

receptor signaling and systemic platelet activation. *Nat Med* 2002;8:1161-5.

6. Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia - advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med* 2003;349:1451-64.
7. Muller-Tidow C, Schwable J, Steffen B et al. High-throughput analysis of genome-wide receptor tyrosine kinase expression in human cancers identifies potential novel drug targets. *Clin Cancer Res* 2004;10:1241-9.
8. Zhou BB, Bartek J. Targeting the checkpoint kinases: chemosensitization versus chemoprotection. *Nat Rev Cancer* 2004;4:216-25.
9. Speck NA, Gilliland DG. Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2002;2:502-13.
10. Cartron G, Watier H, Golay J et al. From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. *Blood* 2004;104:2635-42.

Biomarkører: medicinsk tradition og fagre nye verden

Specialkemiker Lars Hansen

Novo Nordisk A/S, Måløv

Biologisk markør »biomarkør« er et begreb, som har fundet stigende anvendelse op igennem 1990'erne i den medicinske og naturvidenskabelige litteratur. Denne udvikling har i særlig grad været båret frem af den enorme teknologiske udvikling og fremgang inden for de molekylæranalytiske målemetoder (massespektrometri, microchips som protein- og DNA-arrays etc.). Udviklingen af disse teknologiske platforme har gjort det muligt ud fra ganske små mængder biologisk materiale (mikrogram/milligram) fra samme prøve og på samme tid at analysere hundrede- til tusindvis forskellige molekyler i form af proteiner, nukleinsyrer, eller metabolitter. På grund af høje anskaffelses- og driftsomkostninger var disse teknologiske platforme i begyndelsen hovedsageligt forbeholdt basalforskningen (*discovery*) i medicinalindustrien og andre velbemidlede forskningsinstitutioner. Men produktudvikling og almindelige markedsmekanismer har medført, at analysekapaciteten (*high-throughput*) samt anskaffelses- og driftsomkostninger nu har nået en udgiftsstørrelse, så disse molekylæranalysemetoder er blevet realistiske som værktøjer i den kliniske forskning, og som sådan står de også foran en direkte anvendelse i den kliniske behandling. I den angelsaksiske litteratur markedsføres denne nye sammenhæng mellem molekylærbio- og biologisk basalforskning, klinisk forskning og behandling ofte under begrebet *from benchside to bedside*, og man må derfor anse det for nylig opslåede kliniske professorat ved Københavns Universitet i »klinisk molekylærbio- og biologisk« som en deraf følgende naturlig forskningspolitisk udvikling.

En forudsætning for at disse nye molekylæranalysemetoder kan implementeres direkte i den kliniske hverdag er dog, at den type data, som disse teknologier producerer, bliver underkastet en tilstrækkelig biologisk validering. Resultatet af en bekræftende biologisk validering kan være påvisning af en eller flere biomarkører, eventuelt et »samlet billede« af biomarkører (f.eks. genekspressionsprofil på en microchip), som

med videreudvikling kan åbne mulighed for, at disse teknologier kan anvendes direkte som egentlige parakliniske analyser for sygdomsrisiko (prædiktive analyser), sygdomsdiagnostik (diagnostiske analyser) og sygdomsprognose (prognostiske analyser).

Inden for DNA-*array*-chip-teknologien er Roche Ampli-chip CYP450-Test for nylig blevet godkendt/registreret hos den amerikanske lægemiddelstyrelse Food and Drug Administration (FDA), Center for Devices and Radiological Health med en microchip, der indeholder farmakogenetiske markører (SNPs) for variationer i de mest betydningsfulde cytochrom P450 metaboliseringsenzymet for lægemidler [1].

Hvad er en biomarkør?

I det efterfølgende vil biomarkører primært blive behandlet ud fra en biologisk og medicinsk indfaldsvinkel og mindre ud fra rent teknologiske betragtninger, men der vil også blive beskrevet eksempler på biomarkører drevet af den teknologiske udvikling.

Begrebet »biomarkør« har mange definitioner, som er tæt på at være enslydende, og den her valgte er direkte oversat fra FDA's vejledning [2] for indsendelse af farmakogenetiske data:

»En karakteristik, som måles objektivt og vurderes som indikator for normale biologiske processer, patologiske processer eller farmakologiske effekter af en terapeutisk intervention«.

Begrebet »biomarkør« indeholder altså ingen henvisninger til specifikke teknologier, ud over at markøren skal være objektiv målelig. Det er netop denne afhængighed af målbarhed, som har været løftestang for den bioteknologiske og molekylæranalytiske industris anvendelse af begrebet til at fremhæve anvendelsesmulighederne for teknologiske platforme med stadig mere forfinede og komplekse analysemetoder. I bredeste forstand er lægevidenskaben baseret på biomarkører, som er objektivt målbare størrelser, og i en vis forstand er den objektive undersøgelse en form for »teknologi«. Det kunne derfor være formålstjenligt at beskrive den kliniske anvendelse af biomarkører nærmere.

VIDENSKAB OG PRAKSIS | STATUSARTIKEL

Biomarkører kan inddeles på flere måder og her efter deres karakteristisk i følgende grupper: 1) biometriske/antropometriske (blodtryk, højde, abdominalomfang, elektrokardiogram, ekkokardiografi (vægtykkelse, uddrivningsfraktion m.m. og andre billeddiagnostiske analyser), 2) proteiner/peptider (enzymet hjerte/lever, peptidhormoner f.eks. procalcitonin, kemokiner, antigener og immunhistokemi), 3) nukleinsyrer DNA/RNA (gentest, virusribonukleinsyremængde: hiv og hepatitis C-virus), 4) cytologiske (karyotyper f.eks. philadelphia-kromosom og fluorescens in situ-hybridisering) og 5) metabolitter (enzymmangelsygdomme, fæokromocytom, kreatinin, bilirubin og karbamid), eller efter deres egenskaber i følgende grupper: a) prædiktive (prænataldiagnostik og anlægsbærere af sygdomsrisiko), b) diagnostiske (særligt enzymer og metabolitter) og c) prognostiske (receptorekspression i maligne tumorer, karyotyper f.eks. philadelphia-kromosom).

Validering af biomarkører

Forventningerne til nye biomarkører knytter sig specielt til følgende anvendelsesområder: 1) monitorering af behandling (surrogatendepunkt), 2) tidlig diagnose (tumormarkører), 3) sygdomsinddeling og 4) patientklassificering.

Monitorering af behandling

Biomarkører er en fast tradition inden for al medicinsk behandling, og klassiske eksempler er det kardiovaskulære område, hvor måling af blodtryk og f.eks. kolesterol og lipider som såkaldte surrogatendepunkter erstatter de egentlige kliniske endepunkter morbiditet og mortalitet. Ligeledes inden for diabetesbehandlingen anvendes der f.eks. en glykeret hæmoglobinfraktion (HbA1c) som biomarkør for den glykæmiske effekt af en given behandling og som risikoprædiktør for udvikling af specielt mikrovaskulære komplikationer, retinopati og diabetisk nyresygdom.

Tidlig diagnose

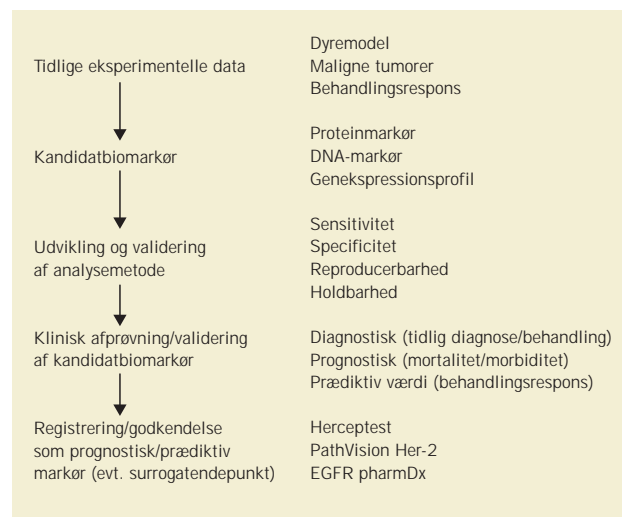
Ideelt set vil en biomarkør være et protein, som er målelig i serum og som med høj følsomhed og stor præcision kan anvendes som screeningsværktøj til at opspore/afsløre tilstedeværelsen af malign sygdom på et tidligt tidspunkt, før en sådan giver kliniske manifestationer. En sådan kandidat som prædiktiv/diagnostisk biomarkør for malign sygdom er måling af prostataspecifikt antigen (PSA), som benyttes til screening for cancer prostatae og monitorering af behandlingseffekt (tumorstørrelse). Til screening er serumniveauer på ≤ 4 ng pr. ml. af PSA blevet benyttet som tærskelværdi for normalt og patologisk prøvesvar med efterfølgende udredningsprogram for c. prostatae. Resultaterne af nye undersøgelser har imidlertid netop sået tvivl om validiteten af denne tærskelværdi, idet man med den tilsyneladende overser 15% af mænd med c. prostatae [3]. Det er sandsynligt, at man med de nye molekylærteknologiske platforme i fremtiden vil finde nye tumorspecifikke markører, men erfaringerne med PSA

understreger samtidig nødvendigheden af standardiserede valideringsprogrammer baseret på en tilstrækkelig klinisk afprøvning.

Sygdomsinddeling

De fremtidige anvendelsesmuligheder for biomarkører er for tiden tydeligst som prædiktive markører for et positivt behandlingsrespons hos en undergruppe af en sygdom. Erfaringerne med biomarkørbaseret sygdomsinddeling er størst inden for onkologien, hvor østrogen- og testosteronreceptor-indholdet i årtier har været anvendt i klassificeringen af brystkræft og prostatakræft til behandling med antihormoner. I de senere år er flere antineoplastiske lægemidler blevet hurtigt indregistreret (FDA: *accelerated approval* og *orphan drug-status*) ved hjælp af en valideret sygdomsinddeling baseret på målinger af tumorbiomarkører. Disse lægemidler: trastuzumab, cetuximab og imatinib mesilate er meget omtalt som positive eksempler på anvendeligheden af biomarkører i lægemiddeludvikling. De skal også omtales her, fordi de samtidig er gode eksempler på biomarkørvalidering (Figur 1).

Trastuzumab [4] og cetuximab [5] er humaniserede monoklonale antistoffer, som genkender epitoper på henholdsvis den humane *epidermal growth factor* (EGF) receptor-2 (HER-2) og EGF-receptor (HER), og de har indikationerne metastaserende brystkræft med overudtrykt HER-2 (trastuzumab) og metastaserende colorectal cancer med overudtrykt HER (cetuximab). Ved hjælp af en diagnostisk målemetode, hvor man standardiseret kan kvantificere indholdet af biomarkørerne HER-2 og HER i en tumor, er det lykkedes at indentificere den undergruppe af brystkræft og kolorektal kræft, som behandlingen virker mod, nemlig de tumorer, som har højest indhold af HER og HER-2. Den gavnlige effekt er imidlertid begrænset til denne undergruppe af patienter (patienternes tumorer), så for at opnå registrering har myndighederne krævet en paralleludvikling og godkendelse af



Figur 1. Udviklingstrin til biomarkørstatus.

kommercielt tilgængelige og validerede målemetoder, såsom Herceptest og PathVisionHER-2 [6] til HER-2-bestemmelse og EGFRpharmDX til HER-bestemmelse [7].

Det tredje eksempel på en biomarkørafhængig (cytogenetisk) registrering er imatinib mesilate, en intracellulær inhibitor af abelson-tyrosin-kinase med indikationerne Philadelphia-kromosom (bcr-abl)-positive (Ph+) kronisk myeloid leukæmi og C-Kit (CD117) positiv metastaserende gastrointestinal stromale tumorer [8]. Det er her bemærkelsesværdigt, at en parallelregistrering af en valideret og kommercialiseret diagnostisk test for Ph+-kromosom, i modsætning til trastuzumab og cetuximab, ikke har været krævet af myndighederne ved registrering af imatinib mesilate.

Et sidste interessant eksempel er gefitinib til behandling af ikkesmåcellet lungekræft. Som intracellulær inhibitor af EGF-receptorrelateret tyrosin-kinaseaktivitet påvirker gefitinib samme protein som trastuzumab og cetuximab, men er i modsætning til disse ikke baseret på en klassificering af tumorerne efter EGF-receptorindholdet, og behandlingseffektens afhængighed af EGF-receptorindholdet i tumoren er derfor ukendt [9]. For nylig er det i et studie dog antydnet, at det måske ville være en god ide at karakterisere dette forhold bedre, fordi tumorer med aktiverende mutationer i EGF-receptorgenet synes at være særlig følsomme for gefitinib [10].

Inden for onkologien må sygdomsinddeling i undergrupper forventes at blive et generelt princip, når de nye DNA-microarray-chips bliver valideret som prædiktive behandlingsmarkører [11, 12], en validering som FDA med sin nyoprettede *interdisciplinary pharmacogenomics review group* (IPRG) ihærdigt er i gang med at etablere det rette forum for [2].

Patientklassificering

Her har biomarkører sin mest fremtrædende rolle i form af farmakogenetiske markører for patienter med hurtig eller langsom nedbrydning/elimination af visse lægemidler (farmakokinetik). Der er hyppigst tale om polymorfier i gener, som koder for leverens cytochrom p450-isoenzymssystemer (CYP2D6, CYP2C19, CYP2C9 m.fl.), polymorfier, som ved fast dosering altså bestemmer *steady-state*-plasmakoncentrationer af lægemidler. Undersøgelser, der beskriver et lægemiddels nedbrydning via disse enzymssystemer, er en fast bestanddel af enhver lægemiddelregistreringsprocedure, men eksempler som de ovenfor beskrevne (trastuzumab, cetuximab) på myndighedskrav for paralleludvikling af validerede analysemetoder for disse genetiske varianter findes ikke. At disse biomarkører alligevel kan have klinisk betydning for behandlingseffekt og bivirkningsrisiko fremgår af hvert enkelt lægemiddels produktinformation. Inden for psykofarmakologien testes disse CYP-gener rutinemæssigt ved udredning af afvigende plasmakoncentrationer (specielt tricykliske antidepressiva), og inden for onkologien er testning af thiopurin methyltransferasegenet (TPMT) rutine ved behandling af ALL med thiopuriner og 5-Fluorouracil. Farmakogenetiske markø-

rer, hvormed man kan afspejle interindividuel genvariation i proteiner (*drug-targets*), som direkte formidler effekten af lægemidler (farmakodynamik), og hvormed man kan inddele patienterne i forventet tilfredsstillende behandlingseffekt og forventet dårlig behandlingseffekt, findes der ikke eksempler på i valideret form, og de har derfor ingen udbredt klinisk anvendelse.

Konklusion

Biomarkører er et fast element i al medicinsk diagnostik og behandling, men som følge af den bioteknologiske og molekylærdiagnostiske udvikling har begrebet fået en futuristisk klang som noget, der især hører fremtiden til. Sikkert er det, at denne udvikling vil bringe forskningen i biomarkørers anvendelse til at følge en behandlingseffekt, til tidlig diagnostik, til sygdomsinddeling eller til patientklassificering i front mange år frem i tiden. Endnu er antallet af »nye« validerede biomarkører begrænset, men en fælles interesse hos både lægemiddeludviklere og myndighederne for flere og bedre behandlingsmuligheder vil i fremtiden kunne sætte »standarder« for udvikling og validering af mange nye biomarkører. FDA's nye *drug-diagnostic co-development concept paper* vil helt sikkert medføre udvikling af egentlige standarder på området [13].

Korrespondance: Lars Hansen, Novo Nordisk A/S, DK-2760 Måløv.
E-mail: larh@novonordisk.com

Antaget: 10. januar 2005

Interessekonflikter: Artiklens indhold er et resultat af forfatterens arbejde og udtrykker ikke officielle synspunkter fra Novo Nordisk A/S eller selskabets filialer.

Litteratur

1. Marketing authorisation of Roche Amplichip CYP450 Test. www.fda.gov/cdrh/pdf4/k042259.pdf/dec.2004
2. Pharmacogenomics data submissions. www.fda.gov/cder/guidance/6400fml.htm/sept.2004.
3. Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ et al. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level < or = 4.0 ng per milliliter. *N Engl J Med* 2004;350:2239-46.
4. Herceptin, European Public Assessment Report, scientific discussion, CPMP/1774/00, www.emea.eu.int/humandocs/Humans/EPAR/Herceptin/Herceptin.htm/sept.2004.
5. Erbitux, European Public Assessment Report, scientific discussion, CHMP/894/04, www.emea.eu.int/humandocs/Humans/EPAR/erbitux/erbitux.htm/sept.2004.
6. Package insert Herceptin (Trastuzumab) Genetech, Inc. www.fda.gov/cder/foi/label/2000/trasgen020900LB.htm/sept.2004.
7. DakoCytomation EGFR pharmDx™, Premarket Approval Application. www.fda.gov/CDRH/sept.2004.
8. Glivec, European Public Assessment Report, CPMP/2418/01, www.emea.eu.int/humandocs/Humans/EPAR/glivec/glivec.htm/sept.2004.
9. Iressa, label, www.fda.gov/cder/foi/label/2003/0213991bl.pdf/sept.2004.
10. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to Gefitinib. *N Engl J Med* 2004;350:2129-39.
11. Dyrskjøt L, Thykjær T, Kruhøffer M et al. Identifying distinct cell classes of bladder carcinoma using microarrays. *Nature Genetics* 2003;33:90-6.
12. Bullinger L, Döhner K, Bair E et al. Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2004;350:1605-16.
13. Drug-diagnostic co-development concept paper. www.fda.gov/cder/genomics/pharmacococonceptn.pdf/marts2005.