

Hvor langt er vi fra klinisk brug af array-teknologi?

Klinisk assistent Claudio Csillag, overlæge Ole Haagen Nielsen, bioinformatiker Rehannah Borup & professor Finn Cilius Nielsen

Amtssygehuset i Herlev, Medicinsk Gastroenterologisk Afdeling C, og H:S Rigshospitalet, Klinisk-biokemisk Afdeling

En af biomedicinens største udfordringer er at udnytte den nye viden og teknologi, der tilføres feltet i disse år til forbedret patientdiagnostik og -behandling. Et af de mest lovende fremskridt i denne forbindelse er DNA-chip (eller *DNA microarray*)-teknologien, som på en hurtig og effektiv måde gør det muligt at undersøge det samlede genudtryk i celler eller væv eller at påvise sekvensvariationer i cellernes genom. I forskningsmæssige sammenhænge har man med stor succes kunnet kortlægge geners spatiale og temporale udtryk og i dyremodeller identificere patologiske variationer for forskellige sygdomme. Ligeledes peger mange ny resultater på, at karakterisering af genudtrykket på en ny måde kan benyttes til klassifikation af sygdomsprocesser og dermed føre til en mere præcis vurdering af patienternes prognoser og behandlingsmuligheder. Endelig vil man med microarray-baseret DNA-sekventering og undersøgelse af sekvensvariationer måske kunne effektivisere krævende molekylærgenetiske analyser. Implementeringen af *microarray*-baserede analyser i den kliniske hverdag kræver naturligvis, at man kan dokumentere gevinsten ved teknologien, og at metoden er reproducerbar og sammenlignelig. Denne del af arbejdet er langt fra afsluttet, men på basis af en række nye resultater føler vi, at en vis optimisme er berettiget. I denne statusartikel har vi forsøgt at give en kort oversigt over *microarray*-teknologiens position i den kliniske hverdag.

Farmakogenetik

Europæiske patienter og deres behandlende læger kan nu på en enkel og hurtig måde få oplyst, hvad den mest hensigtsmæssige dosering af en række præparater er for at opnå en individuel optimal terapeutisk effekt. Denne udvikling skyldes en række teknologiske landvindinger [1]. I september 2004 blev den første DNA-*microarray*-chip EU-godkendt til anvendelse som en diagnostisk test. Ved hjælp af AmpliChip CYP450 identificerer man 31 kendte polymorfier i generne 2D6 og 2C19, der hører til cytokrom P450-genfamilien (Figur 1). Disse gener udtrykker enzymer, som har en central rolle for metabolismen af en række lægemidler. På baggrund af de påviste sekvensvariationer kan den enkelte patient klassificeres i forhold til sin metaboliske profil (*poor*, *intermediate*, *extensive*, *ultra-rapid metabolizer*), og dermed kan den mest adækvate dosering af f.eks. antipsykotika, betablokkere, azathioprin eller protonpump hæmmere blive ordineret. En *poor metabolizer* kan minimere risikoen for toksiske plasmakoncen-

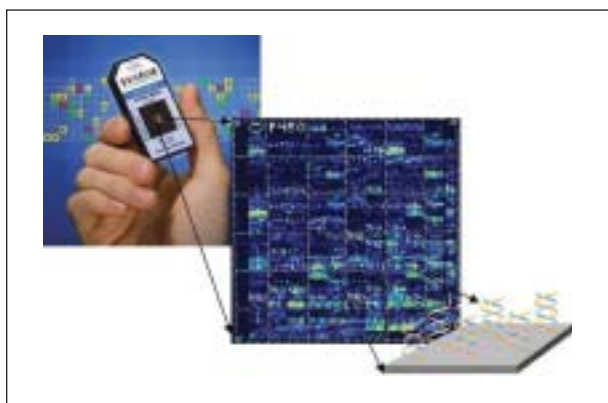
trationer ved at få ordineret lavere doser af f.eks. phenytoin. På den anden side vil en *poor metabolizer* have behov for højere doser af et prodrug som pantoprazol for at opnå farmakologisk relevante plasmakoncentrationer.

Produktet er udviklet af Roche Diagnostics i samarbejde med *microarray*-producenten Affymetrix, der også har fået den tilhørende hardware og software til analyserne EU-godkendt. Analysen er netop etableret på Rigshospitalet, hvor man i fremtiden håber at kunne overføre erfaringerne fra den rutinemæssige anvendelse af metoden til fremtidige chipbaserede analyser.

Diagnostisk og prognostisk anvendelse

CYP450-chippen er dog ikke det første *microarray*-baserede produkt, som er blevet kommercielt tilgængeligt for læger og patienter. Kortlægningen af et »genetisk mønster« eller en »genetisk signatur« i tumorer fra patienter med brystcancer har resulteret i udviklingen af Mammaprint, der siden februar 2004 har været kommercielt tilgængelig via det hollandske firma Agendia [2].

Mammaprint fungerer som en laboratorieservice, hvor man på RNA, der er ekstraheret fra tumorceller, kortlægger den tumorspecifikke genspressionsprofil. Van de Vijver *et al* identificerede ved hjælp af et DNA-*microarray* med 25.000 gener en prognostisk profil omfattende 70 gener ud fra et materiale på 98 patienter og validerede efterfølgende profilen hos 295 konsekutive patienter under 52 år med tumorer, der var mindre end fem centimeter [3]. I valideringsundersøgelsen havde omkring halvdelen af patienterne verificerede tumorceller i lymfeknuder, og tumorerne stammede fra en vævsbank, hvori de var blevet nedfrosset i 1984-1995. Patienter med en dårlig prognose (n = 180) havde en tiårig overlevelseshastighed på 55% versus patienterne med en god prognose (n = 115), der havde en tiårig overlevelseshastighed på 95%. Genprofileringens prædiktive værdi var højere end værdierne fra traditionelle



Figur 1. En AmpliChip CYP450 viser, hvor hurtigt en patient metaboliserer præparater, som er afhængige af cytokrom P450-systemet /Roche.

VIDENSKAB OG PRAKSIS | STATUSARTIKEL

metoder: Flere patienter med lymfeknuder uden cancerceller havde en god prognose med anvendelsen af *microarray*-profileringen (40%) end med anvendelsen af St. Gallen-kriterier (15%) og/eller NIH-kriterier (7%). Desuden havde lavrisikopatienter ifølge DNA-profileringen en større chance for overlevelse uden metastasering end de lavrisikopatienter, der var blevet klassificeret i henhold til de andre metoder. Arbejdet fra denne gruppe tydede desuden på, at tilbøjelighed til metastasering ikke opstår sent, men tværtimod kan identificeres tidligt i tumorforløbet. En randomiseret klinisk undersøgelse, den første hvori man vurderer en *microarray*-baseret diagnostisk test omfattende 5.000 patienter, forventes at foreligge i 2010 eller 2011.

Klinisk anvendelse

De hæmatologiske neoplastiske sygdomme har ofte meget distinkte genspressionsprofiler. RNA ekstraheret fra celler hos 360 patienter med akut lymfoblastær leukæmi (ALL) kunne således klassificeres i seks undergrupper, som svarer til sygdommens kendte cytogenetiske undergrupper, samt en ny undertype [4]. I 2004 blev akut myeloblastær leukæmi (AML) klassificeret af to uafhængige grupper og opdelt i molekylære og prognostiske underkategorier [5]. Diffust storcellet B-lymfom (DLBCL) blev allerede i 2000 [6] inddelt i undergrupper ved hjælp af et hjemmelavet DNA-*array* kaldet *lymphochip*, og gensignaturerne er siden blevet forbedret, og klassifikationen er med succes overført til andre platforme, således at man i de kommende år kan påbegynde sammenligninger mellem forskellige laboratorier og prospektive studier. Den første kliniske anvendelse af DNA-chips inden for hæmatologien kan forventes blandt ALL- og DLBCL-patienter [4].

Om teknologiens anvendelse bliver udbredt i praksis afhænger af flere forhold. Muligheden eksisterer for, at *microarray*-produkter ikke slår an hos de behandlende læger på grund af traditioner eller et relativt højt prisniveau. Der er et kendt fortilfælde inden for farmakogenetikken, hvor undersøgelse af genet for enzymet thiopurinmetyltransferase (TPMT), som indgår i metaboliseringen af azathioprin/6-mercaptopurin (6-MP), kun har fundet begrænset anvendelse. En sekvensvariation er forbundet med manglende TPMT-aktivitet hos ca. 0,3% af befolkningen, og 6-MP-behandling kan derfor forårsage potentielle toksiske virkninger, herunder knoglemarvs-påvirkning. En diagnostisk test til bestemmelse af varianten har siden 1990'erne været kommercielt tilgængelig, men frasat på nogle få centre i USA er det ikke blevet rutine at undersøge for denne genetiske variation, inden behandlingen påbegyndes, på trods af de potentielt alvorlige toksiske effekter, som nogle patienter oplever. Blandt de medvirkende faktorer til den beskedne brug af TPMT-bestemmelse kan der, ud over den relativt høje pris, nævnes en forsinkelse af f.eks. en immunosuppressiv behandling, til svaret på testen foreligger, men dette bør sammenholdes med, at den terapeutiske effekt af azathioprin/6-MP først indtræder 2-3 måneder senere.

Klinikernes holdning

For at vurdere klinikernes holdning til og anvendelse af en *microarray*-baseret test er gruppen bag Mammaprint sammen med den hollandske sygesikring gået i gang med et pilotprojekt, hvori patienterne og lægerne får tilbudt 70-gens-prognosesignaturen. Målet er at afdække, hvor mange og hvilke kliniske beslutninger der bliver taget på baggrund af denne oplysning – især hvis den ikke stemmer overens med de kliniske og histopatologiske oplysninger. Desuden vil det blive undersøgt, om anvendelse af testen kan korreleres til reducerede behandlingsomkostninger som følge af, at færre patienter bliver sat i kemoterapeutisk behandling.

Regulative og lovgivningsmæssige aspekter

En forudsætning for, at *microarray*-baserede produkter bliver anvendt i klinikken, er, at de godkendes til at blive markedsført som diagnostiske (eller prognostiske) test. Dette kræver bl.a., at *microarray*-genererede data af godkendelsesmyndighederne bliver betragtet som både pålidelige og reproducerbare. I USA har Food and Drug Administration (FDA) imidlertid i 2002 vurderet, at der stadig mangler evidens for, at dataene er reproducerbare [7]. Der er således flere undersøgelser, hvis resultater peger på, at sammenligninger af DNA-*array*-data ikke er helt problemfri [8]. På den anden side erkender man i FDA, kun at have en meget begrænset erfaring med *microarray*-data. På denne baggrund er de derfor gået aktivt ind i at få etableret samarbejdsrelationer med universiteter og industrien for at få etableret rammer for ansøgninger vedrørende *microarray*-baserede kliniske produkter. Organisationen har således oprettet flere laboratorier for at få samlet den nødvendige ekspertise til vurdering af *microarray*-ansøgninger, og et sæt præliminære retningslinjer herom er blevet offentliggjort online [9].

Fremtidig anvendelse

Selv uden de endelige retningslinjer har industrien og universiteterne påbegyndt eller vil i den nærmere fremtid påbegynde flere kliniske undersøgelser af anvendelse af *array*-teknologi [10]. Ud over det nævnte hollandske studie forventes mindst fire andre forskergrupper at inddrage flere tusinde patienter i vurderingen af *microarray*-baserede diagnostiske og prognostiske produkter til cancerbehandling. Søsætningen af disse initiativer og undersøgelser bekræfter troen på *microarray*-teknologiens enorme potentiale og peger på, at man inden for en overskuelig årrække vil være i stand til at dokumentere og fastlægge teknologiens kliniske betydning.

Korrespondance: Claudio Csillag, Medicinsk Gastroenterologisk Afdeling C, Amtssygehuset i Herlev, DK-2730 Herlev. E-mail: claudio@dadlnet.dk

Antaget: 12. januar 2005

Interessekonflikter: Ingen angivet

Taksigelser: Dette arbejde har modtaget støtte fra Augustinus Fonden og Fonden af 1870.

Litteratur

1. Koch WH. Technology platforms for pharmacogenomic diagnostic assays. *Nature Rev Drug Discov* 2004;3:749-61.
2. <http://www.agendia.com/common.asp/nov.2004>.
3. Van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002;347:1999-2009.
4. Ebert BL, Golub TR. Genomic approaches to hematologic malignancies. *Blood* 2004;104:923-32.
5. Liu ET, Karuturi KR. Microarrays and clinical investigations. *N Engl J Med* 2004;350:1595-7.
6. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;403:503-11.
7. Petricoin EF, Hackett JL, Lesko LJ et al. Medical applications of microarray technologies: a regulatory science perspective. *Nat Genet* 2002;32:474-9.
8. Csillag C, Nielsen OH, Borup R et al. Microarrays and Crohn's disease: collecting reliable information. *Scand J Gastroenterol* 2005 (i trykken).
9. <http://www.fda.gov/cder/guidance/5900dft.pdf> /nov. 2004.
10. Branca M. Putting gene arrays to the test. *Science* 2003;300:238.

Toksikologi og farmakogenetik

Overlæge Kim P. Dalhoff & professor Henrik E. Poulsen

H:S Rigshospitalet, Klinisk Farmakologisk Afdeling Q 7642

Der er stor variation mellem den måde hvorpå forskellige individers responderer på behandling med et lægemiddel – både hvad angår lægemidlets effekt, men også hvad angår lægemidlets toksicitet. Denne variation kan skyldes patogenesen og sværhedsgraden af den sygdom, der behandles, lægemiddelinteraktioner, patientens alder, patientens ernæringsmæssige tilstand, patientens nyre- og leverfunktion samt eventuelle konkurrerende sygdomme. Miljøpåvirkning og livsstil kan også påvirke behandlingsresponsen. I denne statusartikel berøres dog udelukkende de nedarvede faktorer (gener), der spiller en central rolle for lægemidlets effekt og toksicitet. Betydningen er særlig vigtig for lægemidler med et snævert terapeutisk indeks dvs. kort afstand mellem farmakologisk effekt og toksicitet (**Tablet 1**). I mange år har der været fokuseret på forskelle mellem individers evne til at metabolisere lægemidler og de tilhørende genetiske forskelle i de lægemiddelmetaboliserende enzymer. Nedsat *clearance* af et lægemiddel medfører høj plasmakoncentration og mulighed for toksiske bivirkninger. Omvendt medfører øget *clearance* risiko for behandlingssvigt. Man har identificeret patienter med variante alleler af bestemte cytokrom P450-enzym (f.eks. CYP2D6), som resulterer i manglende eller svært nedsat pro-

teinaktivitet. Patienter, som behandles med lægemidler, der er substrat for CYP2D6, og som har manglende funktion af enzymet (*slow metabolizers*), vil være i risiko for at få toksiske bivirkninger pga. høj koncentration af lægemidlet i blodet. Man har anslået, at 2 mio. indlagte patienter i USA årligt får svære lægemiddelbivirkninger på trods af korrekt dosering og administration. En opfølgende undersøgelse har godtgjort, at mere end 50% af de lægemidler, der er involveret i bivirkninger, bliver metaboliseret af et enzym med mindst en variantallel, som medfører nedsat eller ingen aktivitet [1]. Ud over genetiske forskelle på lægemiddelmetaboliserende enzymer er man i de senere år blevet opmærksom på genetiske forskelle på lægemiddeltransporterende proteiner (f.eks. blod-hjerne- eller sinusoid-hepatocyt-galde-transport) og lægemiddelkonjugerende enzymer (fase 2-reaktioner) som årsag til lægemiddel-toksicitet. Manglende funktion af lægemiddeltransportører og konjugeringsenzym kan også medvirke til, at effekten af et lægemiddel ikke altid er som forventet, men at det derimod afstedkommer toksiske bivirkninger.

I det efterfølgende gennemgås en række vigtige enzymer med variante alleler, som har eller kan få klinisk betydning for udvikling af toksicitet. Herudover har vi udarbejdet en algoritme (**Figure 1**) for udredning af en farmakogenetisk betinget lægemiddelbivirkning.

Cytokrom P450-enzym (fase 1-reaktioner)

Cytokrom P450 (CYP) repræsenterer en superfamilie af lægemiddelmetaboliserende enzymer og består af en række gener, som findes i mange forskellige organismer. Nomenklaturen bygger på genetisk homologi og består af CYP efterfulgt af et arabertal, et bogstav og endnu et arabertal, som angiver familie, subfamilie og selve enzymet. CYP2E1 betyder således familie 2, subfamilie E og enzym 1. Dette er tidligere benævnt det mikrosomale ethanolomsættende enzym (MEOS). Genetiske polymorfier i disse enzymer har været genstand for forskning i mange år, og særlig velbeskrevet er debrisoquin hydroxylase (CYP2D6)-polymorfien, som blev klonet og ka-

Tablet 1. Eksempler på lægemidler, der har snævert terapeutisk indeks (ratio mellem LD50 og ED50 <2) if. Food and Drug Administration (FDA) (liste i *Scale-Up and Post-Approval Changes for Intermediate Release Products* (SUPAC-IF) og som metaboliseres af proteiner, der har variante alleler.

Lægemiddel	Enzym
Carbamazepin	CYP3A4
Ethinylestradiol	CYP3A4
Kinidin	CYP3A4
Minoxidil	UGT
Phenytoin	CYP2C9
Primidon	CYP2C19
Theophyllin	CYP1A2
Warfarin	CYP2C9