet aktiveret af et antigen, de genkender. Der findes derfor nogle celler i kroppen som har specialiseret sig i at opsamle antigener og præsentere dem på deres overflade til T-celler. Både B-celler og makrofager har den evne, men den vigtigste type af antigen-præsenterende celler er *dendritcellerne* (figur 3).



Figur 3. Dendritcelle med sin karakteristiske stjerneform.

Dendritceller består af flere celletyper. En type stammer fra monocytter i blodet. Monocytter bliver dannet i knoglemarven, hvor de differentierer sig til umodne dendritceller og derefter tager på "patrolje" rundt i kroppens væv. Når en umoden dendritcelle møder et fremmed antigen, modnes den og vandrer til lymfeknuderne for at præsentere antigenet til alle de T-celler og B-celler, der flyder med lymfevæsken igennem knuderne (figur 4). Dendritcellerne er de antigen-præsenterende celler, der er bedst til at aktivere det *specifikke immunforsvar*, som husker og genkender fremmede organismer og dermed giver immunitet. Derfor er de et godt udgangspunkt for udviklingen af en vaccine mod kræft.



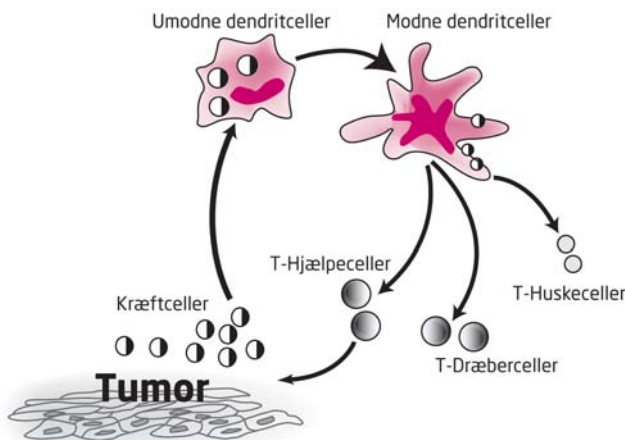
Figur 4. Dendritcellers (DC) livscyklus. 1) Monocytterne fra knoglemarven differentierer til umodne DC, der patruljerer rundt i kroppen. 2) Når de umodne DC fanger et antigen, modnes de til antigen-præsenterende DC og migrerer til lymfevævene. 3) Når en antigen-specifik T-hjælper- eller T-dræbercelle (T) kommer forbi og ser antigenet på DC, bliver de aktiverede til 4) at slå inficerede celler ihjel direkte, eller til at aktivere andre immunceller, eksempelvis 5) B-celler (B), der udskiller antistoffer (As) eller 6) makrofager (MF), der "spiser" og nedbryder fremmedlegemer. Efter at have bundet og aktiveret T-cellerne, mener man, at dendritcellerne dør ved apoptose.

Passiv immunterapi

Ved passiv immunterapi tilføres patienten antistoffer udefra, der genkender og dræber kræftcellerne. Immunsystemets antistoffer har i fostertilstanden lært ikke at genkende og

ødelægge kroppens egne celler. Da kræftceller jo stammer fra kroppens egne celler, ligner de i store træk disse og genkendes derfor heller ikke af vores egne antistoffer. Mange typer kræftceller har imidlertid ofte *peptider* på overfladen, som stammer fra de muterede gener i kræftcellen, og som gør dem genkendelige (*boks 2*). Raske celler præsenterer ikke disse peptider, eller i det mindste ikke i ret store mængder. Når lægerne sprøjter antistoffer rettet mod de forandrede peptider på kræftcellerne ind i patienten, genkender antistoffet dem og binder sig til kræftcellen. Derved hæmmer det celledelingen samtidig med, at det udløser en kaskade af reaktioner, som i sidste ende aktiverer andre dele af immunforsvaret, der også angriber kræften. Ved at gentage behandlingen flere gange, opbygger man en koncentration af antistoffer i blodet, som betyder, at immunterapiens virkning holder i flere måneder. I *boks 2* er beskrevet et eksempel på behandling af HER2+ brystkræft med passiv immunterapi. Antistoffer er dog langt fra altid så giftige for kræftcellerne, at de slår dem ihjel. Desuden er kræftcellerne snu og muterer og ændrer sammensætningen af deres overfladeproteiner hurtigere, end immunterapien kan følge med. Derfor mister passiv immunterapi i sidste ende sin virkning.

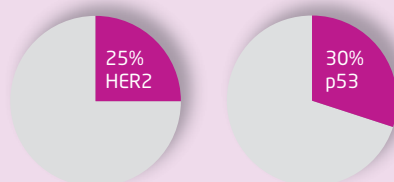
I stedet forsøger forskerne at udvikle en længerevarende immunterapi, hvor patienterne bliver immune over for kræften. Udfordringen er at aktivere immunsystemet til målrettet at ødelægge kræftceller uden at ramme kroppens raske celler. Ved en dendritcellevaccination dyrker forskerne dendritceller i laboratoriet og 'lærer' dem at præsentere antigener fra kræftceller på deres overflader. Når dendritcellerne sprøjtes tilbage i kræftpatienten, præsenterer de kræftcellernes antigener for T-cellerne, der aktiveres og går til angreb på tumoren enten direkte (T-dræberceller) eller ved at aktivere andre immunceller (T-hjælpeceller) (*figur 5*). T-celler er bedre end antistoffer til at genkende bestemte mønstre af antigener på kræftceller, og er derfor også bedre til at finde kræftceller med små mutationer i deres antigener. Ved at aktivere T-cellerne udløser vaccinen desuden også dannelsen af T-huskeceller, der husker og genkender kræftcellernes antigener. På den måde håber lægerne, at terapien virker i længere tid end den passive immunterapi.



Figur 5. Dendritcellevaccination. Modne dendritceller fremviser tumorantigener for T-cellerne, hvorved det specifikke immunforsvar aktiveres. T-dræberceller angriber kræftcellerne direkte, mens T-hjælpeceller rekrutterer andre immunceller. Desuden dannes T-huskeceller, der husker og genkender fremmede organismer. Denne unikke egenskab ved dendritcellerne gør dem velegnede til kræftvacciner.

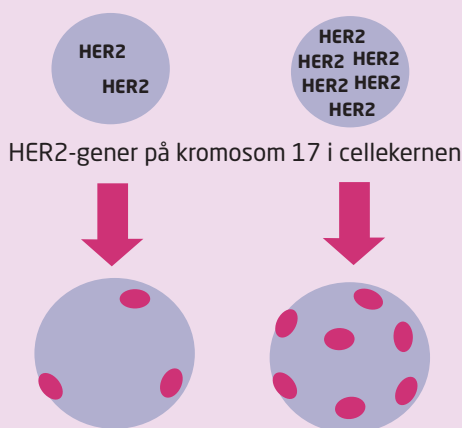
Boks 2. Peptider involverede i brystkræft

Både passiv og aktiv immunterapi udnytter, at kræftceller kan genkendes af immunforsvaret på en anderledes sammensætning af proteiner på deres overflader. Hverken antistoffer eller T-celler genkender eller reagerer på defekte gener, men til gengæld reagerer de på forandrede peptider eller overdrevne mængder protein, som de muterede gener koder for, og som præsenteres på cellernes overflade. Som allerede beskrevet muterer og ændrer kræftcellerne hele tiden disse overflademolekyler og derfor retter immunvacciner sig typisk imod flere forskellige proteiner på en gang, eksempelvis p53, HER2 og survivin.



Figur 6. p53- og HER2-onkogene er hyppigt involveret i brystkræft.

Mutationer i p53- og HER2-onkogene er to af de mest almindelige genetiske forandringer i forbindelse med brystkræft (figur 6), og patienter med p53- eller HER2+-tumorer lever kortere tid end andre brystkræftpatienter. HER2 står for Human Epidermal vækstfaktor Receptor 2. HER2-receptorer på cellens overflade giver cellen besked om at dele sig og spiller en vigtig rolle i cellernes livscyklus. I HER2+-brystkræft har de muterede kræftceller et unormalt stort antal HER2-gener og dermed også unormalt mange HER2-receptorer på cellens overflade (figur 7). Forskerne mener, at det høje niveau af HER2-receptorer får cellerne til at dele sig og vokse hurtigere og at det er forklaringen på, at HER2+-brystkræft ofte er langt mere aggressiv end andre former for brystkræft.



Figur 7. HER2+-brystkræft. Muterede kræftceller har et unormalt stort antal HER2-gener, hvilket medfører unormalt mange HER2-receptorer på cellens overflade.

Hos kvinder med HER2+-brystkræft og lymfeknudespredning bruges lægemidlet Herceptin®, med det aktive stof Trastuzumab, som supplerende behandling. Trastuzumab er et eksempel på passiv immunterapi og forhindrer HER2+-tumorer i at vokse ved 1) at binde sig til HER2 på cellen og dermed signalere til immunforsvaret om at gå til angreb og 2) direkte at blokere for, at vækstfaktor kan binde sig til HER2 og derved forhindre, at HER2+-kræftcellen vokser og deler sig. Desværre har Herceptin® også bivirkninger i form af hjerteproblemer hos nogle patienter efter længere tids brug.

Næsten 50 % af alle kræftpatienter og 30 % af patienter med brystkræft har kræftceller, der udtrykker p53-peptider på overfladen (*figur 7*). p53 er et tumor-undertrykkende gen, og mutationer i dette gen fører til dannelsen af stabilt, men inaktivt p53-protein, der ikke længere undertrykker celledelingen, men i stedet hober sig op i cellen. Peptidrester af p53-proteinerne bliver præsenteret på overfladen af kræftcellen, hvor immunforsvaret 'ser' det.

Survivin tilhører en familie af proteiner, der hæmmer apoptose og findes udelukkende i kræftceller og delende celler, der undergår enten unormal (kræft) eller programmeret cellevækst. For stor produktion af survivin er således medvirkende til at gøre celler udødelige, og for høj survivin genaktivitet er hyppigt involveret i kræft.

Fremstillingen af en dendritcellevaccine

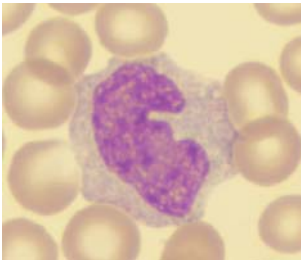
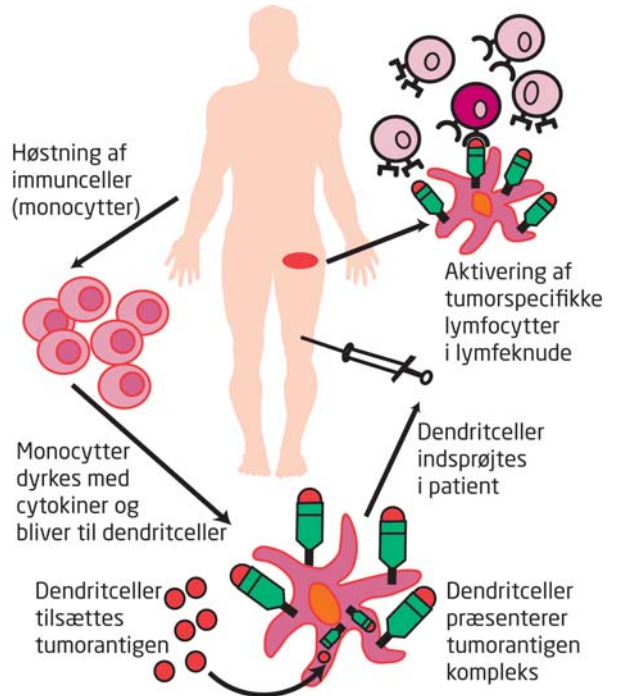
De enkelte trin i udviklingen af dendritcellevaccinationen kan ses i *figur 8*. Første skridt er at isolere monocytter (*figur 9*), som er de ikke-specialiserede forstadier til dendritceller, fra en blodprøve. Vaccinen fremstilles fra patientens eget blod, da det er vigtigt at bruge patientens egne immunceller for at undgå angreb fra immunforsvaret, når cellerne sprøjtes tilbage i kroppen. Det betyder, at hver eneste patient, som skal vaccineres mod kræft, skal have lavet deres egen personlige vaccine. Efter at have isoleret monocytterne videreudvikler forskerne dem i laboratoriet til modne dendritceller. De modne dendritceller tilsættes tumorantigener, og sprøjtes derefter tilbage ind i patienten. Her vil dendritcellerne præsentere deres antigener for T-celler, som aktiveres og starter en immunreaktion mod kræftcellerne.

Selvom fremstillingen af en dendritcellevaccination lyder enkel, er der desværre en række problemer, som betyder, at behandlingen endnu ikke er færdigudviklet. Nogle af de største problemer er, at det er kostbart og arbejdskrævende at fremstille vaccinen, og at der går for mange celler tabt undervejs i processen. En mulig løsning på disse problemer kunne være at automatisere processen, og her spiller både 'intelligent' plastik og nanoteknologi en vigtig rolle. I de følgende afsnit vil vi gennemgå hvert enkelt trin i udviklingen af vaccinen og se nærmere på de enkelte problemer, og på hvordan de kan løses.

Figur 8. Fremstillingen af en dendritcellevaccine.

Udtagning og isolering af monocytter

Det første problem, lægerne støder på, er, at det er nødvendigt at udtage et meget stort antal monocytter (10-100 mio.) fra kræftpatienten for at kunne fremstille vaccinen. Dels kræver det et meget stort antal ens dendritceller for effektivt at aktivere immunforsvaret, og dels går der mange celler tabt undervejs i udviklingen af vaccinen. Da lægerne ikke kan sortere immuncellerne på forhånd, er de nødt til at udtage en blodprøve, der indeholder alle immunforsvarets celler. Men at fjerne så mange immunceller fra en patient, som er alvorligt syg og ofte har et svækket immunforsvar, kan være risikabelt. Derfor forsøger lægerne og forskerne i fællesskab at udvikle en mere effektiv fremstillingsproces, hvor en højere procent af dendritcellerne lærer at udtrykke kræftantigener. Det vender vi tilbage til om lidt.



Figur 9. Monocyt, hvor cellekernen er farvet mørk pink. Lægerne skal bruge 10-100 millioner monocytter til en effektiv vaccine.

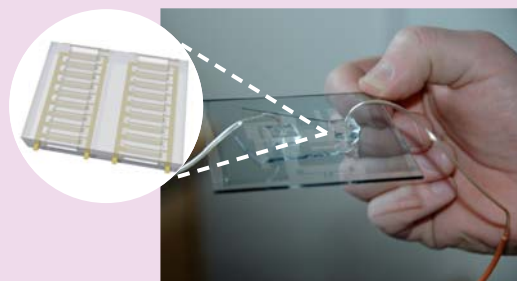
Når patienten har fået taget en blodprøve, isoleres de hvide blodlegemer – som monocytterne er en del af – fra resten af prøvens celler. Det sker ved centrifugering, der adskiller cellerne efter størrelse og vægtfylde. Monocytterne kan ikke direkte separeres fra de øvrige hvide blodlegemer. I stedet sås alle de hvide blodlegemer ud i en petriskål. Kun monocytterne kan hæfte fast til bunden af skålen, så efterfølgende vask fjerner de øvrige celler. Herefter tilsættes *cytokiner* til de isolerede monocytter. Cytokiner er signalstoffer, der giver monocytterne besked om at udvikle sig til umodne dendritceller. Efterfølgende sætter andre cytokiner gang i udviklingen af de umodne til modne dendritceller.

Problemerne i isolerings- og modningsprocessen er mange. For det første er det en tidskrævende proces, og differentiering og modning af cellerne sker ikke lige hurtigt for alle monocytter. For det andet er det svært at vide, hvornår cellerne er modne og klar til høst. Endelig er det vanskeligt at løsribe de modne dendritceller fra petriskålen. Dette gøres i dag ved mekanisk at skrabe cellerne fri fra skålens bund, en proces der beskadiger mange dendritceller. Alle disse problemer er nogle af grundene til, at lægerne er nødt til at udtage så mange celler fra de svækkede kræftpatienter.

Heldigvis er der fremskridt på vej. Mikropumper, der langsomt, men konstant frigiver cytokiner, sikrer en ensartet modning af monocytterne, mens nanotynde proteinlag holder fast i de umodne celler, indtil de er modne og klar til høstning. Du kan læse om mikropumperne i *boks 3* og om høstning af dendritceller i *boks 4*.

Boks 3. Mikropumper styrer celledifferentiering

Differentiering af monocytter til først umodne og dernæst modne dendritceller er helt afgørende for, at resten af immunforsvaret aktiveres. Differentiering af immunceller i kroppen bliver i mange tilfælde styret af cytokiner, som genkendes af receptorer i cellemembranen. Cytokinerne er en gruppe af meget kraftige signalstoffer, som normalt bliver udskilt i nøje kontrollerede mængder og rækkefølge af immuncellerne, når de skal rekruttere andre 'tropper' fra immunforsvaret til bestemte steder i kroppen. Differentiering af monocytter kræver behandling af cellerne med to udvalgte cytokiner i meget lave koncentrationer. For at efterligne modningsprocessen i laboratoriet skal koncentrationen af cytokinerne holdes konstant i op til en uge af gangen. Dette opnår forskerne ved at automatisere tilførslen ved hjælp af mikropumper, der kan frigive cytokiner i en meget langsom, men jævn strøm (*figur 10*).

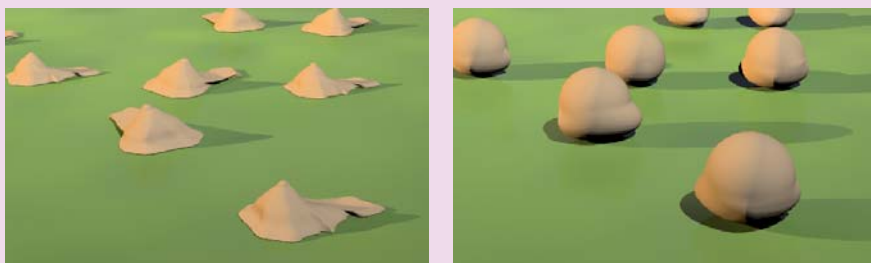


Figur 10. Mikrosystem i plastik med indbyggede mikropumper og væskekanaler.

Mikropumperne er lavet helt i plastik og uden nogen bevægelige dele. Det kan man gøre ved at indbygge nanometer tynde mønstre af elektrisk ledende plastik (*boks 6*), som pumper væsken rundt igennem mikroskopisk tynde kanaler.

Boks 4. Høstning. Hvornår er cellen moden?

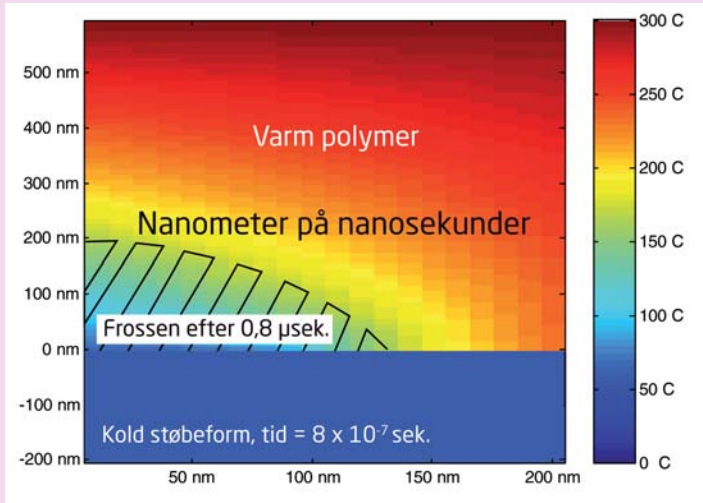
Dendritceller kan kun aktivere resten af immunforsvaret, når de er modne. Modningen sættes i gang i laboratoriet ved at tilsætte de rette cytokiner til cellekulturen, men det er svært at afgøre præcis, hvornår modningsprocessen er færdig. Et vigtigt kendetegn er, at der sker ændringer i typen og antallet af signalmolekyler på dendritcellens overflade. Ved at mærke signalmolekylerne med et fluorescerende stof kan de modne celler ses i et mikroskop og udvælges med en cellesorteringsmaskine. Det er desværre en ret kompliceret proces, der er dyr at automatisere og derfor svær at bruge i stor skala til behandling. Det er desuden svært at få cellerne fri af det underlag, de vokser på, uden at ødelægge mange af dem. Men nu er der hjælp på vej. En gruppe forskere har opdaget, at et protein i kroppen kaldet *fibronektin* virker som en slags 'intelligent' cellelim, der holder cellerne på plads, indtil de er modne, hvorefter de selv hopper af underlaget. De umodne celler er spredt ud på fibronektinoverfladen som et spejlæg, men under modningen trækker de sig gradvist sammen til en kugle og mister deres vedhæftning til underlaget (*figur 11*). Mikroskopiske mønstre af fibronektin kan derfor bruges til at 'lime' de enkelte dendritceller fast på en overflade, indtil de er modne.



Figur 11. Venstre: Fibronektin limer de umodne dendritter fast til overfladen. Højre: Når cellerne er modne trækker de sig sammen til kugler og slipper underlaget.

Men – det lyder jo næsten for godt til at være sandt. Og det er det på en måde også: Fibronektin er, ligesom de fleste andre proteiner, et ret skrøbeligt molekyle, hvilket gør det svært at fremstille mikromønstre af fibronektin til engangsbrug. Engangsstyr til celledyrkning fremstilles normalt ved sprøjtetøbning, hvor 250 °C varm plastik sprøjtes ind i en kold metalform og størkner. Men proteiner går i stykker allerede ved temperaturer over 60-70 °C. Ved 250 °C bliver proteiner ødelagt på mindre end et mikrosekund! Heldigvis har forskerne fundet en genial løsning på problemet, og den hedder 'nanometer'. Metal transporterer varme langt bedre end plastik gør, og det har vist sig, at når den varme plastik under indsprøjtningen rammer det kolde metal, afkøles de første 100 nm af plastikoverfladens tykkelse på under et µsek (*figur 12*). Det er så hurtigt, at det 10 nm tynde lag protein på metaloverfladen så at sige aldrig når

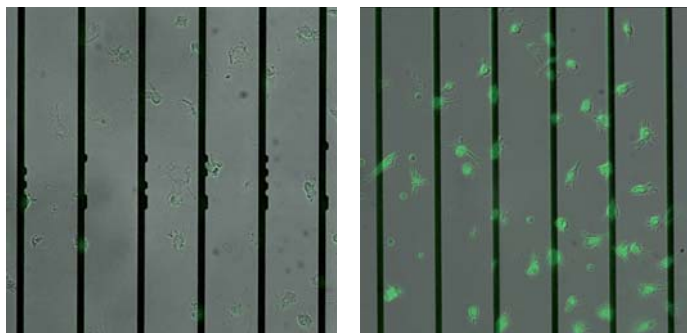
at mærke den høje temperatur og derfor ikke går i stykker. Det er bevist, at metoden virker i laboratoriet, men forskerne mangler endnu at afprøve den til dyrkning af dendritceller.



Figur 12. Indstøbning af proteiner i plastik. En støbeform med proteiner på overfladen overhældes med varm plastik. Figuren viser den beregnede temperatur i et 800 nm tykt tværsnit gennem støbeform og sprøjtet støbt plastik. Allerede efter 800 nsek. er plastikoverfladen afkølet så meget, at den er uskadelig for proteiner.

Oplæring af dendritceller

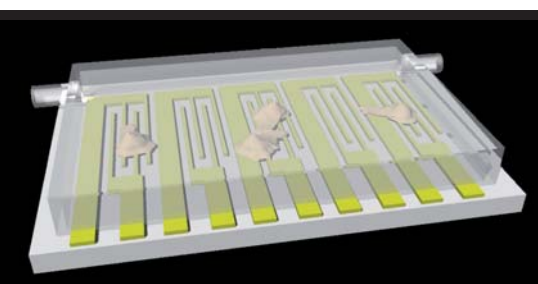
Under den normale modningsproces i kroppen fanger de umodne dendritceller antigener, mens de patruljerer i kroppens væv. Herefter modnes de til antigen-præsenterende dendritceller og vandrer til lymfevævene. Men da kræftcellerne som tidligere beskrevet oprindeligt stammer fra vores egne celler, reagerer de umodne dendritceller ikke altid på kræftcellernes antigener. I stedet må de hjælpes på vej i laboratoriet ved hjælp af elektroporation. Ved elektroporation giver man cellerne et elektrisk stød, som i et kort øjeblik laver bittesmå huller – nanoporer – i cellemembranen. Hvis man forinden blander de modne dendritceller med mRNA som for eksempel koder for p53- eller HER2-proteiner fra brystkræftceller, vil mRNA i det korte tidsrum smutte igennem hullerne ind i dendritcellerne. Når det fremmede mRNA er inde i cellen, lukker hullerne i membranen sig selv igen, og det fremmede mRNA bliver oversat til protein sammen med cellens eget mRNA (figur 13). Derved vil dendritcellen præsentere kræftproteiner (antigener) på sin overflade.



Figur 13. Elektroporation. Dendritceller har fået indført mRNA, der koder for det grønt fluorescerende protein EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein). EGFP bruges som kontrol for optagelse af mRNA og oversættelse til protein. Cellerne er dyrket under samme forhold, bortset fra at cellerne i højre billede har fået en elektrisk puls gennem guld-mikroelektroder (mørke lodrette linjer i billederne). De mange grønne celler viser, at elektroporation med mikroelektroder er en effektiv metode til celleoplæring.

En af ulemperne ved normal elektroporation med millioner af celler mellem millimeter store elektroder er at man ikke kan styre størrelsen af den elektriske puls, som rammer den enkelte celle. En anden er, at forskerne, på grund af de store elektroder, er nødt til at give cellerne et ret stort stød (1000 volt), som i sidste ende dræber en del af cellerne. Dette er endnu en grund til, at lægerne er nødt til at udtage så mange immunceller fra patienten. En tredje ulempe ved elektroporation er, at det langt fra er alle dendritceller, som optager kræftcellens mRNA, og det er vanskeligt at finde de rigtige. For at løse disse problemer prøver man at udvikle en automatiseret metode til elektroporering på enkelt-celle niveau (figur 14). Derved vil det elektriske stød være meget mindre, og der vil være større chance for, at cellen overlever.

For at lave elektroporation på enkelte eller få celler ad gangen kræver det 1) meget mindre elektroder end de nuværende, som er millimeter til centimeter brede, og 2) billige elektroder i stedet for de eksisterende dyre af guld. Det er for nylig lykkedes danske forskere som de første i verden at fremstille udstyr til elektroporation, som er lavet udelukkende i plastik og med elektroder i mikrostørrelse! Elektrisk ledende plastik er en relativ ny opfindelse, som du kan læse mere om i boks 5. Desuden har forskerne bevist, at mikroelektroder på størrelse med en celle kan bruges til at få mRNA ind i dendritceller (figur 13).



Figur 14. Illustration af mikroelektroder med enkelte celler siddende oven på.

Dette er enestående resultater, dels fordi plastik er billigt og let at masseproducere, og dels fordi brugen af mikroelektroder ødelægger færre celler og dermed er mere skånsom for patienterne. Endnu mangler forskerne dog at kunne lave plastikelektroder, der er lige så effektive som dem af guld.

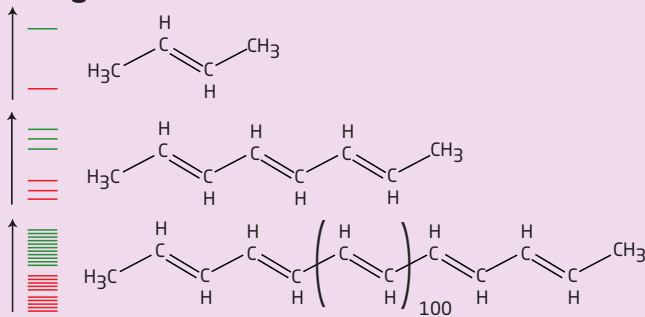
Selvom resultaterne kun er enkeltstående demonstrationer, er det et stort skridt fremad imod udviklingen af effektive dendritcellevacciner.

Boks 5. Elektrisk ledende plastik

Polymerer, i daglig tale kaldet plastik, er lange organiske molekyllæder. I de fleste polymerer kræver det så meget energi at flytte elektroner gennem kæden, at plastik normalt ikke leder elektrisk strøm. Man siger, at energibarrieren er for stor. Plastik er derfor normalt en *isolator*.

For at fremstille billigere og mindre elektroder til elektroporation af celler ønsker forskerne imidlertid at bruge elektrisk ledende plastik. Hvis plastikken skal blive elektrisk ledende, gælder det om at mindske den energi, som det kræver at flytte elektroner i materialet. Det er velkendt fra organisk kemi, at energibarrieren, det vil sige afstanden mellem to energiniveauer kan gøres mindre ved at indbygge dobbeltbindinger i polymerkæden, specielt hvis det er præcis hver anden binding der er dobbelt. Den slags gentagne dobbeltbindinger kaldes for *konjugerede dobbeltbindinger*. Hver polymerkæde skræddersyes til at have hundredevis af konjugerede dobbeltbindinger, så energiniveauerne kommer at ligge helt tæt i et *energibånd*, som du kan se i figur 15. Polymeren er dog stadig ikke elektrisk ledende. Det skyldes, at hele energibåndet er fyldt op med elektroner, som ikke vil give plads for hinanden. Derfor laves der 'huller' i båndet ved at fjerne nogle af elektronerne. Det gøres kemisk ved at oxidere polymeren, som derved bliver elektrisk ledende.

Energi



Figur 15. Ledende plastik. Lange polymerkæder får tætliggende energiniveauer (røde: fyldt med elektroner; grønne: tomme), når de bygges med skiftevis enkelt- og dobbeltbindinger i kæden.

Kvalitetskontrol af dendritceller

Når monocytterne er blevet til modne dendritceller og oplært med mRNA fra kræftceller, er de klar til høst og brug i vaccinationen af patienten. Men først vil forskerne gerne være sikre på, at dendritcellerne er differentierede og oplærte som planlagt. Der er flere krav, der skal opfyldes, for at man kan tale om en succesfuld transfektion og differentieringsproces: 1) Monocytterne skal modnes til dendritceller med typiske dendritegenskaber, det vil sige differentieringsprocessen skal forløbe ligesom i kroppen. 2) Tilstrækkeligt mange

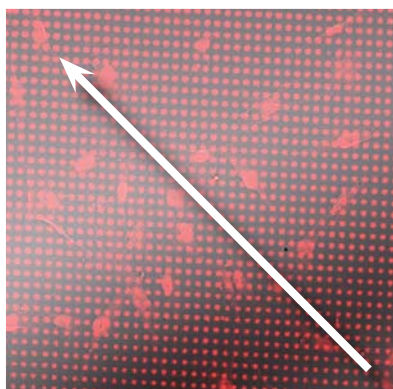
dendritceller skal overleve elektroporationen. 3) De oplærte dendritceller skal udtrykke de ønskede antigener og 4) i tilstrækkeligt store mængder til, at det bliver opdaget af T-cellerne og 5) sidst så skal udtrykkelsen af proteinet og præsentationen af antigener vare længe nok til at kunne aktivere T-cellerne i kroppen.

Kontrollen foregår ved først at undersøge, om dendritcellerne udtrykker de rigtige overfladeproteiner karakteristiske for modne dendritceller, og om de modne dendritceller vil bevæge sig mod lymfeknuderne, når de bliver sat tilbage i patienten (figur 16). Desuden undersøger forskerne, om cellerne præsenterer de rigtige antigener, og om de kan stimulere andre immunceller. T-celleaktivering kan kun undersøges ved at lade dendritcellen kommunikere direkte med en T-celle: T-cellen bliver kun aktiveret, hvis den møder det rigtige antigen præsenteret sammen med de rigtige assisterende proteiner på dendritcellens overflade.

Modningskontrol

Dendritcellernes modenhed undersøges altså i dag ud fra analyse af deres overfladeproteiner. I en fremtidig automatiseret proces kan modenhed blandt andet undersøges ved at dyrke dem på en overflade med fibronektin som beskrevet i boks 5. Når dendritcellerne er modne, slipper de automatisk overfladen ligesom modne æbler selv falder af træet. For at undersøge om de oplærte dendritceller også vandrer til lymfeknuderne, som de skal, efterligner forskerne kroppens egen vejviser, nemlig stigende koncentration af cytokiner, der 'lokker' cellerne det rigtige sted hen (figur 16). Cellevandring styret af koncentrationsgradienter kaldet for kemotaksi.

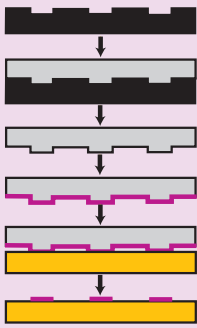
De stigende cytokinkoncentrationer trykkes i mønstre på plastikoverflader ved hjælp af en metode, der hedder Microcontact Printing. Det er en slags 'nano-kartoffeltryk', hvor man først dypper et stempel i en opløsning af de cytokiner, man vil lave mønstre med, hvorefter man trykker stemplet ned på polymeroverfladen. Polymeren får derved overført cytokinerne lagt ud i det mønster, der var på stemplet. Du kan læse mere om metoden i boks 6.



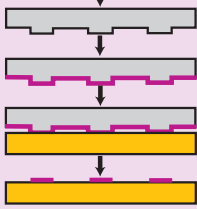
Figur 16. Cellers evne til at finde vej kan undersøges ved at udlægge 'lokkesignaler' i stigende mængde hen over en overflade. Mikroskopbilledet viser et eksempel på et mikromønster af proteinet fibronektin (rødt fluorescerende) med stigende tæthed på overfladen i pilens retning. Efter mønstring er der udsået celler, som er i gang med at vokse og bevæge sig rundt på billedet. Det afbildede område er 500 x 500 μm .

Boks 6. Nano-kartoffeltryk

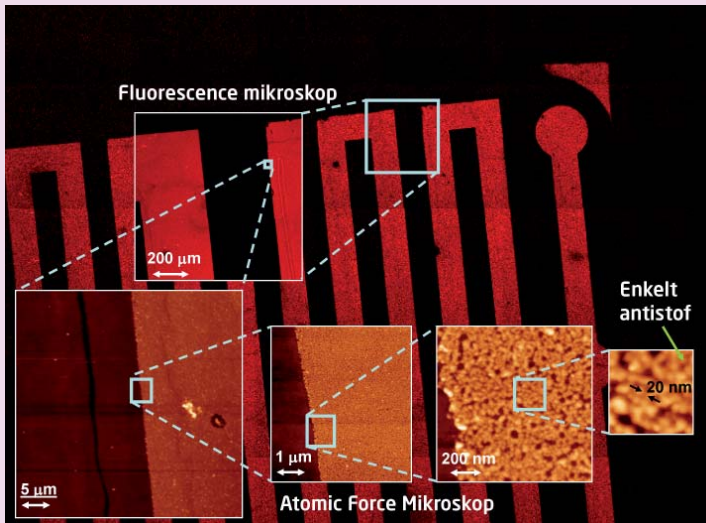
Proteinmønstre på plastikoverflader kan anvendes til mange ting inden for medicinsk forskning. En meget anvendt og simpel metode til at lave proteinmønstre er 'Micro-contact printing' eller 'Nano-kartoffeltryk'. Princippet er meget lig kartoffeltryk. Et gummistempel med mønster dyppes i en proteinopløsning, og efter et stykke tid har der lagt sig præcis ét lag proteiner (cirka 5 nanometer tykt) på stemplets overflade. Der er nu kommet 'protein-tryksværte' på stemplet, og når det efterfølgende bliver trykket ned på en plastikoverflade, overføres proteinlaget fra de forhøjede områder på stemplet (figur 17 og 18). Det er muligt at trykke meget små mønstre med nanometer skarpe afgrænsninger i hånden. Det sværeste er, ligesom i kartoffeltryk, at få flere efterfølgende tryk med forskellige proteiner til at ligge præcist i forhold til det første proteinmønster. Metoden har også vist sig svær at bruge til massefremstilling, men det har forskerne for nylig fundet en løsning på som beskrevet i boks 4 om sprøjtestøbning.



Figur 17. Princippet i nano-kartoffeltryk. Et gummistempel med mønster påføres en proteinopløsning, og mønstret overføres til en plastikoverflade.



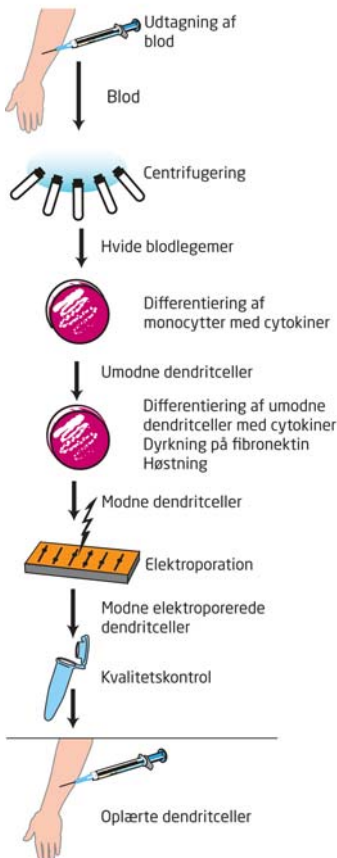
Figur 18. Nano-kartoffeltryk. Det store billede er et mikroskopbillede af mønstrede rød-fluorescerende antistoffer, hvor hver linje har en bredde på 0,5 μm . I hvert af de indsatte billeder bliver kanten af en linje i mønstret forstørret. De mest detaljerede billeder i nederste række med dimensioner under 1 μm er lavet med et Atomic Force Mikroskop. Her er det muligt at se hvert enkelt antistofmolekyle.



Funktionskontrol

Til allersidst i vaccinefremstillingsprocessen undersøger forskerne, om dendritcellerne udtrykker kræftantigenerne. Hvis cellerne består kvalitetskontrollen, er de færdigudannede og klar til at blive sprøjet tilbage ind i patienten. Efter alt dette arbejde kan lægerne nu blot håbe på, at det er lykkedes dem at fremstille en vaccine, der virker. Først når dendritcellerne er tilbage i patienten, vil det vise sig, om cellerne præsenterer det rigtige kompleks af antigener og assisterende proteiner, der kan aktivere T-cellerne. I figur 19 kan du se en opsummering af trinene i fremstillingen af dendritcellevaccinen.

Fremstilling af en dendritcellevaccine er en kompliceret og langvarig proces, og de mange immunceller, som lægerne fjerner fra patienten, svækker de skrøbelige patienters immunforsvar. Derfor ville det bedste være, hvis man kunne oplære dendritcellerne direkte inde i patientens krop. Det er en mere simpel og skånsom behandlingsmetode. Ulempen er imidlertid, at man ikke har mulighed for at kontrollere oplæringens kvalitet i laboratoriet, og derfor er der en risiko for dårlig eller direkte fejlagtig oplæring af dendritcellerne, så de også angriber raske celler i kroppen.



Resultater og fremtid for dendritcellevaccinen

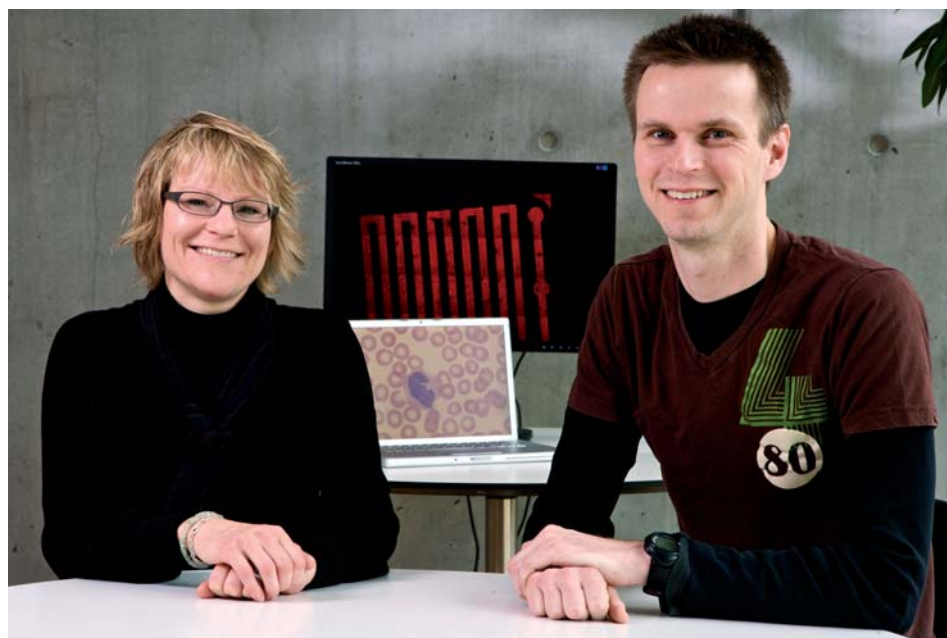
Det er vigtigt at huske, at dendritcellevaccination er en forsøgsbehandling og bruges derfor hverken i Danmark eller i udlandet som standardbehandling af kræft i dag (2008). Typisk prøver lægerne først vaccinationen på patienterne, når de uden held har forsøgt andre behandlinger. Flere studier har vist lovende resultater, men lægerne mangler viden om den optimale type vaccine og om, hvilke patienterne der kan behandles.

Efter at patienten er blevet vaccineret, går der cirka 6-8 uger, før immunforsvaret er klar med et T-dræbercelle angreb på kræftcellerne og før kan læger og patienter altså ikke få svar på, om vaccinen virker. I et dansk forsøg lavet med 19 patienter med fremskreden brystkræft betød dendritcellevaccinationen, at kræften stabiliserede sig eller aftog hos 8 patienter. Selvom disse resultater ikke synes imponerende, er det positive tegn på, at en dendritcellevaccination har en effekt på kræftcellerne. I forsøget blev der brugt en simpel vaccine med p53 an-

Figur 19. Fremstilling af dendritcellevaccinen. Processen starter med sortering af patientens blodlegemer. De hvide blodlegemer isoleres, og monocytterne udvikles til først umodne og efterfølgende modne dendritceller. Dendritcellerne 'oplæres' til at genkende et eller flere kræftantigener ved elektroporation med mRNA fra kræftcellerne. Til sidst kontrollerer forskerne om dendritcellerne er modne og oplærte, før de sprøjtes tilbage i patienten.

tigen-præsenterende dendritceller. Som tidligere nævnt forventer lægerne at kunne opnå bedre resultater ved at bruge dendritceller med flere forskellige kræftantigener. Desuden blev vaccinen afprøvet på alvorligt svækkede patienter, som blev yderligere svækket på grund af udtagelsen af deres immunceller til vaccinen. Målet og håbet for den forskning, som vi har beskrevet i dette kapitel, er dels at udvikle de forbedrede teknikker og dels at samle alle trinene i et automatiseret og dermed hurtigere og langt mere effektivt system, en slags cellereaktor. Kortere fremstillingstid, færre immunceller udtaget fra patienterne samt dendritceller, der præsenterer flere antigener og dermed fremkalder et meget større immunangreb på kræftcellerne, vil alt sammen forbedre vaccins virkning væsentligt.

Udviklingen af mere effektiv immunterapi er et enestående eksempel på, at moderne medicinsk forskning og udvikling kræver kendskab til mange forskellige faglige discipliner. I vaccineprojektet har lægerne præsenteret forskerne for et problem fra deres daglige arbejde med kræftpatienter. Gennem et samarbejde mellem biologer, fysikere, ingeniører, læger og ikke mindst personalet, der arbejder med den eksisterende behandling, er parterne i fuld gang med at udvikle en bedre immunterapi, der i løbet af nogle få år forhåbentlig hjælper alvorligt syge patienter med at vinde kampen mod kræft.



Kapitlets forfattere. Redaktør Anne Hansen og Professor Niels B. Larsen.