

12. FDA fosters pharmacogenomics. [www.bio-itworld.com/archive/061202/horizons\\_lesko.html](http://www.bio-itworld.com/archive/061202/horizons_lesko.html) /okt. 2004.
13. Package insert Herceptin (Trastuzumab) Genetech, Inc. [www.fda.gov/cder/foi/label/2000/trasgen020900LB.htm](http://www.fda.gov/cder/foi/label/2000/trasgen020900LB.htm) /okt. 2004.
14. Guidance for industry. Pharmacogenomic data submissions. [www.fda.gov/cder/guidance/index.htm](http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm) /okt. 2004.
15. Guidance for industry. Estrogen and estrogen/progestin products to treat vasomotor symptoms and vulvar and vaginal atrophy symptoms-recommendations for clinical evaluation. [www.fda.gov/cder/guidance/index.htm](http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm) /okt. 2004.
16. Guidance for industry and FDA staff. Class II special controls guidance document: Factor V Leiden DNA mutation detection systems. [www.fda.gov/cdhr/oivd/guidance/1236.pdf](http://www.fda.gov/cdhr/oivd/guidance/1236.pdf) /okt. 2004.
17. Definition of a combination product. [www.fda.gov/oc/combo/definition.html](http://www.fda.gov/oc/combo/definition.html) /okt. 2004.
18. Definition of primary mode of action for combination products. [www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/98fr/04-10447.pdf](http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/98fr/04-10447.pdf) /okt. 2004.
19. Accelerated evaluation of products indicated for serious diseases (life threatening or heavily disabling diseases) [www.emea.eu.int/pdfs/human/regaffair/049596en.pdf](http://www.emea.eu.int/pdfs/human/regaffair/049596en.pdf) /okt. 2004.
20. Guidance for industry. Fast track drug development programs-designation, development, and application review. [www.fda.gov/cber/gdlns/fsstrk.pdf](http://www.fda.gov/cber/gdlns/fsstrk.pdf) /okt. 2004.
21. Hansen L. Biomarkører: medicinsk tradition og fagre nye verden. *Ugeskr Læger* 2005;167:2183-5.
22. FDA Statement on Iressa. [www.fda.gov/bbs/topics/news/2004/new01145.html](http://www.fda.gov/bbs/topics/news/2004/new01145.html) /okt. 2004.
23. 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.
24. Tarceva™ label. [www.fda.gov/cder/foi/label/2004/021743lbl.pdf](http://www.fda.gov/cder/foi/label/2004/021743lbl.pdf) /dec. 2004.
25. Iressa.CORE. [www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/05/slides/2005-4095S2\\_01\\_03\\_AstraZeneca-Clinical-Relevance.ppt](http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/05/slides/2005-4095S2_01_03_AstraZeneca-Clinical-Relevance.ppt) /feb. 2005.

## Genomisk sygdomsklassifikation

Professor Torben F. Ørntoft

Århus Universitetshospital, Skejby Sygehus, Klinisk Biokemisk Afdeling

Vi er ved at opnå en stadig større indsigt i de molekylære mekanismer og forhold ved en række sygdomme. Dette skyldes tre vigtige forhold: vor viden om gener, vor viden om molekylær cellebiologi (herunder *pathways*), og de teknologiske fremskridt i de seneste fem år.

Vor viden om gener og strukturen af det humane genom er blevet massivt forbedret igennem de seneste få år. Vi kan ved hjælp af matematiske (bioinformatiske) algoritmer beregne, hvornår der synes at være et gen på de næsten uendelig lange DNA-streng, som indeholder vore nedarvede informationer. Mange af disse gener er nye – men homologe til kendte gener og kan derfor tildeles en formodet funktion – som ofte er rigtig, men som til gengæld også kun er en del af de funktioner, som et givet gen har. Der mangler stadig viden om de funktionelle aspekter af de enkelte gener, men det er til en vis grad overkommeligt at indhente denne, da vi nu regner med, at der kun er ca. 30.000 af disse, hvoraf de 6.000-8.000 allerede er beskrevet i større eller mindre detaljer.

Fra en sygdomsmæssig synsvinkel er det klart, at vi behøver yderligere viden for at kunne forstå de enkelte geners rolle i sygdomme. Dette gælder især for almindelige sygdomme såsom f.eks. astma, hjertesygdomme og kræft, hvor visse mekanismer synes at være klarlagt, men langt fra nok til at vi kan forstå, hvad der sker på det molekylære plan, når sygdomme opstår.

Vor viden om molekylær cellebiologi bliver her vigtig, idet vi har behov for at forstå de cellulære, regulatoriske mønstre,

når sygdom opstår. Man kan vel egentligt ikke tale om, at cellen er syg, men snarere om, at den udfører uhensigtsmæssige procedurer i forhold til individets sundhed. Mange *pathways* og cellulære funktioner er relevante under visse cellulære omstændigheder, men ikke under andre. Dette kan eksemplificeres ved en cancercelle, der deler sig som alle andre celler, men på en uhammet måde. Ligeledes kan det påpeges, at immunceller udfører delvist normale funktioner ved allergiske/autoimmune reaktioner – men der mangler betydningsfulde kontrolfunktioner til at bremse visse uhensigtsmæssige processer i cellerne.

På basis heraf kan det konkluderes, at det er af afgørende betydning at forstå den normale celledens molekylære signalveje for at kunne udlede noget om syge celler. Et samspil mellem studier af normale celler og afsporede celler vil være nyttigt for at få et dybere indblik i: 1) Hvad er formålet med de cellulære processer, der er iværksat? 2) Hvilken kontrolmekanisme glippede og resulterede i sygdommen? I eksemplet med cancer kunne man forestille sig, at et enkelt temporært udtrykt kontrolgen inaktiveres, hvorved en lang række processer sættes i gang. Det, man umiddelbart finder ved at undersøge processerne i cancercellen, er de senere afledte effekter – og måske ikke den mekanisme, der ledte til sygdommen.

I en medicinsk sammenhæng er det således ikke sikkert, at vi kan finde årsagen til en given sygdom – men kan vi forstå, hvordan de celler, der skaber sygdommen, er aktive, hvilke netværk og hvilke *pathways*, de betjener sig af, er vi kommet et langt stykke. Ved at anvende vor viden om den afsporede celledens funktioner, kan vi designe nye lægemidler, der kan bremse dens afvigende funktioner og dermed bringe den tilbage på rette spor eller slå den ihjel. Det sidste foregår relativt ublodigt ved anvendelse af apoptose (programmeret celledød – som foregår mange millioner gange daglig hos det enkelte individ).

Kunne vi forstå den mekanisme, der initierer en sygdom, kunne vi måske helt forebygge sygdommen. Dette er dog vanskeligt, idet det ville kræve et tidligt indblik i cellens biologi – ofte før individet er blevet sygt. Har man ikke overskredet den iatrogene tærskel, er mange analyser umulige at udføre, specielt hvis de kræver biopsier fra levende væv. Derfor må vi væbne os med tålmodighed, når det gælder sygdomsforebyggelse på det genomiske plan, men til gengæld forvente os meget af behandlinger, der bygger på forståelse af cellens afsporede netværk.

Den teknologiske udvikling er gået stærkt i de seneste år. Fremkomsten af *microarray*-teknikken, sammen med fremkomsten af meget kraftigere computere og viden om DNA-strengenes sekvens, har medført en række nye videnskabelige discipliner: *transcriptomics*, *bioinformatics*, *functional genomics* og hvad man ellers har af *-omics* for tiden.

Vi kan ved hjælp af *microarrays* skanne genomet for variationer, de såkaldte *single nucleotide polymorphism* (SNP), for 50.000 variationer ad gangen. Vi kan ligeledes skanne, hvilke gener der er tændte, og hvilke der er slukkede, samt kvantificere mængden af *transcript* (RNA).

På proteomområdet er der også nye teknologier, som kan kvantificere proteiner – men det er et mere komplekst område end DNA/RNA, idet de enkelte proteiner optræder i mange forskellige former, ofte samtidig og ofte varierende med cellens funktioner. Komplexiteten og mængden af data, der genereres på kort tid, nødvendiggør avancerede softwareløsninger for at gøre arbejdet overskueligt. Bioinformatikken har her været af stor betydning, idet man herved dels kan luge ud i uholdbare data, dels kan danne samlende hypoteser om, hvilke *pathways* der er aktive, og hvilke nye korrelationer der kan være imellem molekyler. Disse hypoteser kan efterfølgende testes ved nye præcise værktøjer, såsom siRNA, hvor man blot fjerner et eneste RNA ud af de mange tusinde og derefter måler effekten af fraværet af dette ene molekyle på samme vis, som man kan indsætte et molekyle i en celle og se effekten af dette.

### Den genetiske sygdomsklassifikations begrænsninger

Vi har altid været tilbøjelige til at simplificere vor sygdomsopfattelse: endogene og eksogene depressioner, essentiel og renal hypertension, coloncancer og colonpolypper, juvenil diabetes og gammelmandsdiabetes. Når diagnosen var stillet, kom behandlingen efterfølgende. Dette paradigme, kaldet diagnosens og behandlingens enhed, ser imidlertid ud til at være skiftet. Der er fremkommet flere og flere undergrupper af sygdomme, der er baseret på sygdommens histologiske fund, skanningsfund, behandlingsrespons, udviklingstakt etc. Nogle af disse kræver i dag hver deres behandling; hypertension kan (afhængigt af kardiale forhold) behandles med calciumantagonister, betablokkere og vanddrivende medicin. Leukæmier skal undergrupperes ikke kun efter cellernes udseende, men også efter overflademærker og/eller DNA-

fusionsmønstre – hvor to molekyler fusioneres på genniveau. Dette sidste er et eksempel på, hvor langt vi er nået – nemlig til en molekylær klassifikation af de undergrupper, der allerede forefindes, hvilket medfører endnu flere underundergrupper. For særlig interesserede er der anført en række nøgle-referencer [1-7].

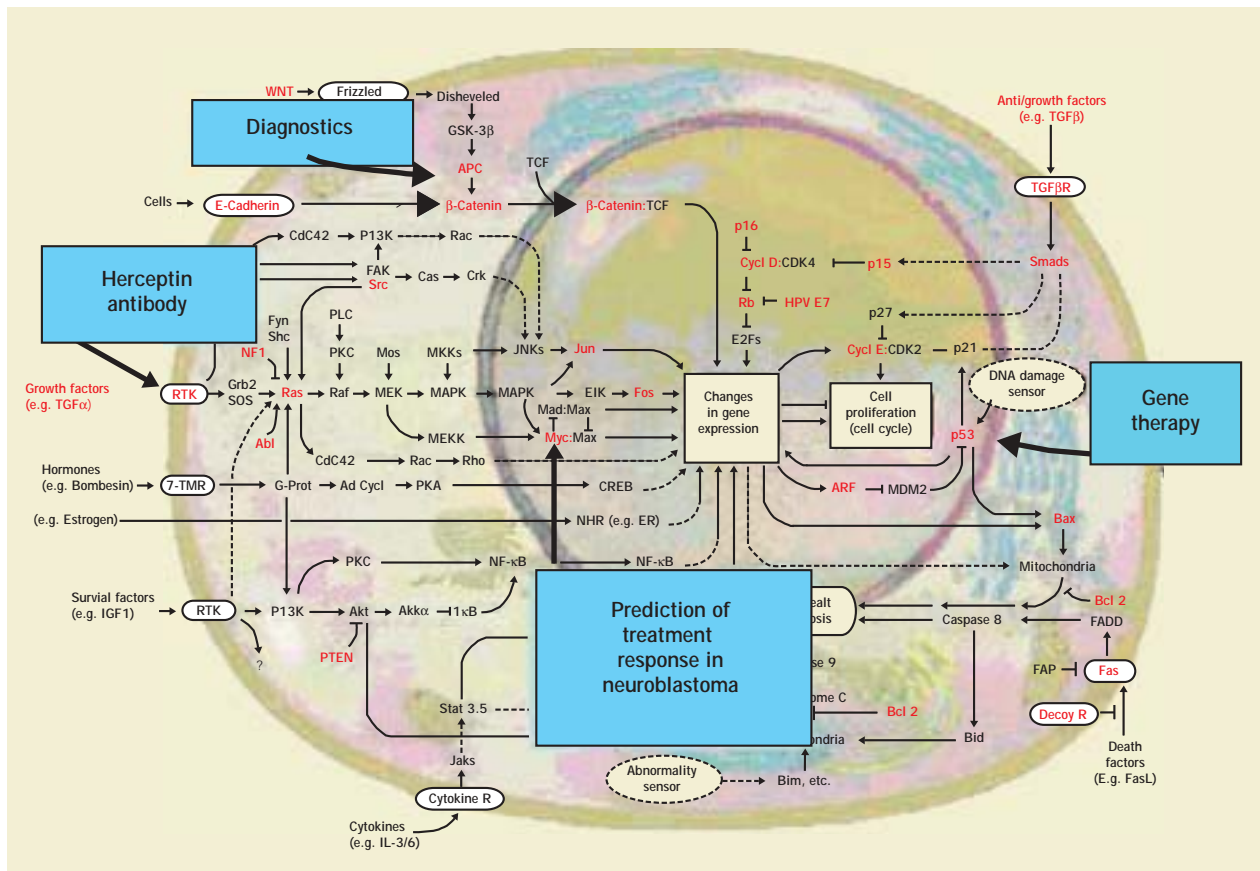
Et stort problem er imidlertid de enorme krav, der stilles, for at forskningen kan bidrage med den nødvendige viden. Alle disse undergrupper er skævt repræsenteret i den enkelte hovedsygdomsgruppe, og dermed er nogle relativt hyppige og andre relativt sjældne. Skal man derfor nedbryde sygdomme i fire, seks eller ti undergrupper, kræves der tilsvarende flere patienter i det materiale, der bliver undersøgt, specielt hvis de relativt sjældne grupper skal være tilstrækkeligt repræsenterede. Meget kan opnås ved etablering af biobanker for de enkelte sygdomme – biobanker, hvor der systematisk indsamles væv til senere molekylær analyse.

### Klassifikation baseret på sjældnere mutationer og polymorfier

Ser vi på DNA-strengene, kan vi slå op i The National Center for Biotechnology Information (NCBI)-databaserne og få indblik i, hvor meget arvemassen varierer imellem forskellige individer. Visse mutationer i nukleotidsekvensen forekommer hyppigt og danner derfor polymorfier (> 1% af befolkningen har varianten). Disse kan udmærket kode for aminosyrer og medføre, at der forekommer varianter af samme protein også på aminosyreniveau. Nogle af disse varianter er relateret til en øget tilbøjelighed til specifikke sygdomme. For de flestes vedkommende er der en relativt lille statistisk øget risiko, men for enkeltes vedkommende er der en massivt øget risiko. Oftest vil individet have et rask allel (vi har to, et fra faderen og et fra moderen), og dette kan så tage over, men vil hyppigt være til stede i den halve dosis og vil enkelte gange blive hæmmet af det abnorme protein.

Sjældnere forekommende variationer i arvemassen kaldes for mutationer. Disse kan være nedarvede igennem flere generationer eller kan være opstået de novo. Disse mutationer kan være helt uskyldige og vil så sjældent blive fundet, men de kan også være sygdomsfremkaldende. Oftest skyldes sygdom inaktivering af et protein med samme effekt på dosis som beskrevet ved polymorfier eller med en dominant effekt, der ødelægger det raske allels mulighed for at producere et velfungerende protein.

Kender vi det eller de gener, der kan fremkalde en sygdom, kan man undersøge, om der er polymorfier eller mutationer i dette/disse, og dermed inddele sygdommen i grupper, der har mutationer eller ikke har det. Dette kan ofte indebære, at man kan få informationer om f.eks. sygdomsforløbet, den forventede udvikling af sygdommen og/eller behandlingsrespons. Eksempelvis vil mutationer i *mismatch repair*-generne kunne give anledning til arvelig coloncancer af den nonpolytomatøse type. Vor viden om en sådan mutation medfører, at



Figur 1. En forsimplet oversigt over cellulære pathways med angivelse af hvor diagnostik og behandling finder anvendelse. Antigenpræsenterende celle (APC)-genet sekventeres hos familier med mange polypper og giver diagnosen familiær polypose; trastuzumab-antistof rettes imod en receptortyrosinkinase i cellemembranen (HER2); c-MYC-amplifikation forudsiger dårlig prognose ved neuroblastomer; p53 har været anvendt til anticancerterapi i mange kliniske forsøg.

vi forventer flere højresidige mukøse tumorer, tumor i colon i en ung alder, en relativt god prognose ved et givent stadium samt en relativt dårlig respons på kemoterapi (f.eks. 5-Fluorouracil, 5-FU). Samtidig vil en række andre organer med høj sandsynlighed kunne blive sæde for tumorer, f.eks. endometriet hos kvinder og pelvis renis hos personer af begge køn.

### Klassifikation baseret på over- eller underudtryk af cellulære pathways

En anden måde at opnå en molekylær klassifikation på er at studere regulationen til de pathways, vi kender i dag. Er en given pathway overudtrykt kan dette give anledning til et karakteristisk sygdomsforløb og samtidig sætte rammerne for behandling. Et eksempel er brugen af trastuzumab til behandling af brystkræft. Dette gøres udelukkende hvis HER2-receptoren er overudtrykt mere end 5-6 gange. Trastuzumab er et »humant« monoklonalt antistof, der blokerer for signaleringen fra vækstreceptoren, og som dermed nedsætter væksthastigheden i tumorcellerne.

Inden for leukæmierne har man fundet aktivitet i bl.a. c-kit i undergrupper af kromisk myeloid leukæmi, der medfører, at cellerne bliver modtagelige for behandling med stoffer som imatinib-mesyilat. Man nedregulerer den pathway, der er aktiv,

og opnår dermed behandlingsmæssig effekt. Selve mekanismen er delvist kontekstafhængig, idet man ligeledes har fundet, at gastrointestinale stromatumorer (GIST) i tarmen, der har et opreguleret mutant c-kit, ligeledes responderer på behandling med det samme stof, som de c-kit-afhængige leukæmier.

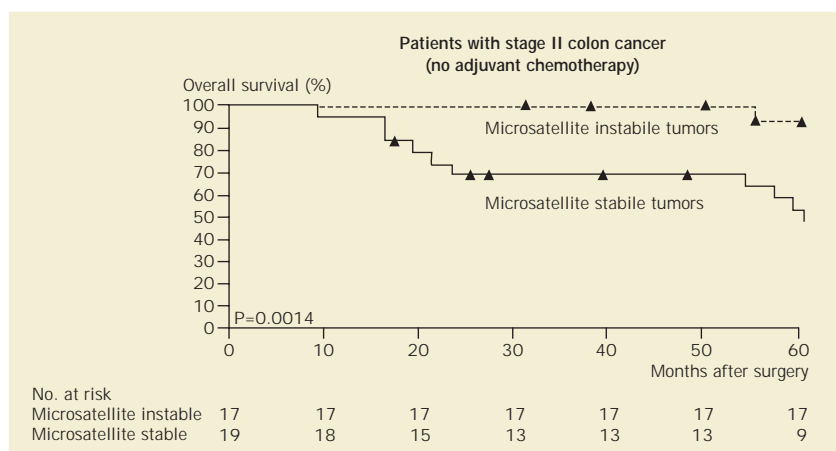
Dette er meget lovende og viser, at vi kan nå langt ved at identificere de enkelte molekylære pathways – finde et angrebepunkt i disse og designe lægemidler rettet herimod. At dette er lettere sagt end gjort, står vist klart for de fleste, og kun ganske få af mange tusinde teststoffer når igennem en produktudvikling, idet de fleste opgives pga. manglende effekt, manglende biotilgængelighed eller uønskede bivirkninger.

De molekylære forhold er af betydning for diagnostik og behandling af sygdomme – og også i visse tilfælde for vurdering af prognosen. Eksempelvis vil man ved neuroblastomer kunne undersøge, i hvor høj grad c-MYC er overudtrykt. Er dette til stede i mængder, der overstiger 20 gange det normale niveau, vil patienterne – oftest børn – have en dårlig prognose.

Inden for det arvelige syndrom multipel endokrin neoplasie (MEN2) forefindes mutationer i RET-proto-onkogenet. Placeringen af disse mutationer i genet har en meget stærk betyd-

## VIDENSKAB OG PRAKSIS | STATUSARTIKEL

**Figur 2.** Overlevelse i en lille gruppe coloncancerpatienter inddelt efter, hvorvidt de havde *microsatellite instable* (---) (17 patienter) eller *stable* (—) (19 patienter) tumors. Som det ses, er overlevelsen signifikant bedre hos patienterne med de instabile tumorer.



ning for, hvilke organer der bliver inddraget i syndromet (f.eks +/- parathyroide adenomer).

I **Figur 1** er der vist eksempler på, hvor i cellens metabolisme vi kan anvende molekylære test til at vurdere prognose og behandlingsmuligheder. Som det ses, kan informationerne hentes både fra overflademolekyler, såsom tyrosinkinase-receptorer og fra centrale vækstregulerende *pathways* såsom c-MYC.

I **Figur 2** er der vist en overlevelseskurve for coloncancer, baseret på hvorvidt canceren udviser inaktivering af mismatch *repair*-systemet eller ej. Dette medfører i de inaktive tumorer, at der opstår en del punktmutationer og dermed formentligt en bedre genkendelse fra immunsystemet. Som det fremgår, overlever patienter med disse reparationsinaktiverede tumorer væsentlig bedre end de patienter, der har et intakt reparationsystem. Nogle vil hævde, at de inaktiverede slet ikke har brug for 5-FU, men snarere andre behandlingsformer, idet de næppe reagerer på 5-FU.

### Fremtidige muligheder

Mange nye metoder er undervejs, her skal blot nævnes muligheden for at inddele cancer baseret på *microarray*-analyser af geners ekspressionsprofiler. Noget af det mest lovende i de senere år har været opmuntrende forskningsdata om lymfomer samt bryst- og blærekræft, hvilket tyder på, at der snart åbnes mulighed for at inddele disse sygdomme i henholdsvis meget aggressive metastaserende sygdomme og mindre aggressive sygdomme. Dette vil på lang sigt få betydning for de follow-upprogrammer, der designes til de enkelte patientgrupper, og for den behandling, der tilbydes den enkelte patient.

Brugen af *microarrays* har vist, at der er tale om ganske få gener med en stærk informationsværdi – oftest 30-70 gener. Hvorfor det lige er disse gener, der har informationsværdi, er stadig en gåde, hvilket viser, at vi endnu kun har afklaret en lille del af den funktion og det samspil, der er generne imellem.

Både vedrørende bryst- og blærekræft er der større multicenterundersøgelser i gang, hvor man simulerer brugen af

genekspressionsklassifikatorer i en klinisk sammenhæng for at kunne tilbyde fordelene herved til patienterne.

Forventningerne til fremtiden er store. På kort sigt forventer vi, at den molekylære klassifikation af f.eks. cancer vinder mere og mere indpas i klinikken. På lang sigt forventer vi nye muligheder for behandling af patienterne baseret på dels en forståelse af, hvordan sygdomme opstår, dels, og i højere grad, baseret på en forståelse af, hvilke mekanismer der er aktive i de afsporede celler – mekanismer, der kan fortælle os om, hvordan det vil gå patienterne, og hvordan de skal følges og behandles. Det forudsættes dog, at vi forstår at opsætte de krævende molekylære forskningsprogrammer baseret på store vævsbanker med klinisk opfølgning.

Korrespondance: *Torben F. Ørntoft*, Klinisk Biokemisk Afdeling, Skejby Sygehus, Århus Universitetshospital, DK-8200 Århus N.

Antaget: 7. april 2005

Interessekonflikter: Ingen angivet

### Litteratur

- Sebolt-Leopold JS, Herrera R. Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nature Rev Cancer* 2004;4:937-47.
- Futreal PA, Coin L, Marshall M et al. A census of human cancer genes. *Nature Rev Cancer* 2004;177-83.
- Dyrskjot L. Classification of bladder cancer by microarray expression profiling: towards a general clinical use of microarrays in cancer diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 2003;3:635-47.
- Amos J, Grody W. Development and integration of molecular genetic tests into clinical practice: the US experience. *Expert Rev Mol Diagn* 2004;4:465-77.
- Wiestner A, Staudt LM. Towards molecular diagnosis and targeted therapy of lymphoid malignancies. *Semin Hematol* 2003;40:296-307.
- Goldstein DB, Cavalleri GL, Ahmadi KR. The genetics of common diseases: 10 million times as hard. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2003;68:395-401.
- Roden DM. Human genomics and its impact on arrhythmias. *Trends Cardiovasc Med* 2004;14:112-6.