

Elektroporation, elektrokemoterapi, calciumelektroporation og genterapi som led i kræftbehandlingen

Julie Gehl^{1,2} & Stine Krog Frandsen¹

Cellemembraner kan permeabiliseres ved hjælp af korte elektriske pulse, hvilket kaldes elektroporation. Det kan udnyttes til at øge optaget af kemoterapi (elektrokemoterapi), men også andre molekyler, der medfører celledød som f.eks. calcium (calciumelektroporation). Endvidere kan elektroporation udnyttes til genterapi. Når man anvender elektroporation til øgning af optaget af molekyler, er der tale om reversibel elektroporation, det vil sige, at membranen forbliver permeabiliseret i nogle minutter og derefter lukker, og cellens homøostase genoprettes. Med kraftigere pulsparametre opnås der irreversibel elektroporation (**Figur 1**).

Det er påvist for både elektrokemoterapi, calciumelektroporation og irreversibel elektroporation, at metoderne virker bredt over forskellige cancerhistologier, og også at normale celler er mere modstandsdygtige over for behandlingerne end maligne celler.

Det elektriske felt skal omfatte tumoren, og dette tilvebringes ved hjælp af elektroder, som placeres i og omkring tumoren. Således har teknologiudviklingen haft betydning for den rækkefølge, som ses i den kliniske udvikling. Initialt har man arbejdet med kutane tumorer, som var tilgængelige med enkle elektroder, og da teknikken viste sig at være effektiv, er udviklingen af brug af elektroder gået videre til anvendelse i indre organer. En parallel udvikling har været, at hvor man i starten alene behandlede palliativt, er teknologien med ballast fra de initiale forsøg nu også under afprøvning som primærbehandling eller som neoadjuverende behandling.

I denne artikel gives der et overblik over elektroporationsbaserede behandlinger og deres nuværende og mulige fremtidige anvendelser.

ELEKTROPORATION

Når et eksternt elektrisk felt overstiger en tærskelværdi, trænger der vand ind i lipidlaget og danner porer i cellemembranen. Det er det elektriske felt og ikke den strøm, som går i vævet, der afgør, om permeabiliseringen finder sted. Typisk anvendes der derfor meget korte højvoltagepulser, hvorved det nødvendige felt opnås, f.eks. otte pulser a 100 µs med et felt på 1 kV/cm (påtrykt spænding i V divideret med elektrodeafstanden). Reversibel elektroporation er en nontermisk behandlingsme-

tode, idet temperaturudviklingen er meget begrænset på grund af de elektriske pulses korte varighed af.

Elektroporation, i særdeleshed i kombination med bleomycin, kan forårsage, at tumorkar kollaberer umiddelbart ved permeabilisering [1]. Dette betyder, at behandlingen har en antivaskulær effekt, som er nyttig ved blødende tumorer og formentlig også medvirker til den høje responsrate.

ELEKTROKEMOTERAPI

Bleomycin er langt den mest anvendte type kemoterapi og kan gives intratumoralt, hvis der skal behandles mindre områder, eller intravenøst ved flere tumorer eller større behandlingskrævende områder [2]. Et molekyle bleomycin kan forårsage 10-15 DNA-strengsbrud og er dermed et meget effektivt kemoterapeutikum, men da molekylet kun vanskeligt passerer cellemembranen under normale omstændigheder har anvendelsen i klinikken været begrænset til få indikationer. Ved elektroporation kan cytotoxiciteten øges flere hundrede fold. Tumoredød sker primært som apoptose igangsat af multiple DNA-strengsbrud. Ved elektrokemoterapi kan man med almindeligt anvendte doser af systemisk bleomycin opnå en meget kraftigt øget effekt i det tumorområde, som elektroporeres [3]. Den kraftige øgning af cytotoxiciteten er desuden baggrund for, at elektrokemoterapi kan gives som en enkeltbehandling. Elektrokemoterapi af kutane tumorer indgår i nationale og internationale retningslinjer [4, 5].

CALCIUMELEKTROPORATION

Calcium er et vigtigt molekyle i en række cellulære sig-

STATUSARTIKEL

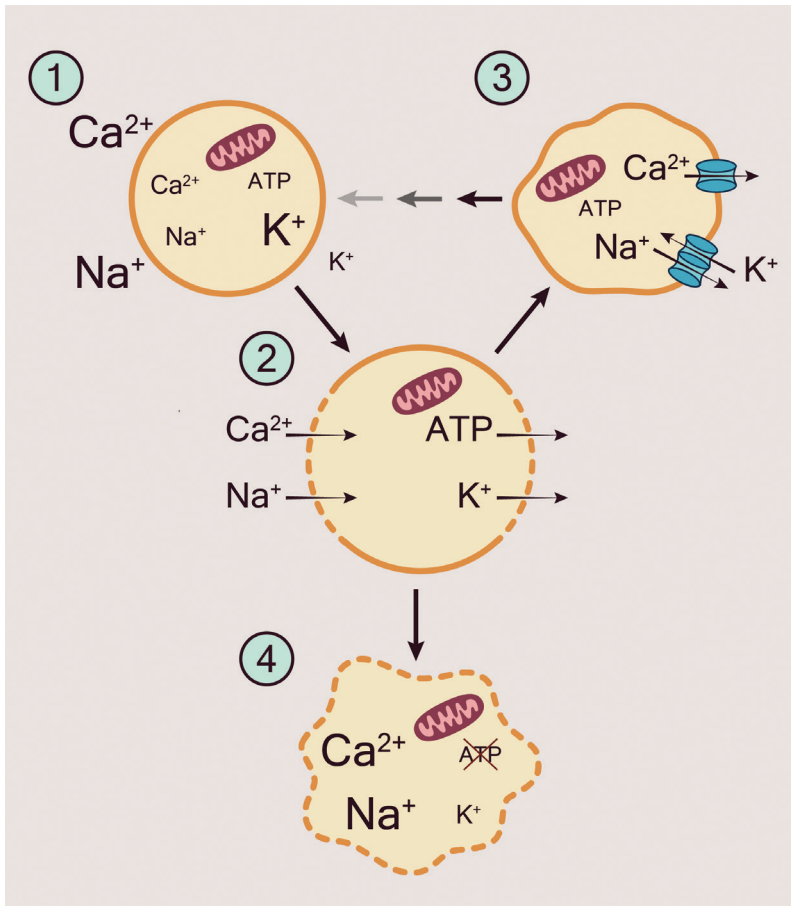
1) Center for Experimental Drug and Gene Electrotransfer, Klinisk Onkologisk Afdeling og Palliative Enheder, Sjællands Universitetshospital, Roskilde
2) Institut for Klinisk Medicin, Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet

Ugeskr Læger
2019;181:V08190461

HOVEDBUDSKABER

- ▶ Elektroporation er en metode til permeabilisering af cellemembraner, og den anvendes bl.a. til at øge cellulært optag af kemoterapi, calcium og DNA/RNA.
- ▶ Studier med calciumelektroporation har vist effekt på kutane metastaser og recidiv af hoved-hals-cancer. Forsøg med andre cancerformer er i gang.
- ▶ Det forventes, at elektroporationsbaserede behandlinger vil vinde indpas i en række specialer som en modalitet i kræftbehandlingen.

FIGUR 1 / Elektroporation. 1. Cellen før elektroporation. 2. Ved elektroporation dannes der i løbet af få nanosekunder permeabiliserede områder i cellemembranen, hvorigennem molekyler kan passere. Der vil være influks af bl.a. Ca^{2+} og Na^+ og effluks af bl.a. adenosintrifosfat (ATP) og K^+ . Hvis der tilføres f.eks. kemoterapi i form af bleomycin vil den intracellulære koncentration kunne øges betragteligt. 3. Ved reversibel elektroporation gendannes membranstrukturen i løbet af minutter, og cellen gendanner homøostasen bl.a. ved anvendelse af Na^+ / K^+ -ATPase, og Ca^{2+} -ATPase samt produktion af ATP. 4. Ved irreversibel elektroporation anvendes der et kraftigere elektrisk felt og flere pulser, og den permeabilisering, som opstår, er af et omfang, som betyder, at cellens membran ikke gendannes, før cellen går til.



nalveje, og den intracellulære calciumkoncentration reguleres nøje. Ved elektroporation kan man dramatisk øge influks af calcium, hvilket fører til tumorcelledød under nekrose associeret med akut adenosintrifosfat (ATP)-depletering [6] forårsaget af øget ATP-forbrug og nedbrud af mitokondrier pga. calciumophobning i disse. Celledød pga. calciumelektroporation er således nekrotisk celledød. Efter det første studie i 2012 [6] er en række prækliniske studier kommet til, hvor man videre har underbygget virkningsmekanismer og resultater [7, 8]. Det første kliniske forsøg var et mindre, dobbeltblindet, randomiseret forsøg, hvor man sammenlignede én behandling med henholdsvis elektrokemoterapi og calciumelektroporation og fandt komplette remissionsrater ved seks måneders opfølgning på henholdsvis 68% og 66% [9]. Siden er calciumelektropora-

tion blevet undersøgt i et mindre studie med patienter, som havde recidiv af hoved-hals-cancer, tidligere havde fået fuld strålebehandling og var inoperable [10]. Der var tale om et lille studie med seks patienter, men responsraten var 50%, og én af de seks patienter opnåede et langvarigt komplet respons [10] (Figur 2). Yderligere er der igangværende studier med patienter, der har kolorektal cancer og får calciumelektroporation som henholdsvis pallierende behandling og præoperativ behandling for at stimulere et immunrespons (Clinicaltrials.gov NCT03542214 og NCT03694080). En interessant observation både præklinisk og klinisk var, at calciumelektroporation kan inducere et systematisk immunrespons [11, 12] (Figur 3).

En fordel ved calciumelektroporation er, at der er tale om en enkel og billig kræftbehandling, hvilket ikke alene har betydning i det danske sundhedssystem, men i særdeleshed i den globale udfordring, der ligger i at sikre behandling til patienter, også i lav- og mellemindkomstlande, hvor flertallet af verdens kræftpatienter befinder sig.

GENTERAPI

Elektroporation kan tillige anvendes ved genterapi, hvor det intracellulære optag af DNA (eller RNA og andre nukleotider) øges efter elektroporation [13]. Da elektroporationsudstyr er tilgængeligt til klinisk brug, er det relativt enkelt at anvende teknikken i klinisk øjemed. Der foreligger spændende resultater fra genterapi med interleukin (IL)-12 hos patienter med dissemineret malignt melanom [14], og herhjemme er der foretaget forsøg med genterapi med en integrinhæmmer [15]. Kombinationer med elektrokemoterapi og genterapi foregår p.t. i veterinære studier, men vil sandsynligvis også blive afprøvet i humane studier. Der vil være en række muligheder for at kombinere elektrokemoterapi og/eller calciumelektroporation (der forårsager tumorcelledrab og eksponering af antigener) med lokal ekspresion af immunstimulerende cytokiner såsom IL-12. Elektroporation anvendes desuden til at øge effekten af DNA-vacciner, hvilket vil få betydning for både cancerforebyggelse og terapeutiske vacciner [16].

IRREVERSIBEL ELEKTROPORATION

Ved irreversibel elektroporation anvendes der kraftigere pulser (f.eks. en pulsamplitude på 3 kV/cm i stedet for 1 kV/cm, som er typisk ved reversibel elektroporation), og derudover anvendes der væsentligt flere pulser. Irreversibel elektroporation anvendes til bl.a. behandling af prostatacancer, pancreascancer og levermetastaser og undersøges i Danmark til anvendelse ved bl.a. lokalt avanceret pancreascancer [17].

EFFEKTEN AF ELEKTROPORATIONSBASEDE BEHANDLINGER PÅ HENHOLDSVIS MALIGN OG NORMALE VÆV

Flere studier tyder på en differential følsomhed mellem maligne og normale væv ved elektroportationsbaserede behandlinger. Dette skyldes formentlig en række faktorer, inklusive en højere grad af permeabilisering i maligne end i benigne celler [18], forskellig følsomhed for kemoterapi og calcium i normale og maligne celler [7, 19, 20] samt forskelle i sensitiviteten i normale endotelceller og i endotelceller i tumorkapillærer [1, 8]. Også klinisk ses der tydeligt forskel på behandlede tumorer og det omgivende raske væv i margin af tumorerne.

BEHANDLING AF KUTANE METASTASER OG PRIMÆRE KUTANE TUMORER

Elektrokemoterapi blev initialt afprøvet hos patienter med kutane metastaser, fordi de første elektroder var enkle og kunne anvendes til dette, samtidig gav studierne med kutane metastaser og primære kutane tumorer viden om elektrokemoterapiens effektivitet på tværs af cancerdiagnoser. Et studie med 691 patienter viste en gennemsnitlig responsrate på 84%, med 68% komplet respons af behandlede læsioner, på tværs af histologier. Ikke overraskende responderer basocellulært karcinom og Kaposi sarkom bedst på behandlingen, men responsraten er også høj for f.eks. metastaser fra brystkræft, malignt melanom og planocellulært karcinom [21]. Elektrokemoterapi af kutane metastaser og som behandling af primær hudcancer, hvor anden behandling ikke er mulig eller har været forsøgt, er nu indført i europæiske retningslinjer [4, 5]. I Danmark har elektrokemoterapi til kutane tumorer været et behandlingstilbud i flere år.

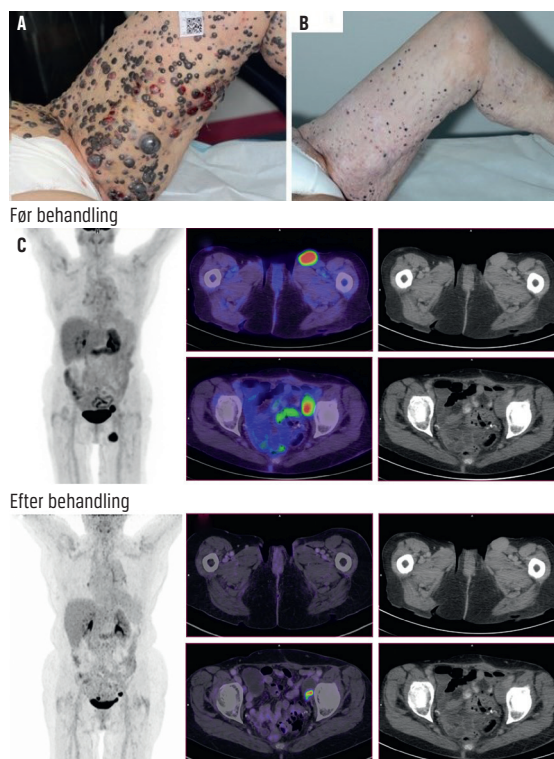
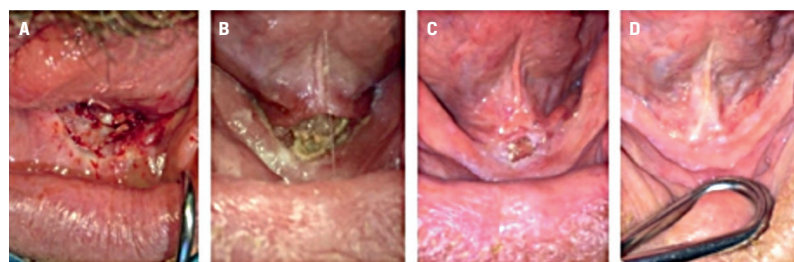
BEHANDLING AF HOVED-HALS-CANCER

Der er nu publiceret flere studier om elektrokemoterapi som behandling for recidiv af hoved-hals-cancer [22, 23] samt et enkelt mindre studie om calciumelektroporation [10]. I en patientgruppe, for hvem yderligere behandlingsmuligheder var udtømt, opnåedes en klinisk responsrate på 56% [22], og 19% af patienterne opnåede komplet klinisk respons efter elektrokemoterapi. I det mindre studie med calciumelektroporation var responsraten 50%, og én ud af seks behandlede patienter opnåede varigt komplet respons. Det mest interessante var, at man i disse studier [10, 22, 23] så varigt komplet respons hos en mindre gruppe patienter med andre ord, at patienter som blev behandlet i pallierende øjemed faktisk opnåede sygdomsfrihed. Figur 2 viser resultatet efter en behandling med calciumelektroporation. De positive resultater har ført til initiering af yderligere studier, og også her vil kombination med immunterapi (*programmed death-ligand 1-hæmmere*) være et næste skridt.

BEHANDLING AF ØSOFAGUSCANCER, KOLREKTALCANCER SAMT PRIMÆRE OG SEKUNDÆRE LEVERTUMORER

Ved hjælp af en elektrode, som kan påsættes skop, kan patienter med tumorer i gastrointestinkanalen behandles [24]. I et mindre studie med patienter, der havde øsofagus-cancer og blev behandlet i palliativt øjemed, så man tumorregression ved gastroskopi hos fem ud af seks behandlede patienter, hos to patienter sås det tillige på PET-MR-skanning [25]. Der er flere studier undervejs om behandling af kolorektalcancer. Her

FIGUR 2 / Inoperabelt, tidligere fuldt strålebehandlet recidiv af planocellulær hoved-hals-cancer. Patienten blev behandlet med calciumelektroporation, opnåede komplet respons og var uden tegn til sygdom over et år efter behandlingen. Ved behandlingen er tumorområdet med margin injiceret med calcium 225 mM, hvorefter elektriske pulser sekventielt er appliceret til området. Behandlingen foregår i universel anæstesi med relaxsation og er kortvarig. **A.** Før behandling. **B.** En måned efter behandling. **C.** To måneder efter behandling. **D.** Fem måneder efter behandling. Fra [10].



FIGUR 3 / Hos en patient med dissemineret malignt melanom, der blev behandlet alene med elektrokemoterapi og calciumelektroporation sås effekt på både behandlede og ubehandlede metastaser som tegn på et systemisk immunrespons. **A.** Før behandling. Multiple kutane metastaser på hele underkøben. **B.** 16 måneder efter behandling, biopsiverificeret komplet respons i behandlede og ikke tidligere behandlede kutane metastaser. **C.** PET-skanning før behandling og ved followup med respons i lymfeknuder i bækkenet, som heller ikke var behandlede. Adapteret fra [12].

behandles både i palliativt øjemed og med neoadjuverende sigte dels for at opnå *downstaging* af tumoren, dels for at inducere et immunrespons mod tumoren for at forsøge at sænke risikoen for senere metastatisk sygdom. Dette er baseret på klinisk observation og prækliniske undersøgelser, som viser immunologisk respons [11, 12].

Behandling af levermetastaser [26] og inoperabelt hepatocellulært karcinom har også vist gode resultater. Endvidere er de første studier om pancreascancer blevet publiceret [27] med fund af tumorregression hos et flertal af patienterne. Initiale studier er foretaget med åben kirurgi, men det forventes, at perkutan behandling vil blive udviklet yderligere.

BEHANDLING AF KNOGLEMETASTASER OG BLØDDELSTUMORER

Ved hjælp af længere og stivere elektroder er det lykkedes at behandle knoglemetastaser i både columna og ekstremiteter [28], og denne teknik ventes videreudviklet i de kommende år. Ligeledes er der begyndende resultater med behandling af sarkomer, når det gælder både elektrokemoterapi og irreversibel elektroporation. Der er kasuistisk beskrevet et tilfælde af tumorsvind og symptomlindring efter elektrokemoterapi for aggressiv fibromatose [29].

BIVIRKNINGER

Applikation af de elektriske pulse kræver bedøvelse – i tilfælde af mindre tumorer i huden er lokalbedøvelse sufficient [2], mens f.eks. behandling af hoved-halscancer kræver generel anæstesi og relaksation [23], og behandling af kolorektalcancer kan foregå under propofolsedation. De elektriske pulse vil medføre kortvarig kontraktion af den underliggende muskulatur. Bleomycin medfører kun begrænset hæmatologisk suppression, men kan give subfebrilia samme dag og hos enkelte patienter kvalme. Hyperpigmentering er en kendt bivirkning af bleomycin og kan ses ved elektrodeindstikstederne. Derudover kan bleomycin give lungefibrose, men risikoen for dette er proportional med dosis, og stoffet gives kun en eller få gange ved

elektrokemoterapi, hvilket fører til ringe risiko for denne bivirkning. Efter elektrokemoterapi for kutane metastaser er det påvist, at 26% har oplevet smerter efter behandlingen [30], omend flertallet af patienterne (74%) ikke havde smerteproblemer efter behandlingen. Patienter, der er i risiko for at få postoperative smerter, kan identificeres før behandlingen, idet de har en høj smertescore allerede da [30].

PERSPEKTIVERING

Elektroporation er en platformsteknologi. Elektroder udvikles til forskellige modaliteter, og det vil være essentielt, at feltberegninger og procedurer følger med, således at dosis i vævet kendes og er præcis. Både elektrodegeometri, appliceret spænding, pulslængde, frekvens og pulsform kan varieres, og der vil være behov for grundig beskrivelse og forskning i klinisk udcome ved nye indikationer og nye tekniske løsninger. Ligeledes vil der være mange muligheder for kombinationsbehandling.

Det er væsentligt, at behandlinger med elektroporation foretages af relevante speciallæger, f.eks. plastikkirurger, øre-næse-halskirurger, gastrokirurger, dermatologer eller onkologer og i forlængelse af et tværfagligt samarbejde og beslutning fra multidisciplinære teamkonferencer.

En række studier er undervejs, hvor elektroporationsbaserede behandlinger undersøges både som pallierende behandling, primær behandling og neoadjuverende behandling, som led i kombinationsbehandlinger og i randomiserede forsøg, hvor der sammenlignes med gældende behandlinger. Fremtidige behandlingsalgoritmer vil naturligvis afhænge af udfaldet af disse studier.

KORRESPONDANCE: Julie Gehl. E-mail: kgeh@regionsjaelland.dk

ANTAGET: 20. september 2019

PUBLICERET PÅ UGEKRIFTET.DK: 14. oktober 2019

INTERESSEKONFLIKTER: Forfatterens ICMJE-formularer er tilgængelige sammen med artiklen på Ugeskriftet.dk

LITTERATUR: Findes i artiklen publiceret på Ugeskriftet.dk

SUMMARY

Julie Gehl & Stine Krog Frandsen:

Electroporation-based therapies in the treatment of cancer
Ugeskr Læger 2019;181:Vo8190461

Electroporation is a method to permeabilise cell membranes. It can be categorised as 1) reversible electroporation in order to increase the uptake of therapeutic molecules such as chemotherapy, calcium, or DNA, or 2) irreversible electroporation where the cell is permeabilised extensively, and both methods are used in cancer treatment. The treatment is brief and is performed under local or general anaesthesia. Electrochemotherapy and irreversible electroporation have proven efficient across different cancer histologies. This review describes the background for electroporation-based treatment, methods, and results of treatment.

LITTERATUR

- Markelc B, Sersa G, Cemazar M. Differential mechanisms associated with vascular disrupting action of electrochemotherapy: intravital microscopy on the level of single normal and tumor blood vessels. *PLoS One* 2013;8:e59557.
- Gehl J, Sersa G, Matthiessen LW et al. Updated standard operating procedures for electrochemotherapy of cutaneous tumours and skin metastases. *Acta Oncol* 2018;57:874-82.
- Matthiessen LW, Johannesen HH, Hendel HW et al. Electrochemotherapy for large cutaneous recurrence of breast cancer: a phase II clinical trial. *Acta Oncologica* 2012;51:713-21
- National Institute for Health and Care Excellence (NICE). Electrochemotherapy for metastases in the skin from tumours of non-skin origin and melanoma. <https://www.nice.org.uk/guidance/ipg446> (22. sep. 2019).
- Stratigos A, Garbe C, Lebbe C et al. Diagnosis and treatment of invasive squamous cell carcinoma of the skin: European consensus-based interdisciplinary guideline. *Eur J Cancer* 2015;51:1989-2007.
- Frandsen SK, Gissel H, Hojman P et al. Direct therapeutic applications of calcium electroporation to effectively induce tumor necrosis. *Cancer Res* 2012;72:1336-41.
- Frandsen SK, Gibot L, Madi M et al. Calcium electroporation: evidence for differential effects in normal and malignant cell lines, evaluated in a 3D spheroid model. *PLoS One* 2015;10:e0144028.
- Staresinic B, Jesenko T, Kamensek U et al. Effect of calcium electroporation on tumour vasculature. *Sci Rep* 2018;8:9412.
- Falk H, Matthiessen LW, Wooler G et al. Calcium electroporation for treatment of cutaneous metastases: a randomized double-blinded phase II study, comparing the effect of calcium electroporation with electrochemotherapy. *Acta Oncol* 2018;57:311-9.
- Plaschke CC, Gehl J, Johannesen HH et al. Calcium electroporation for recurrent head and neck cancer: a clinical phase I study. *Laryngoscope Investig Otolaryngol* 2019;4:49-56.
- Falk H, Forde PF, Bay ML et al. Calcium electroporation induces tumor eradication, long-lasting immunity and cytokine responses in the CT26 colon cancer mouse model. *Oncimmunology* 2017;6:e1301332.
- Falk H, Lambaa S, Johannesen HH et al. Electrochemotherapy and calcium electroporation inducing a systemic immune response with local and distant remission of tumors in a patient with malignant melanoma – a case report. *Acta Oncol* 2017;56:1126-31.
- Mir LM, Bureau MF, Gehl J et al. High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:4262-7.
- Daud AI, DeConti RC, Andrews S et al. Phase I trial of interleukin-12 plasmid electroporation in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2008;26:5896-903.
- Spanggaard I, Snoj M, Cavalcanti A et al. Gene electrotransfer of plasmid antiangiogenic metargidin peptide (AMEP) in disseminated melanoma: safety and efficacy results of a phase I first-in-man study. *Hum Gene Ther Clin Dev* 2013;24:99-107.
- Kim TJ, Jin HT, Hur SY et al. Clearance of persistent HPV infection and cervical lesion by therapeutic DNA vaccine in CIN3 patients. *Nat Commun* 2014;5:5317.
- Flak RV, Stender MT, Jensen TM et al. Treatment of locally advanced pancreatic cancer with irreversible electroporation – a Danish single center study of safety and feasibility. *Scand J Gastroenterol* 2019;54:252-8.
- Frandsen SK, McNeil AK, Novak I et al. Difference in membrane repair capacity between cancer cell lines and a normal cell line. *J Membr Biol* 2016;249:569-76.
- Frandsen SK, Kruger MB, Mangalanathan UM et al. Normal and malignant cells exhibit differential responses to calcium electroporation. *Cancer Res* 2017;77:4389-401.
- Neal RE, 2nd, Rossmesil JH, Jr., Garcia PA et al. Successful treatment of a large soft tissue sarcoma with irreversible electroporation. *J Clin Oncol* 2011;29:e372-e377.
- Clover AJP, Bertino G, Curatolo P et al. Electrochemotherapy in the treatment of cutaneous malignancy: outcomes and subgroup analysis from the cumulative results from the pan-European InspECT Database for 1478 lesions in 691 patients (2008-2018). Proceedings of the Annual Meeting of the European Society of Surgical Oncology (ESSO 38). Abstract 26. *Eur J Surg Oncol* 2019;45:e19.
- Plaschke CC, Bertino G, McCaul JA et al. European Research on Electrochemotherapy in Head and Neck Cancer (EURECA) project: results from the treatment of mucosal cancers. *Eur J Cancer* 2017;87:172-81.
- Plaschke CC, Johannesen HH, Hansen RH et al. The DAHANCA 32 study: electrochemotherapy for recurrent mucosal head and neck cancer. *Head Neck* 2019;41:329-39.
- Falk H, Bourke M, Stigaard T et al. Electrochemotherapy for colo-rectal cancer using endoscopic electroporation: a phase I clinical study. *Endosc Int Open* 2019 (i trykken).
- Egeland C, Baeksgaard L, Johannesen HH et al. Endoscopic electrochemotherapy for esophageal cancer – a phase I clinical study. *Endosc Int Open* 2018;6:E727-E734.
- Ethemovic I, Breclj E, Gasljevic G et al. Intraoperative electrochemotherapy of colorectal liver metastases. *J Surg Oncol* 2014;110:320-7.
- Granata V, Fusco R, Setola SV et al. Early radiological assessment of locally advanced pancreatic cancer treated with electrochemotherapy. *World J Gastroenterol* 2017;23:4767-78.
- Bianchi G, Campanacci L, Ronchetti M et al. Electrochemotherapy in the treatment of bone metastases: a phase II trial. *World J Surg* 2016;40:3088-94.
- Vitfell-Rasmussen J, Sandvik RM, Dahlstrom K et al. Tumor reduction and symptom relief after electrochemotherapy in a patient with aggressive fibromatosis – a case report. *Acta Oncol* 2018;57:431-4.
- Quaglino P, Matthiessen LW, Curatolo P et al. Predicting patients at risk for pain associated with electrochemotherapy. *Acta Oncol* 2015;54:298-306.