

Kostengünstig zum individuellen Krebsmedikament

Christian Reis

Fraunhofer Institut für Produktionstechnik und Automatisierung IPA
Projektgruppe für Automatisierung in der Medizin und Biotechnologie

Zusammenfassung

Die individualisierte Krebstherapie als Teil der personalisierten Medizin zielt auf eine optimale Behandlung eines Patienten mit minimalen Nebenwirkungen ab. Bei der Chemotherapie ist es daher ein Ansatz, die am besten wirksamsten Chemotherapeutika bzw. die beste Kombination unterschiedlicher Chemotherapeutika vorab zu bestimmen, um die Lebensqualität des Patienten zu erhöhen und die therapeutische Effizienz zu steigern. Doch die herkömmlichen Verfahren sind aufwändig und teuer. Außerdem konnte bislang der gesundheitsökonomische Nutzen solcher Verfahren noch nicht ausreichend nachgewiesen werden. Mit DiagnoSYS konnte gezeigt werden, dass mittels Automatisierung solcher Verfahren eine höhere Reproduzierbarkeit bei Chemosensitivitätstests möglich ist. Beispielhafte Grundlage hierfür ist ein ATP/TCA Test, der auf der DiagnoSYS Plattform durchgeführt wurde. DiagnoSYS ermöglicht damit erstmalig die durchgehend automatisierte Testung individueller Patientenproben von der Gewebeaufarbeitung bis hin zur Testdurchführung und Ergebnisauswertung. Zusätzlich konnte durch Integration einer magnetischen Zellseparation das Signal zu Rausch Verhältnis des ATP/TCA Test wesentlich verbessert werden.

Die DiagnoSYS Plattform arbeitet mit dem international anerkannten SBS-Format. Daher sind alle Prozessschritte von der Gewebeaufarbeitung bis hin zur Lumineszenz-basierten Signalerfassung modular austauschbar und können an andere Biomarker wie beispielsweise die Bestimmung von uPA/PAI-1 angepasst werden

Personalisierte Medizin ist ein Schlüssel für verbesserte Tumordiagnose und Therapie

Bei vielen Krebserkrankungen setzen Mediziner auf eine Chemotherapie. Die verwendeten Zytostatika sollen gezielt das Wachstum von Krebszellen verhindern. Doch maligne Tumore sind in sich heterogen und



Bild 1: Frontansicht der DiagnoSYS Plattform für personalisierte Chemosensitivitätstests.

auch bei der gleichen Tumor-Art reagieren die Krebszellen von Patient zu Patient sehr verschiedenen auf die Arzneien. Daher besteht seit Jahren bei Onkologen der Wunsch, die Krebstherapie zu individualisieren und eine patientenspezifische Zusammensetzung von zytostatischen Arzneimitteln zu nutzen, welche nicht potente Zytostatika ausschließt [1]. Trotz dass solch eine personalisierte Medikation einen Nutzen bringen könnte, werden sogenannte Chemosensitivitätstests nicht oft durchgeführt [2]. Derzeit gibt es einige gut dokumentierte Chemosensitivitätstests am Markt, doch wegen hoher Kosten im Labor, die mit einer solchen Testung einhergehen, werden diese in der klinischen Routine kaum angewendet.

Stand der Technik bei der Chemotherapie

In der klinischen Routine werden Tumorpatienten mit einer Standardkombination unterschiedlicher Chemotherapeutika behandelt, basierend auf Konsensus-Richtlinien für die unterschiedlichen Tumorentitäten [3,4]. Doch aufgrund der Heterogenität von Tumo-

ren ist damit die optimale therapeutische Effizienz nicht garantiert und die Behandlungen gehen oftmals trotzdem mit starken Nebeneffekten einher. Daher kommt es auch zu Rückfallraten und alternative chemotherapeutische Behandlungen werden notwendig. Die Lebensqualität des Patienten ist stark minimiert [5, 6].

Heutzutage sind *ex vivo* Chemosensitivitätstests ein anerkanntes wissenschaftliches Verfahren [1]: Sie können die Effizienz zytostatischer Arzneimittelkombinationen vorab evaluieren [7]. Eine Testmethode zur prätherapeutischen Untersuchung nutzt die *in vitro* Messung des ATP-Status einer Zellkultur nach der Behandlung mit unterschiedlichen Kombinationen von Chemotherapeutika [8].

Nichts desto trotz werden solche individualisierten Therapien, auch wenn der Patientennutzen hoch erscheint, aufgrund von komplizierten Prozessen und hohen Kosten oft von Klinikern nicht angewendet. Außerdem sind die Aufarbeitung des Tumorgewebes zur

Generierung von Zellkulturen und die Testdurchführung fehleranfällig, sofern sie manuell durchgeführt werden. Bei ATP-Messungen ist außerdem die Zusammensetzung der Zellkultur ausschlaggebend, sodass das Signal zum Rausch-Verhältnis oftmals durch störende Zellen wie beispielsweise Fibroblasten minimiert wird.

Um diese Limitationen bei individualisierten Tests zu beheben, wurden die wichtigsten Prozesse mit finanziell tragbaren Lösungen auf der DiagnoSYS Plattform automatisiert. Ziel war die Entwicklung einer Plattform-Technologie, welche die grundlegenden Prozesse zur Testvorbereitung und Testdurchführung automatisiert und zu robusten Antwortsignalen führt.

Material und Methoden

Die DiagnoSYS Plattform ist in eine Klasse II Sterilwerkbank integriert. Diese ermöglicht steriles Arbeiten mit Zellkulturen und sorgt dafür, dass keine Personen mit den zu testenden Zytostatika durch Aerosolbildung in Berührung kommen. Die Beladung der Plattform findet über die Gerätefront statt (Bild 1). DiagnoSYS verfügt auf der Arbeitsebene über mehrere Plätze im ANSI-SBS Mikrotiterplattenformat, um eine einfache Austauschbarkeit von Modulen zu ermöglichen. Um den ATP/TCA Test vorzubereiten, musste eine Gewebeaufarbeitung zur Einzelzellgenerierung aus Biopsien entwickelt und integriert werden. Weiterhin wurden eine Zellseparationseinheit, ein Pipettiersystem, eine Loading-Bay, ein Lumineszenz-Reader und verschiedene Stellplätze für 1 ml Pipettenspitzen, Zellkulturplatten und Lumineszenzplatten integriert.

Die Biopsien werden in mit Enzymlösung vorgefüllte M-Tubes (MiltenyiBiotec) gegeben. Die Enzymlösung besteht aus 12,5 mg Kollagenase, 20 mg Albumin und 5 mg Hyaluronidase in 5 ml Phosphatpuffer. Das Tube wird auf die Gewebeaufarbeitungseinheit der Plattform gestellt und der Prozess wird gestartet. Um eine eindeutige Identifikation aller Materialien auf der Plattform zu ermöglichen, wurden parallel ein RFID System und ein Barcode-basiertes System verwendet. Alle verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, von SIGMA ALDRICH erworben.

Der erste Prozessschritt ist die Durchführung der Einzelzellgenerierung aus Biopsien. Dazu wird das M-Tube automatisch gedreht und die integrierte Schneide im Tube über einen Dorn angetrieben. Die Rotationsgeschwindigkeit der Schneide in beide Richtungen betrug 500 rpm für jeweils 30 s. Es wurden insgesamt drei Schneidzyklen durchgeführt, jeweils unterbrochen durch Phasen mit weni-

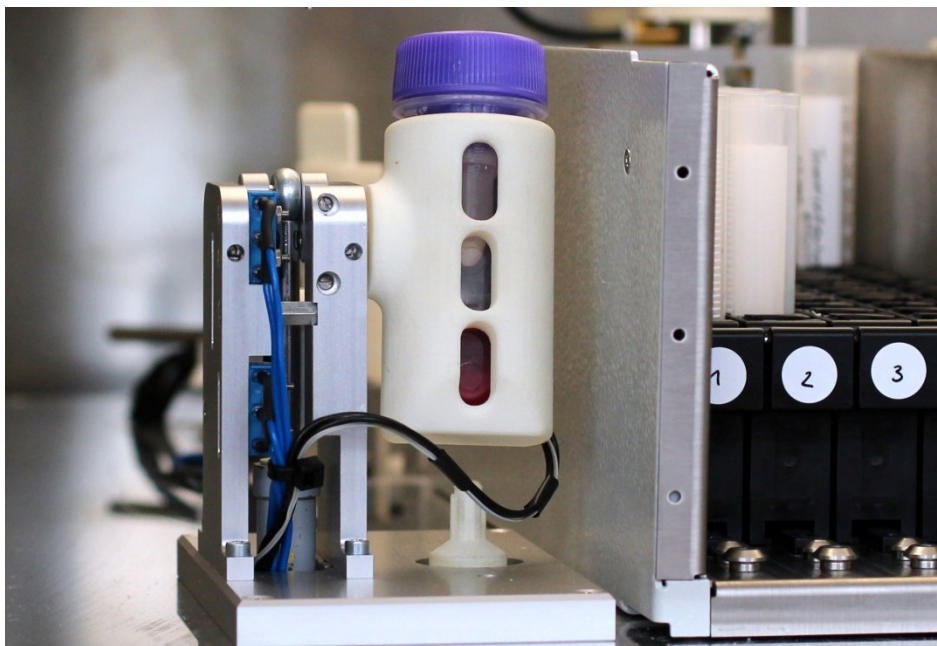


Bild 2: Modul zur Einzelzellgewinnung aus Biopsien mit integrierter Heizfolie.

gen Umdrehungen (50 rpm) zum Durchmischen der Lösung. Die Gesamtdauer des Prozesses beträgt 3 Stunden bei einer Temperatur von 37° C durch eine integrierte Heizfolie im System (Bild 2).

Nach Beendigung des Prozesses rotiert das Tube wieder in die ursprüngliche aufrechte Position zurück und die Zellsuspension kann durch den integrierten Pipettierer zur Zellseparationseinheit transferiert werden. Dieser automatisierte Prozess wurde mit einem manuellen Aufarbeitungsprozess mit mechanischer Zerkleinerung mittels Skalpell und enzymatischem Verdau in einem Inkubator verglichen.

Die magnetische Zellseparation wurde in einem Modul mit modifizierter LS-Säule (MiltenyiBiotec) durchgeführt. Zur Selektion dienten eine positive EpCAM und eine negative FSA Markierung. Das Zellwachstum nach der Selektion wurde mit Zellen ohne magnetische Beadseparation als Negativkontrolle überprüft. Dafür wurde eine siebentägige Inkubation der Zellen im Inkubator (37° C, 5% CO₂ und > 95% Luftfeuchtigkeit) durchgeführt. Nach der Separation wurden die Zellen in CAM Medium (DCS) gewaschen und zur Überprüfung der Zellzahl gesammelt. Um die Plattform kostengünstig zu halten, wurde für die Zählung ein modifiziertes Verfahren mit Lumineszenz-Reader (Bild 3)

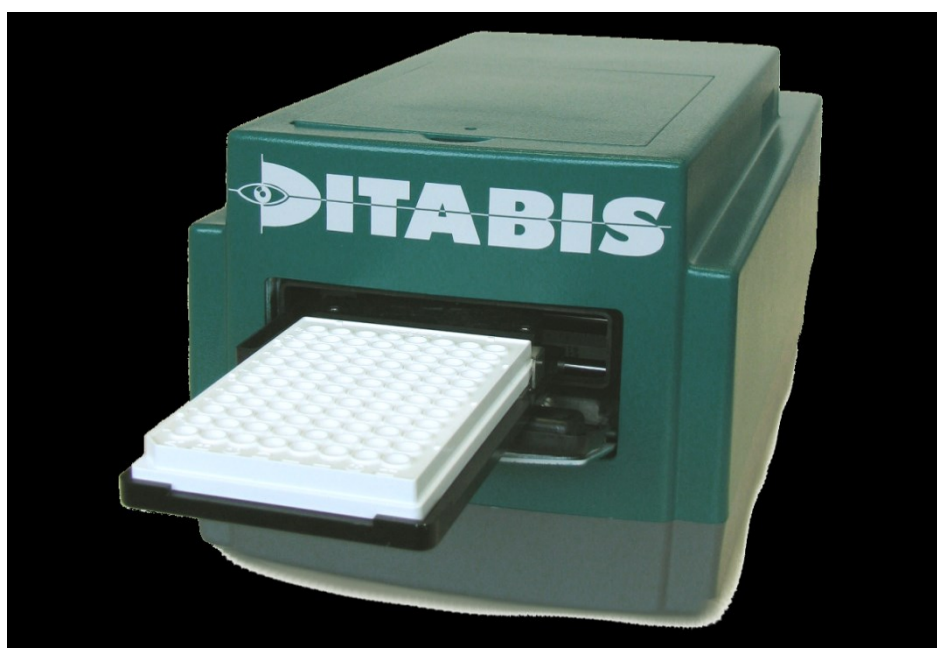


Bild 3: Integrierter Lumineszenz-Reader

verwendet, um nicht zusätzlich einen Coulter-Counter oder ein optisches System integrieren zu müssen. Damit wurde das ATP-Signal der Zellen gemessen und mit dem ATP-Signal von Kollagenase-behandelten Zellen bekannter Konzentration verglichen.

Nach der Zellzahlbestimmung wurden 7500 Zellen pro well einer 96-well Platte (Greiner Bio-One) ausgesät und in einem externen Inkubator (37° C, 5% CO₂ und > 95% Luftfeuchtigkeit) für sieben Tage mit unterschiedlichen Chemotherapeutika inkubiert. Das Lumineszenzsignal der separierten und inkubierten Zellen wurde mit dem Signal von Zellen verglichen, welche nicht mit magnetischen Beads separiert wurden.

Ergebnisse

Der automatisierte Prozess auf der DiagnOSYS Plattform zeigt weitreichende Vorteile über manuell durchgeführte Chemosensitivitätstests. Die Zellzahlen des integrierten Gewebeaufarbeitungs-Moduls sind signifikant höher im automatisierten Prozess und zeigen gleiche Zellvitalitäten (Bild 4).

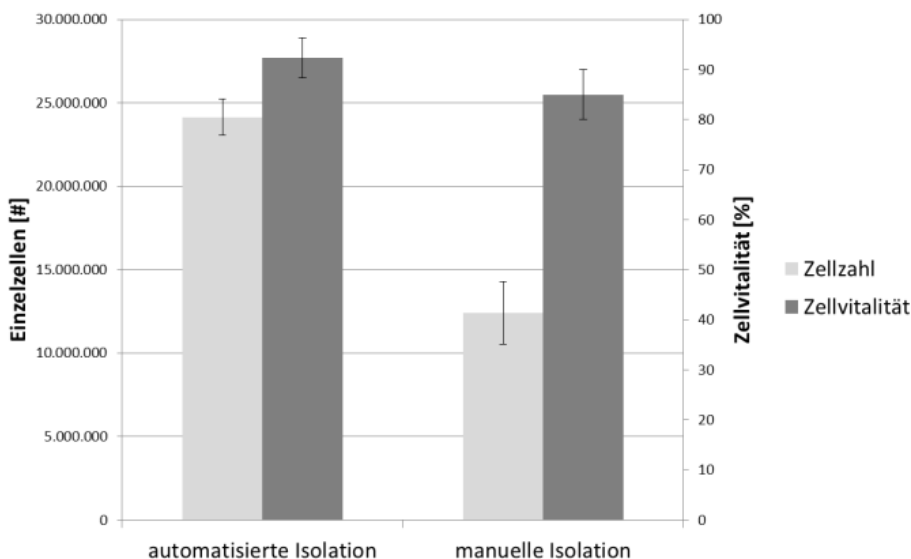


Bild 4: Vergleich der Zellzahlen aus automatisierter Aufarbeitung und manueller Aufarbeitung.

Magnetische Beadseparation

Vor der magnetischen Separation von Zellen wurde der Expressionsstatus von EpCAM und FSP an der Zelloberfläche von primären Ovarialfibroblasten mittels EpCAM-FITC und FSP-FITC Markierung überprüft (Bild 5). Das Antikörperfragment war hierbei das gleiche wie bei den genutzten magnetischen Beads. Um das optimale Volumen zur Separation von $2,16 \times 10^6$ Zellen für die Testdurchführung zu bestimmen, wurde ein polynomischer Fit der Konzentrationskurve verwendet (Bild 6). Das optimale EpCAM-Bead Volumen beträgt hierbei 25 μ l; dieses Volumen wurde für die Separation der Zellen in der DiagnOSYS Anlage verwendet.

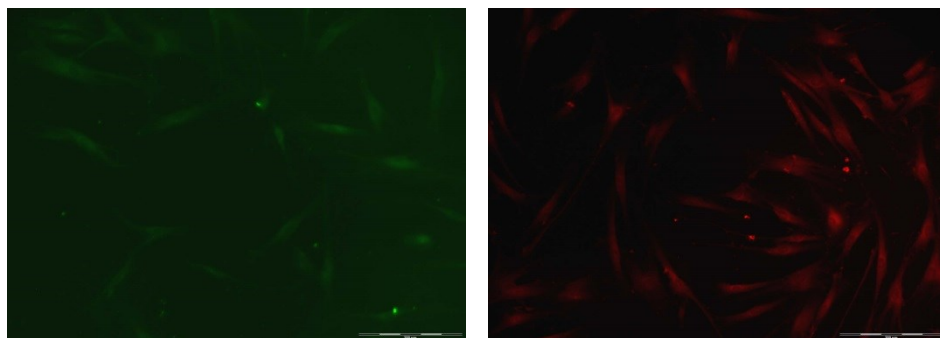


Bild 5: Primäre Fibroblasten eines Ovarialkarzinoms zeigen geringere EpCAM- (links) und eine hohe FSP-Expression (rechts).

Lumineszenz-basiertes Zellzählverfahren

Die automatisierte Bestimmung der Zellzahl nach der Gewebeaufarbeitung und Zellseparation mittels ATP-Gehaltsmessung funktioniert robuster über eine kinetische Analyse als über eine klassische Endpunkt-Bestimmung. Die Endpunktmessung wies einen starken Drift des Lumineszenzsignals über die Zeit auf und das Signal war nicht so stabil wie in den Protokollen von DCS angegeben (Bild 7). Die kinetische Analyse (Bild 8) der Referenzmessungen von Zellkulturen wurde verwendet, um die Zellzahl von aufgearbeiteten Biopsien zu bestimmen. Zur Analyse der Zellvitalität wurde ein Trypan-Blau Färbung eingesetzt. Nach der Gewebeaufarbeitung und Zellseparation zeigt sich, dass aus einem Gramm Biopsie mit dem DiagnOSYS Prozess 10×10^6 Zellen mit Vitalitäten von 82% gewonnen werden können.

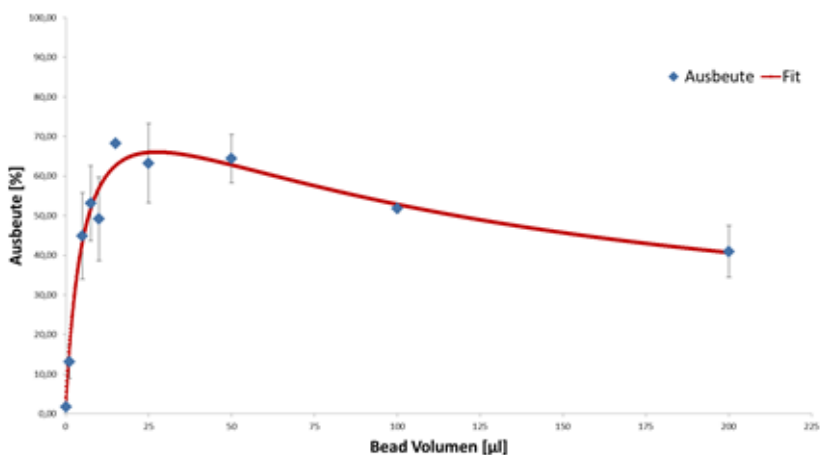


Bild 6: Die maximale Zellausbeute mit EpCAM-Microbeads wird bei einem Volumen von 25 μ l erreicht.

Bestimmung des ATP Gehalts von Zellen

Um das Signal zu Rausch Verhältnis von manuell bearbeiteten Zellkulturen und Zellen aus dem DiagnoSYS Prozess zu vergleichen, wurde das ATP/TCA Protokoll nach DCS mit einem Luziferin/Luziferase System verwendet. Die Zellkulturen von Reinkulturen zeigen dabei ein stark unterschiedliches Signal verglichen mit dem Signal von Zellen, die manuell und nicht mittels Magnetseparation aufgereinigt wurden. Dieses erhöhte Rauschen zeigt sich in einer hohen Standardabweichung von ungereinigten Kulturen (Bild 9). Dieses Resultat wird außerdem bestätigt durch Ergebnisse an Mischkulturen von MCF-7 Zellen mit primären Fibroblasten in einem Verhältnis von 60/40 und 70/30 kultiviert über einen Zeitraum von sieben Tagen.

Diskussion

Mittels DiagnoSYS konnte gezeigt werden, dass eine automatisierte Gewebeaufarbeitung zu höheren Zellzahlen mit gleichwertiger Vitalität im Vergleich zum manuellen Prozess führt. Dies ist ein wichtiges Ergebnis, da mit der Erhöhung der Zellzahl auch eine größere Vielfalt an Chemotherapie-Kombinationen getestet werden kann. Die magnetische Separation von Zellen in DiagnoSYS hat zwei Vorteile: Im Gegensatz zum manuellen Prozess wird keine Zentrifugation benötigt, was eine bezahlbare Plattform ermöglicht und zusätzlich wird das Rauschen reduziert. Dies ist ein wichtiger Vorteil, da die Resultate von unterschiedlichen Kulturen zeigten, dass Fibroblasten nach sieben Tagen Kultivierung in CAM-Medium immer noch anwesend waren und das Signal unspezifisch machten.

Obwohl noch keine Ergebnisse mit Patientendaten vorliegen, welche mit automatisiert getesteten und damit optimierten Chemotherapie-Kombinationen behandelt wurden, zeigt die Minimierung des Signal zu Rausch Verhältnisses eindeutig das Potential zu robusteren Analysen mittels Automatisierung.

Diese Robustheit kann auch auf weitere prognostische Analysen, wie beispielsweise die Bestimmung von uPA/PAI-1 übertragen werden. Für diese Analysen kann die DiagnoSYS Plattform einfach durch Austausch von Modulen adaptiert werden.

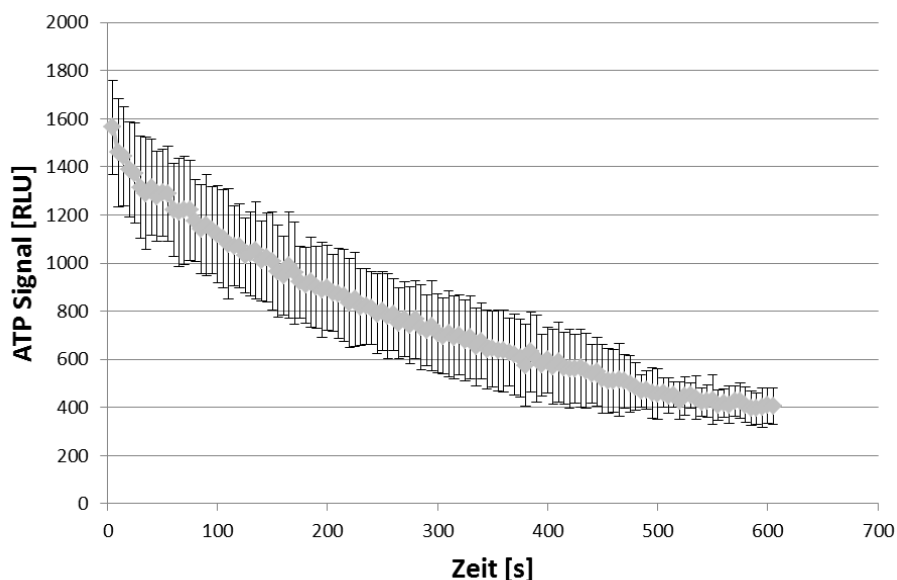


Bild 7: Drift des ATP-Lumineszenz Signals bei der Bestimmung der Zellkonzentration.

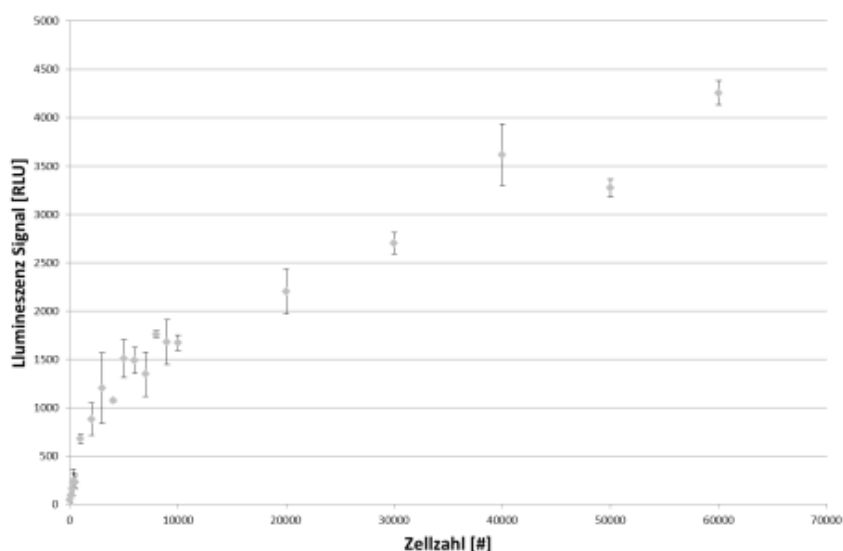


Bild 8: Analyse der Zellzahl durch Messung des ATP-Signals mittels kinetischer Auswertung.

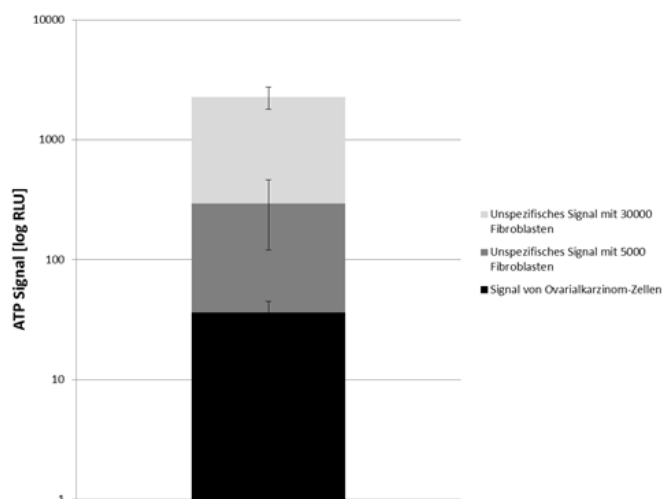


Bild 9: Eine erhöhte Anzahl von Fibroblasten bei der Testdurchführung führt zu niedrigeren Signal zu Rausch Verhältnissen in Bezug auf das spezifische Antwortsignal von Tumorzellen.

Literatur

- [1] Reinhold U, Tilgen W, editors. *Chemosensitivity Testing in Oncology*. Berlin: Springer, 2003
- [2] Bosanquet N, Sikora K. *The Economics of Cancer Care*. Cambridge, England: Cambridge University Press, 2006.
- [3] Consensus conference 2000: adjuvant therapy for breast cancer. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement November 1-3, 2000. *Cancer Control* 2001;8:55.
- [4] Adams M, Calvert AH, Carmichael J et al. Chemotherapy for ovarian cancer – a consensus statement on standard practice. *Br J Cancer* 1998;78:1404-6.
- [5] Pinedo HM, Giaccone G, editors. *Drug resistance in the treatment of cancer*. Cambridge: Cambridge University Press, 2006.
- [6] Mellor HR, Callaghan R. Resistance to chemotherapy in cancer: A complex and integrated cellular response. *Pharmacology* 2008;81:275-300.
- [7] Weisenthal LM. Predictive assays for drug and radiation resistance. In: Masters JRW, editor. *Human Cancer in Primary Culture*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1991. p 103-147.
- [8] Andreotti PE, Cree IA, Kurbacher CM et al. Chemosensitivity testing of human tumors using a microplate adenosine triphosphate luminescence assay: clinical correlation for cisplatin resistance of ovarian carcinoma. *Cancer Res* 1995; 15;55:5276-82.