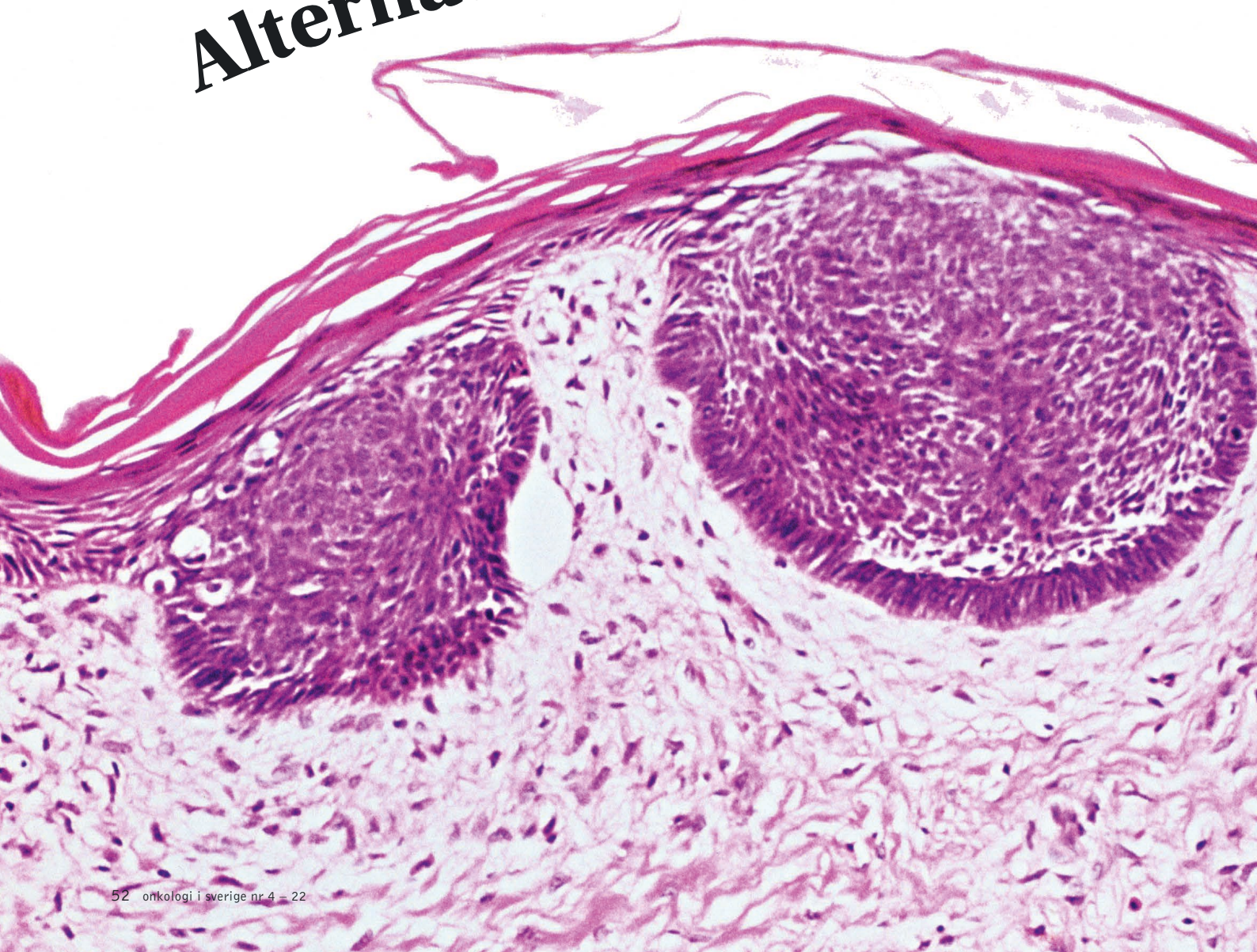


En tidig diagnos är avgörande för att kunna behandla hudcancer innan den sprider sig. Men finns det enklare metoder som inte kräver att man tar ett traditionellt vävnadsprov? Doktorander från Malmö universitet har testat och utforskat olika alternativa metoder i två nyligen presenterade avhandlingar. Här beskriver forskarna **Maxim Morin** och **Skaidre Jankovskaja** senaste nytt på området.

Alternativa metoder för att



Enligt Cancerfonden har förekomsten av olika typer av hudcancer (basalcellscancer, skivepitelcancer och malignt melanom) ökat kontinuerligt under de senaste åren och blivit bland de vanligaste cancerformerna i Sverige. På grund av sin metastaserande potential står malignt melanom för den största sjukligheten och dödligheten. Dock är hudcancer botbar hos de flesta patienter om den upptäcks i ett tidigt skede, det vill säga innan etablering av en metastaserande fenotyp, vilket framhäver vikten av tidig diagnos.¹ För närvarande baseras diagnostisering av hudcancer främst på visuell inspektion följt av hudbiopsier. Men det visuella diagnostiska tillvägagångssättet är mycket subjektivt och har låg noggrannhet. Baserat på resultat från flera studier är den uppskattade specificiteten för hudcancerdiagnos i ett tidigt skede cirka 30 procent och sensitiviteten är runt 84 procent.² Det innebär att av 100 misstänkta och utskurna melanomlesioner är endast

30 riktiga melanom. Samtidigt betyder det också att 16 melanomfall missas. Detta är särskilt problematiskt eftersom hudbiopsier är förknippade med höga kostnader, kirurgiska ingrepp och att överlevnadsfrekvensen för melanompatienter minskar avsevärt i senare skeden av sjukdomen. Därför är målet med vårt projekt att utveckla och etablera en enkel, icke-invasiv metod för hudcancerdiagnostik i ett tidigt skede, vilket är mycket eftertraktat av både patienter och vårdgivare.

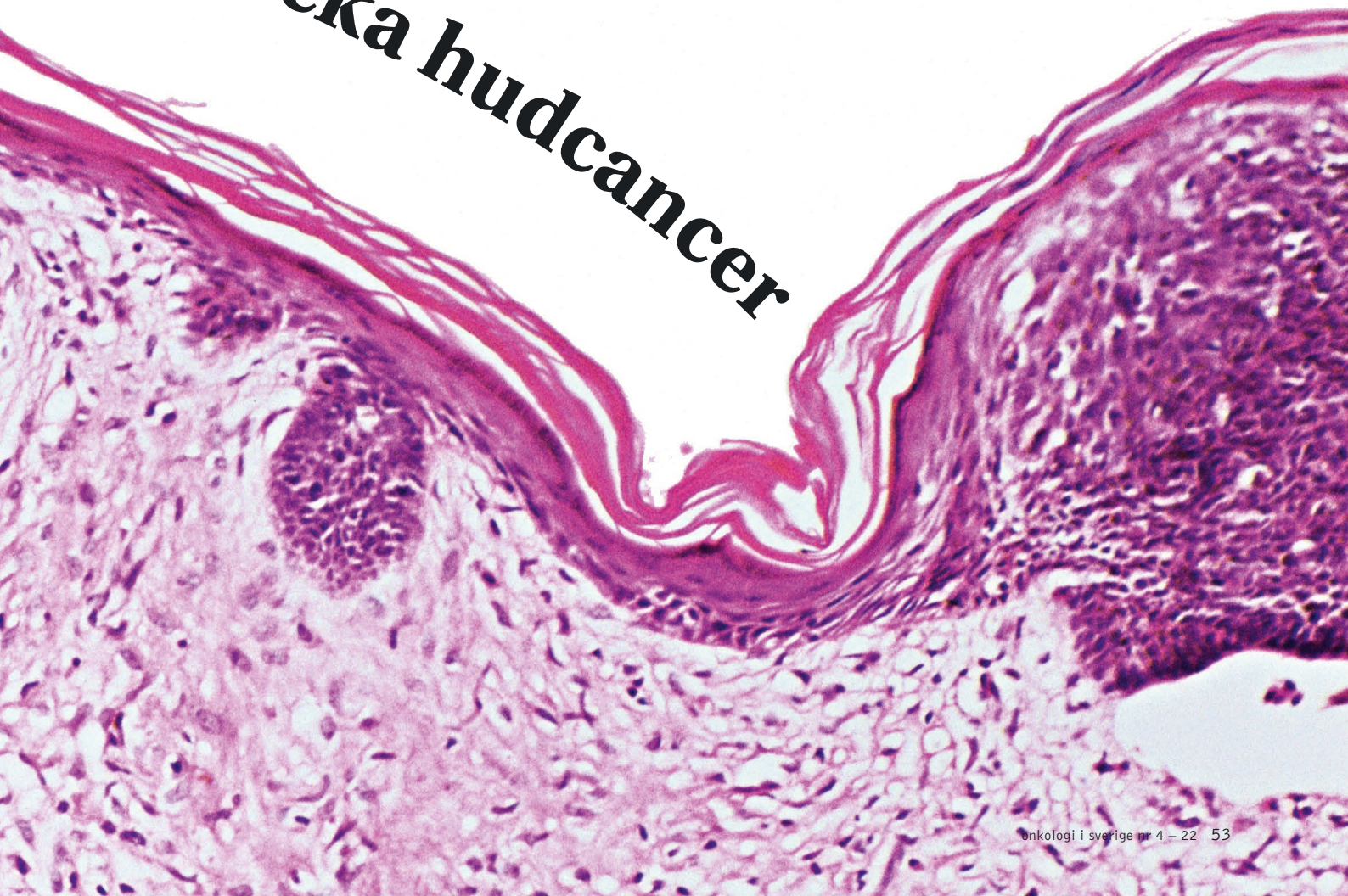
NYTT ICKE-INVASIVT TILLVÄGÅNGSSÄTT

En av de lovande metoderna för att diagnostisera hudcancer på ett icke-invasivt sätt är att leta efter cancerassocierade biomarkörer på hudytan. För närvarande finns det olika biomarkörer som är förknippade med hudcancer såsom genmutationer (till exempel BRAF-mutation)¹, uppreglering av cytokiner såsom interleukin 6 (IL-6) eller interferongamma (IFN- γ).³ Men majoriteten av dessa biomarkörer är föreningar med hög molekylvikt (HMV) och därför är deras diffusion genom hudbarriären, säkerställd av hudens yttersta lager, *stratum corneum*, starkt begränsad.

Malignt melanom utvecklas vid basalmembranet i epidermis.⁴ Härifrån måste biomarkörerna som finns omkring melanom, det vill säga tumörmikromiljö (TME), passera flera hudlager inklusive den tuffaste barriären, stratum corneum, för att nå hudytan. Inom det topiska läkemedelsleveranssamhället är det välkänt att endast små molekyler med en molekylvikt under 500 Da kan diffundera genom stratum corneum.⁵ Dock kan HMV-föreningar ändå nå hudens yta genom differentiering av keratinocyter, vilket leder till att keratinocyter omvandlas till korneocyter i det yttersta hudlagret och till slut avlägsnas från hudytan. Utsöndringen av korneocyterna tar två till fyra veckor⁶, vilket är fördröjningstiden för HMV-hudcancerbiomarkörer att nå hudytan. Å andra sidan kan LMV-biomarkörer diffundera till hudytan inom några timmar. Därför ligger fokuset av det arbetet just på icke-invasiv extraktion och analys av LMV-biomarkörer som är relaterade till hudcancer.

Som utgångspunkt har vi föreslagit förhållandet mellan tryptofan (Trp; Mw=204,22 Da) till kynurenin (Kyn; Mw=208,22 Da) som en potentiell hud-

upptäcka hudcancer



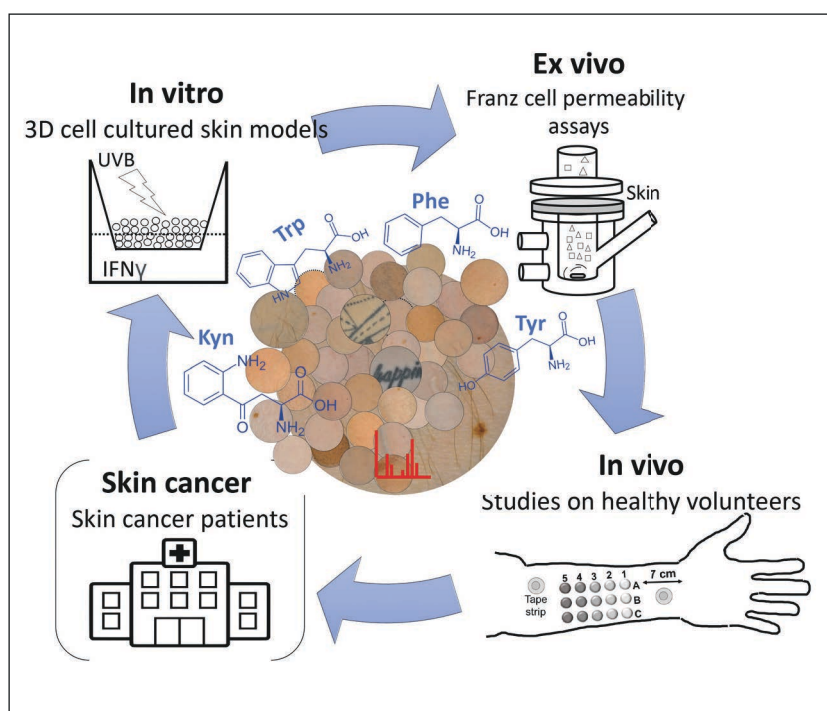
cancerbiomarkör för icke-invasiv diagnostik. Tryptofan är en essentiell aminosyra, som erhålls via kosten och metaboliseras vidare i vår kropp via flera metaboliska banor: dekarboxylering till tryptamin, proteinsyntes, serotoninbana och kynureninbana.⁷ Trots Trp-inblandning i olika metaboliska processer, kataboliseras majoriteten av Trp till Kyn av tre hastighetsbegränsande enzymer: indolamin 2,3-deoxygenas 1 (IDO1) och 2 (IDO2), och tryptofan 2,3-dioxygenas (TDO). Trp katabolism till Kyn av IDO1 erkänns alltmer som en viktig TME-faktor som förmedlar immun-suppression.⁸ Den exakta mekanismen hur förändringarna i Trp-metabolismen initierar/underlättar cancerutveckling och progression är ännu inte klarlagd, men det finns några hypoteser.

Den första är att IDO1 hämmar aktiveringen av effektor-T-celler (Teff) genom extrem utarmning av Trp som i sin tur leder till cellsvältning. Det innebär att Teff-celler som under normala förhållanden rensar ut cancerceller inte kan göra det i TME. Den andra möjliga mekanismen tyder på att uppreglering av Trp-metabolism resulterar i förhöjda Kyn-koncentrationer inom TME. Kyn, som är immunosuppressiv metabolit, binder till arylkolvätereceptor (AHR), vars aktivering och nukleära translokation leder till selektiv expansion av regulatoriska T-celler (Treg), vilket inducerar cancerimmunotolerans.⁸

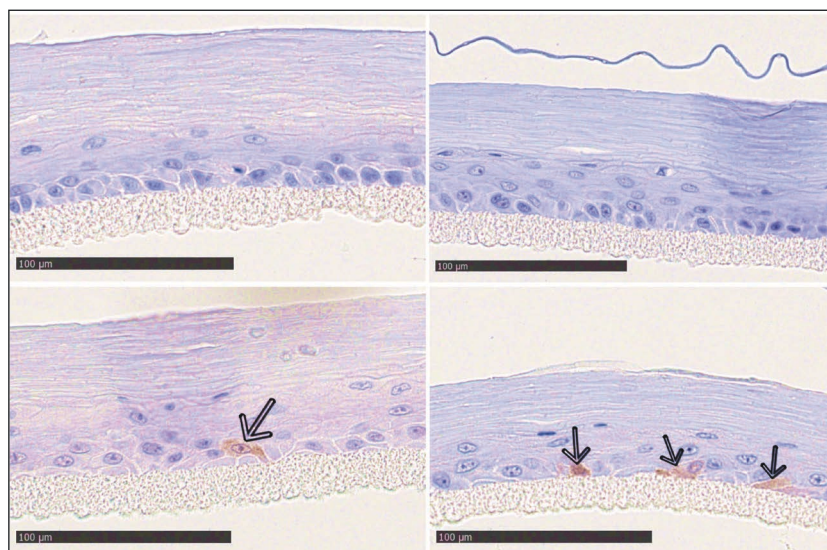
Det är möjligt att det är en liknande mekanism för immunomodulering som förekommer hos gravida kvinnor, där IDO1 har visat sig vara starkt uppreglerad i moderkakan, vilket i sin tur inducerar immunotolerans mot fostret.⁹

Såvitt vi vet har förhållandet mellan Trp och Kyn (Trp/Kyn) hittills endast bestämts i blodet av melanompatienter. Dock lider denna bedömning av Trp/Kyn-förhållandet i blodet av hög utspädning av Kyn som genereras inom TME. Ändå visade även en liten förändring av Trp/Kyn förhållandet i blodet att melanompatienter med minskade Trp/Kyn-förhållande har lägre överlevnadsgrad.¹⁰ Dessutom har IDO1-enzymet visats vara uppreglerat i minst 50 procent av melanomvävnaderna¹¹, och starkt uttryck av TDO-enzym har upptäckts i uvealt melanom.¹²

Sammanfattningsvis tyder detta på



Figur 1. Schematisk beskrivning av studiedesign för icke-invasiv hudcancerdiagnostisering.

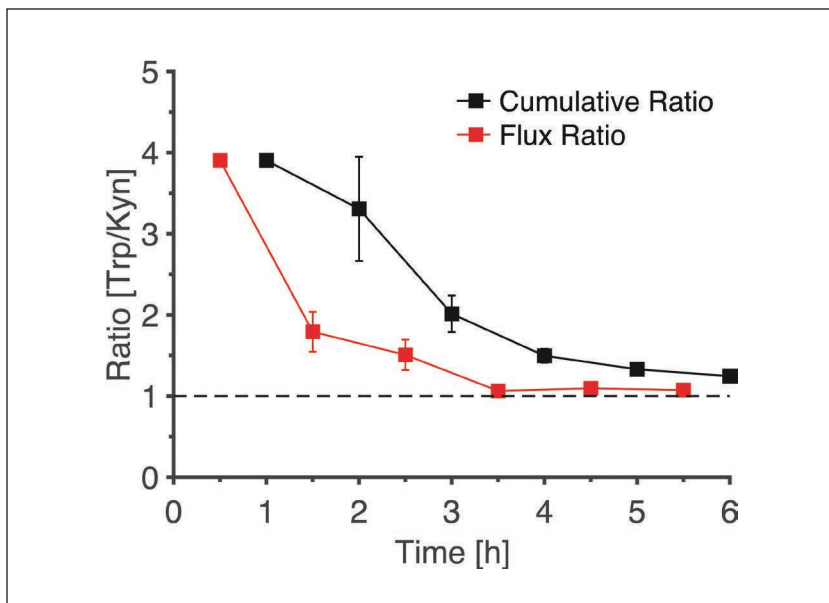


Figur 2. Detektion av IDO1 enzym med immunokemisk färgning av *in vitro* 3D-celldlade human epidermis.¹³

att extraktion och analys av Trp och Kyn och bestämning av Trp/Kyn-förhållandet verkligen har en stor potential att användas för icke-invasiv melanomdiagnos. Å andra sidan, baserat på en begränsad data om uttryck av IDO1 i melanomvävnader, verkar det som att utarmning av Trp och förhöjning av Kyn inom TME inte alltid äger rum. Detta understryker ett behov av att upptäcka andra LMV-biomarkörer utöver Trp och Kyn.

UPPMUNTRANDE RESULTAT

Vi har genomfört en serie av *in vitro*-experiment med 3D-celldlade modeller, *ex vivo* Franz cellpermeabilitet experiment på grishud och *in vivo*-experiment på friska frivilliga (se Figur 1) för att testa genomförbarhet av vår idé. Resultaten från dessa studier uppmuntrar oss att gå vidare och arbeta för att påbörja studie på hudcancerpatienter.



Figur 3. Förhållandet mellan tryptofan och kynurenin (Trp/Kyn) bestämd från *ex vivo*-modell genom att använda kumulativa mängder (svart) och motsvarande flöden (rött) som funktion av extraktionstiden.^{15, 16}



Figur 4. Olika extraktionsmaterial (hydrogeler, stärkelsefilm, bomullspinne, kubiska flytande kristaller) som har använts för sampling av LMV-biomarkörer.^{14, 17}

In vitro 3D-celldlade hudmodeller.

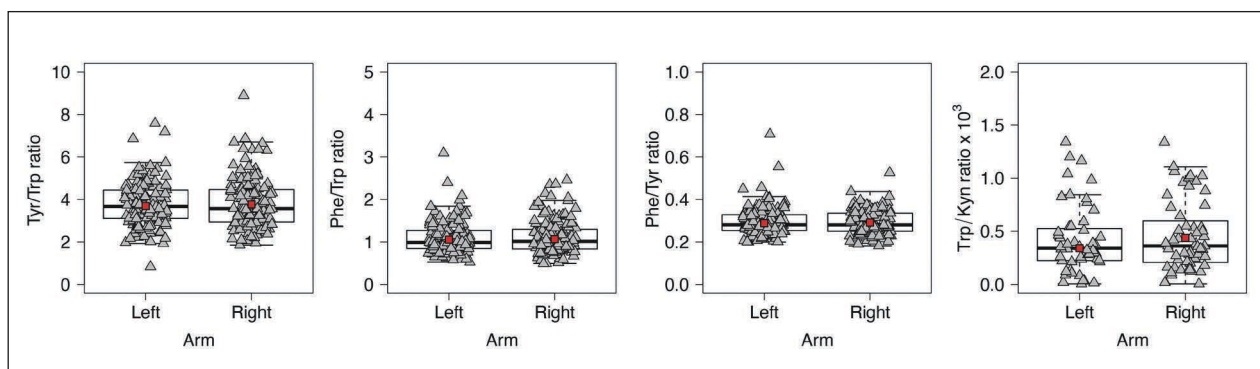
Vi har simulerat flera olika tillstånd som är relevanta för hudcancer genom att arbeta med 3D-celldlade hudmodeller. Till exempel har vi stimulerat hudmodeller med pro-inflammatoriskt cytokin IFN- γ , exponerat hudmodeller mot UVB-strålning etc. Nivåer av Trp och Kyn i celldlingsmedia har mätts före och efter behandlingarna. Våra resultat har visat att uppreglering av IDO1 med INF- γ -behandlingen (se Figur 2) leder till utarmning av Trp och förhöjning av Kyn-nivåer.¹³ Det är viktigt att påpeka att det var 30–100 gångers förändring i Trp/Kyn-förhållandet vid hudmodellbehandling med INF- γ jämfört med en obehandlad kontroll-hudmodell.^{13, 14} Dessa resultat indikerar att Trp/Kyn-förhållandet inom TME kan ändras med en storleksordning.

Ex vivo Franz-cell permeabilitetstudie.

Vi har gjort *ex vivo*-permeabilitetstudier med Franz celluppsättning för att karakterisera diffusionshastigheterna för Trp och Kyn genom grishud. Målet med denna studie var att förstå om förhållandet mellan biomarkörer i djupare hudlager/blod reflekteras på hudytan. Denna studie har visat att diffusionen av Trp och Kyn genom huden är ganska likartad och är relativt långsam. Däremot kan Trp/Kyn-förhållandet påverkas av befintlig Trp i de övre hudlagren som en del av naturlig fuktfaktor (NMF). Studien har också visat tydligt att Trp/Kyn-förhållandet kan påverkas av extraktionstiden (se Figur 3), närvaro av mikrobiota på huden och NMF-komponenter.^{15, 16} Utöver det har vi också undersökt tillämpning av omvänd jontofores som en potentiell teknik för att underlätta och öka extraktion av LMV-biomarkörer. Våra resultat har visat att tillämpningen av omvänd jontofores resulterade i signifikant ökning av extraktionen av Trp och Kyn med en storleksordning eller mer jämfört mot extraktion genom passiv diffusion.¹⁶ Alla dessa observationer från *in vitro*- och *ex vivo*-studier togs i beaktande vid utformningen av våra *in vivo*-studier.

In vivo-studier på friska frivilliga.

Först testade vi möjligheten att på ett icke-invasivt sätt samla in Trp och Kyn i förhållande till två andra aminosyror, fe-



Figur 5. Jämförelse av förhållanden mellan tyrosin (Tyr), fenylalanin (Phe), tryptofan (Trp) och kynurenin (Kyn) bestämda i proverna som tagits från huden på vänster och höger arm *in vivo*.¹⁷

nylalanin (Phe) och tyrosin (Tyr), från huden hos friska frivilliga. Anledningen till att inkludera Phe och Tyr i analysen var på grund av att dessa två aminosyror också är en del av hudens NMF med liknande mängder som Trp. Vi har antagit att analysen av ett högre antal NMF-komponenter kan bidra till att minska och samtidigt bättre förstå den biologiska variationen mellan individerna när det gäller insamlad Trp. Dessa potentiella biomarkörer för hudcancer samlades in från friska frivilliga genom flera olika icke-invasiva provtagningsmetoder så som applicering av agaros- och kitosanhydrogeler, stärkelsefilmer, torkning av huden med bomullspinne och tejpavlägsningsteknik (se Figur 4).¹⁴ Resultaten av denna studie har visat att alla använda provtagningsmetoder kunde samla Trp, Phe och Tyr, medan Kyn upptäcktes endast i 20 procent av proverna. I de flesta fall var mängden uppsamlad Kyn under kvantifieringsgränsen (LOQ <15 pmol). Å andra sidan var mängderna av Trp, Phe och Tyr flera hundra gånger högre jämfört med Kyn. Utöver det, har dessa aminosyror visat en stark ömsesidig korrelation ($R^2 > 0.7$). Studien resulterade i ett mycket robust förhållande mellan dessa analyter på frisk hud (se Figur 5).¹⁴

I vår nästa *in vivo*-studie på friska frivilliga har vi introducerat kubiska flytande kristaller för att se om dessa kan samla in större mängder av analyter i förhållande till hydrogeler och på så sätt underlätta deras kvantifiering. I en förenklad vy kan kubiska flytande kristaller ses som 3D-strukturer med sammankopplade, men inte korsande, vatten- och oljekanal. På grund av sin unika struktur tillåter kubiska flytande kristaller insamling av både hydrofila och hy-

drofoba biomarkörer. Utöver det har kubiska flytande kristaller en förmåga att bättre anpassa sig till hudtopografi, vilket främjar uppsamlingen av biomarkörer från ojämna hudområden och även förbättrar reproducerbarheten av provtagningsproceduren. Resultaten från denna studie har visat att kubiska flytande kristaller kan samla in cirka två gånger högre mängder av biomarkörer jämfört med hydrogelerna.¹⁷ För övrigt noteras att applicering av kubiska kristallina faser ökar chansen att upptäcka Kyn till 50 procent. Mängden av Kyn uppsamlad från huden hos friska individer bestämdes att vara i intervallet 2–20 pmol/cm². Sammantaget har våra resultat visat att icke-invasiv extraktion och analys av LMV biomarkörer påverkas av många olika faktorer, till exempel låga mängder av Kyn, bidrag från NMF-komponenter, extraktionstiden, extraktionsmaterial och så vidare. Icke desto mindre, om storleken på förändringen i förhållandet mellan analyter, som bestämdes från 3D-celldlade hudmodeller, reproduceras i hudcancerlesioner, kan dessa förändringar lätt fångas med flera provtagningsmetoder använda i våra studier.

FRAMTIDA RIKTNING OCH PERSPEKTIV

Vi fortsätter arbetet inriktat på vidareutveckling och optimering av icke-invasiva metoder för uppsamling av LMV-biomarkörer och utredning av hudcancerutveckling. Vi strävar också efter att öka vår kunskap samt att bredda listan över potentiella LMV-biomarkörer relaterade till hudcancer och därför har vi påbörjat studier av metabolom som finns på huden. Vi tror att endast genom att kunna samla in och analysera LMV-biomarkörer från huden på ett robust,

noggrant och reproducerbart sätt, visat på friska individer, kommer vi att kunna hantera mycket mer varierande och komplexa situationer hos patienter med hudcancer. Därför studerar vi möjliga faktorer som kan påverka en robust detektering av LMV-biomarkörer på huden, till exempel effekten av svett, kost, hudfärg och liknande genom att använda *in vitro*- och *ex vivo*-modeller samt *in vivo*-studier på friska frivilliga innan vi kan gå vidare och påbörja studien på hudcancerpatienter.

REFERENSER:

1. Gil, J.; Betancourt, L. H.; Pla, I.; Sanchez, A.; Appelqvist, R.; Miliotis, T.; Kuras, M.; Oskolas, H.; Kim, Y.; Horvath, Z., Clinical protein science in translational medicine targeting malignant melanoma. *Cell biology and toxicology* 2019, 35 (4), 293-332.
2. Ferris, L. K.; Gerami, P.; Skelsey, M. K.; Peck, G.; Hren, C.; Gorman, C.; Frumento, T.; Siegel, D. M., Real-world performance and utility of a noninvasive gene expression assay to evaluate melanoma risk in pigmented lesions. *Melanoma Res* 2018, 28 (5), 478-482.
3. Krause, D.; Suh, H.-S.; Tarassishin, L.; Cui, Q. L.; Durafour, B. A.; Choi, N.; Bauman, A.; Cosenza-Nashat, M.; Antel, J. P.; Zhao, M.-L., The tryptophan metabolite 3-hydroxyanthranilic acid plays anti-inflammatory and neuroprotective roles during inflammation: role of hemeoxygenase-1. *The American journal of pathology* 2011, 179 (3), 1360-1372.
4. Shain, A. H.; Bastian, B. C., From melanocytes to melanomas. *nature reviews Cancer* 2016, 16 (6), 345-358.
5. Bos, J. D.; Meinardi, M. M., The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Experimental Dermatology: Viewpoint* 2000, 9 (3), 165-169.
6. Walters, K. A., *Dermatological and transdermal formulations*. CRC Press: 2002; Vol. 119.

7. Zulpait, R.; Miknevicius, P.; Leber, B.; Strupas, K.; Stiegler, P.; Schemmer, P., Tryptophan metabolism via kynurenine pathway: role in solid organ transplantation. International journal of molecular sciences 2021, 22 (4), 1921.

8. Triplett, T. A.; Garrison, K. C.; Marshall, N.; Donkor, M.; Blazek, J.; Lamb, C.; Qerqez, A.; Dekker, J. D.; Tanno, Y.; Lu, W.-C., Reversal of indoleamine 2, 3-dioxygenase-mediated cancer immune suppression by systemic kynurenine depletion with a therapeutic enzyme. Nat. Biotechnol. 2018, 36 (8), 758-764.

9. Broekhuizen, M.; Danser, A. J.; Reiss, I. K.; Merkus, D., The function of the kynurenine pathway in the placenta: A novel pharmacotherapeutic target? International Journal of Environmental Research and Public Health 2021, 18 (21), 11545.

10. Geisler, S.; Mayersbach, P.; Becker, K.; Schennach, H.; Fuchs, D.; Gostner, J. M., Serum tryptophan, kynurenine, phenylalanine, tyrosine and neopterin concentrations in 100 healthy blood donors. Pteridines 2015, 26 (1), 31-36.

11. Chevolet, I.; Speckaert, R.; Haspeslagh, M.; Neyns, B.; Krüse, V.; Schreuer, M.; Van Gele, M.; Van Geel, N.; Brochez, L.; Peritumoral indoleamine 2, 3-dioxygenase expression in melanoma: an early marker of resistance to immune control? British Journal of Dermatology 2014, 171 (5), 987-995.

12. erai, M.; Londin, E.; Rochani, A.; Link, E.; Lam, B.; Kaushal, G.; Bhushan, A.; Orloff, M.; Sato, T., Expression of tryptophan 2, 3-dioxygenase in metastatic uveal melanoma. Cancers 2020, 12 (2), 405.

13. Gustafsson, A.; Prgomet, Z.; Jankovskaja, S.; Ruzgas, T.; Engblom, J.; Ohlsson, L.; Gyorloff Wingren, A., Effect of IFN-gamma on the kynurenine/tryptophan ratio in monolayer-cultured keratinocytes and a 3D reconstructed human epidermis model. J Dermatol Sci 2020, 99 (3), 177-184.

14. Jankovskaja, S.; Morin, M.; Gustafsson, A.; Anderson, C. D.; Lehocski, B.; Engblom, J.; Bjorklund, S.; Rezeli, M.; Marko-Varga, G.; Ruzgas, T., Non-Invasive, Topical Sampling of Potential, Low-Molecular Weight, Skin Cancer Biomarkers: A Study on Healthy

Volunteers. Anal. Chem. 2022, 94 (15), 5856-5865.

15. Jankovskaja, S.; Engblom, J.; Rezeli, M.; Marko-Varga, G.; Ruzgas, T.; Bjorklund, S., Non-invasive skin sampling of tryptophan/kynurenine ratio in vitro towards a skin cancer biomarker. Sci Rep 2021, 11 (1), 678.

16. Morin, M.; Bjorklund, S.; Jankovskaja, S.; Moore, K.; Delgado-Charro, M. B.; Ruzgas, T.; Guy, R. H.; Engblom, J., Reverse Iontophoretic Extraction of Skin Cancer-Related Biomarkers. Pharmaceutics 2022, 14 (1), 79.

17. Morin, M.; Jankovskaja, S.; Ruzgas, T.; Henricson, J.; Anderson, C. D.; Brinte, A.; Engblom, J.; Bjorklund, S., Hydrogels and Cubic Liquid Crystals for Non-Invasive Sampling of Low-Molecular-Weight Biomarkers—An Explorative In Vivo Study. Pharmaceutics 2022, 14 (2).

MAXIM MORIN, PHD, BIOFILMS – RESEARCH CENTER FOR BIOINTERFACES, INSTITUTIONEN FÖR BIOMEDICINSK VETENSKAP, MALMÖ UNIVERSITET, MAXIM.MORIN@MAU.SE



SKAIDRE JANKOVSKAJA, PHD, BIOFILMS – RESEARCH CENTER FOR BIOINTERFACES, INSTITUTIONEN FÖR BIOMEDICINSK VETENSKAP, MALMÖ UNIVERSITET, SKAIDRE.JANKOVSKAJA@MAU.SE



NT-rådet rekommenderar¹

JEMPERLI

dostarlimab

En immunterapi för patienter med recidiverande eller avancerad endometrieccancer med dMMR/MSI-H²

Testa dMMR/MSI-H för att identifiera patienter som är lämpliga för behandling med JEMPERLI

▼ Detta läkemedel är föremål för utökad övervakning.

JEMPERLI (dostarlimab), 10 ml koncentrat till infusionsvätska, lösning, innehåller 500mg. Rx, EF, ATC-kod: L01FF07, Monoklonala antikroppar och antikroppsläkemedelskonjugat. **Indikationer:** JEMPERLI är indicerat som monoterapi för behandling av vuxna patienter med recidiverande eller avancerad endometrieccancer med dMMR (deficient mismatch repair) eller hög mikrosatellitinstabilitet (MSI-H) som har progredierat under eller efter tidigare platinainnehållande behandling. **Dosering:** Rekommenderad dos som monoterapi är 500 mg dostarlimab var 3:e vecka i 4 cykler följt av 1 000 mg var 6:e vecka i alla efterföljande cykler. Behandlingen bör fortsätta tills sjukdomsprogression eller oacceptabel toxicitet uppstår. Behandling med JEMPERLI ska initieras och övervakas av läkare med erfarenhet av cancerbehandling. **Varningar och försiktighet:** Immunrelaterade biverkningar, som kan vara allvarliga eller dödliga, kan förekomma hos patienter som behandlas

med antikroppar som blockerar programmerat celledödsprotein-1/programmerad dödligand 1 (PD-1/PD-L1), inklusive dostarlimab. **Immunrelaterade biverkningar** kan förekomma i alla organ eller vävnader och uppträder vanligen under behandling med PD 1/PD L1-blockerande antikroppar, men symtomen kan också visa sig efter avslutad behandling. **Infusionsrelaterade reaktioner** Dostarlimab kan orsaka infusionsrelaterade reaktioner som kan vara allvarliga (se avsnitt Biverkningar). Vid allvarliga (grad 3) eller livshotande (grad 4) infusionsrelaterade reaktioner ska infusionen avbrytas och behandlingen sättas ut permanent. För fullständig beskrivning av information och pris, se www.fass.se. Datum för översyn av produktresumén 2022-06-08. GSK AB, Box 516, 169 29 Solna, telefon: 08-638 93 00, se.gsk.com. Om du vill rapportera en biverkning på något av våra läkemedel eller vacciner så kan du kontakta oss på följande sätt: Webformulär: se.gsk.com/biverkning. Telefon: 08-638 93 00 (be om att bli kopplad till Biverkningsenheten).

dMMR=deficient mismatch repair; MSI-H=hög mikrosatellitinstabilitet.

Referenser: 1. NT-rådets rekommendation för PD-(L)1-hämmare. Janusinfo. 2. JEMPERLI (dostarlimab). Produktresumé.



Varumärken ägs av eller licensieras till GSK-koncernen.
©2022 GSK eller dess licensgivare.
PM-SE-DST-ADVT-220001, 202208

GSK, Box 516, 169 29 Solna. 08-638 93 00, se.gsk.com

Jemperli
(dostarlimab) Injection 500 mg