

# Konstruerede lægemidler og rationel implementering i klinisk hæmatologi

Overlæge Anne Bukh, overlæge Francesco Annibale D'Amore, overlæge Peter Gimsing, overlæge Hans C. Hasselbalch, professor Hans E. Johnsen, overlæge Gitte B. Kerndrup, overlæge Jørgen S. Kristensen, overlæge Niels A. Peterslund & Dansk Hæmatologisk Selskabs arbejdsgruppe vedr. DMCG-Hæmatologi

Århus Universitetshospital, Aalborg Sygehus, Hæmatologisk Afdeling, Århus Universitetshospital, Århus Sygehus, Hæmatologisk Afdeling, H:S Rigshospitalet, Hæmatologisk Afdeling, Odense Universitetshospital, Hæmatologisk Afdeling, og Amtssygehuset i Herlev, Hæmatologisk Afdeling

»Blood on the Tracks«. *Bob Dylan, 1974*

Flere af os kan stadig huske lægeskolens farmakologiforelæsninger om lægemiddelproduktion, hvor professoren afsluttede med at konkludere: *De fleste af tidens lægemidler er opdaget ved screening af tilfældige substanser, men inden for den nærmeste fremtid vil I opleve, at de udvikles i en forståelse af målorganers biologi og patofysiologi.* Hans forventningsfulde forudsigelse er nu, 30 år senere, ved at blive opfyldt som et resultat af den bioteknologiske revolution.

I denne udvikling har hæmatologien været ledende, og de nuværende behandlinger illustrerer overgangen fra konventionel lægemiddeludvikling til fremtidens målrettede design. I de seneste år har vi fået erfaring med effekten og konsekvensen af f.eks. imatinib og rituximab – på godt og ondt. Imatinib er en signalvejshæmmer med effekt ved kronisk myeloid leukæmi (KML). Rituximab er et monoklonalt antistof rettet mod B-celle-antigenet CD20 ved non-Hodgkin-lymfom (NHL). Præparaterne er dyre, hvorfor introduktionen er blevet en omkostningsmæssig byrde i afdelingernes medicinbudgetter – sammenlignet med tidligere. Den videre implementering af imatinib, rituximab og andre nye skræddersyede lægemidler bør afhænge af lægefaglige og sundhedsøkonomiske overvejelser. I disse overvejelser er det også vigtigt at medinddrage den bioteknologiske udvikling af nye diagnostiske og prognostiske test til brug i den kliniske hverdag.

Mere eller mindre designede lægemidler er altså nu hverdag, og fortidens tilfældige lægemiddeludvikling er forladt. I dag omfatter rækken af lægemidler flere rekombinante vækstfaktorer og deres receptorer, monoklonale antistoffer samt signalvejshæmmere for blot at nævne nogle få. Foran os

ligger de nye muligheder, som skal styres af lægefaglige målsætninger, hvor rationel prognosebaseret behandlingsstrategi bør være i fokus.

I denne artikel bliver der fokuseret på erfaringerne fra det hæmatologiske speciale. Efter en kort præsentation af nogle centrale cellebiologiske og molekylære mekanismer i hæmopoiesen beskrives via eksempler de fremgangsmåder, som benyttes ved design og præklinisk valg i lægemiddelindustrien, og de krav, der stilles til den rationelle implementering i den kliniske hverdag.

## Det hæmopoietiske system som model for design af lægemidler

I perioden 1984-1994 blev de fleste hæmopoietiske vækstfaktorer og deres receptorer klonet. Mange af disse molekyler og deres antagonister bliver i dag brugt i patientbehandlingen. Imidlertid har produktionen af fuldlængdeproteiner været omkostningstung og klinisk krævende, specielt pga. den parenterale administrationsform, hvorfor der i det efterfølgende tiår er udøvet en stor indsats for at finde stabile funktionelle peptider med et terapeutisk potentiale.

Generelt eksisterer der to klassiske opsæt, med hvilke man kan og har identificeret peptider med vækstfaktor- eller receptorlignende effekter. Den mest elegante er peptidfagscreening (*peptide phage display*), hvori man udnytter, at bakteriofager kan præsentere små peptider i proteinmembranen [1]. Ved hjælp af randomiserede nukleotidsekvenser på 10-15 aminosyrepeptider etableres der et bibliotek af op til  $10^9$  unikke, men tilfældigt valgte overfladeproteiner. Efterfølgende bruges disse i et selektivt bindingseksperiment over for receptorer eller ligander. Efter gentagne selektioner og kloning af fagerne udvælges de bedst bindende peptider, som herefter undersøges for biologisk aktivitet.

Herudover kan man også bruge en screeningstrategi baseret på etableringen af store biblioteker af små organiske molekyler, som analyseres for vækstaktivitet i en simpel biologisk, men højproduktiv screeningsproces mod f.eks. cellelinjer [2]. Eksempelvis kan man ved genoverførsel modificere en vækstfaktorafhængig cellelinje til at kopræsentere en interessant receptor i membranen, hvorved cellelinjen kan fungere som indikator for receptoraktivering via en eller flere screenede substanser, når den oprindelige vækstfaktor fjernes. Ved at udnytte automatiske, robotstyrede eksperimentelle opsæt kan man således screene biblioteker af op til  $10^9$  peptider, hvor indikatorcellernes vækst og aktivitet hurtigt og sikkert identificeres ved hjælp af fluorescenssignaler.

De overordnede biologiske mekanismer er kort beskrevet i

## VIDENSKAB OG PRAKSIS | STATUSARTIKEL

det efterfølgende med angivelse af de molekylære angrebepunkter. De mulige strategier omfatter effekt på membranreceptorbinding, signalveje, regulering af celleyklus, apoptose eller celledifferentiering. Forskningen har vist, at der er langt færre signalveje, som aktiveres i kræftprocessen, end der er gener. Med andre ord er resultatet af en bestemt kræftsygdoms forskelligartede udvikling (flertrinssonogogenese) en overraskende ensartet funktionel fænotype med mulighed for molekylær intervention i et begrænset antal aktiveringsspor, som dog selvfølgelig er bestemt af onkogenets mutationsstatus [3].

### Vækstfaktoranaloger og receptorantagonister

Ovenstående strategier er bl.a. brugt ved identifikation af vækstfaktoranaloger til komplekse molekyler som G-CSF [4], erythropoietin og trombopoietin, der yderligere kan modificeres f.eks. ved binding til polyætylenglykol, hvorved de farmakologiske egenskaber forbedres.

Identifikation af receptorantagonister er et direkte resultat af kendskabet til liganders tertiære struktur, bindingssteder og funktion. Baseret på bestemmelse af den/de præcise aminosyresekvens(er) og bindingsstudier kan anlægget til funktionel blokade i cellebiologiske studier analyseres, hvorved potentielle antagonist kan identificeres og konstrueres.

### Hæmning af G-protein og tyrosinkinaser

G-protein-koblede receptorer (GPCR) omfatter den største familie af membranmolekyler, der er fundet at være af patofysiologisk betydning. Ved konventionel screening er der fundet mange brugbare lægemidler med GPCR som mål, men et mere detaljeret kendskab til signalmekanismer i forbindelse med aktivering vil sandsynligvis gøre det muligt at designe specifikke blokerende molekyler. I det hæmopoietiske system omfatter det kemokinreceptorer på de inflammatoriske celler, histaminreceptorer i basofile granulocytter samt mastceller og ikke mindst adenosindifosfat (ADP) og trombinreceptorer i blodplader [5].

Tyrosinkinaseafhængige vækstceptorer og deres ligander er en del af normale og maligne cellers vækstregulering. For mere end 20 år siden fandt *Russell Doolittle* den første ligand, som aktiverer receptorrelaterede tyrosinkinaser. Efterfølgende er der udviklet en række lægemidler, som hæmmer disse tyrosinkinaser i kræftceller [6].

I hæmatologien viste det sig, at et af flagskibene i patogeneseforskningen, kronisk myeloid leukæmi (KML), havde en øget tyrosinkinaseaktivitet baseret på *breakpoint cluster region* (BCR)-ABL-translokationen [6]. Denne erkendelse resulterede i udvikling af en række molekyler, og efter prækliniske studier fremstod tyrosinkinasehæmmeren STI571 (imatinib mesylat) med det største kliniske potentiale. Der er nu udviklet metoder, hvormed man udnytter den tertiære molekylære arkitektur ved analyse af receptor-ligand-funktionerne og derved forbereder vejen for de første rationelt konstruerede lægemidler.

Hos mennesket kendes i dag omkring 60 tyrosinkinaserceptorer, som udtrykkes i malignt væv fra patienter. Bl.a. er det påvist, at leukæmiske blaster ved akut myeloid leukæmi (AML) har omkring 20 receptorer opreguleret omfattende bl.a. FLT3, c-kit og CSF1R. Sådanne patogenetiske informationer er et af fundamentene for udviklingen af nye lægemidler til behandling af AML [7].

### Celleykluskinaser og DNA-reparation

Konventionel kræftbehandling er fokuseret på at ramme DNA-syntesen og celledelingen, klassisk repræsenteret ved lægemidler af typen antimetabolitter og alkylerende stoffer. Selv om stofferne er effektive, er de ikke selektive for kræftceller og kan resultere i svære bivirkninger.

Fuldt udviklede kræftsvulster er et komplekst prolifererende cellulært hierarki, som er genetisk ustabilt og afhængigt af en række onkogener og normale funktioner inklusive DNA-reparationsmekanismer, regulering af celleykluskinaser, som ikke kun regulerer celleyklus, men også er involveret i DNA-reparation og apoptose. *Checkpoint homolog* (CHK) 1- og 2-kinaseaktivitet kan nu hæmmes specifikt af konstruerede peptider og B-celle-leukæmi-2 af antisensemolekyler, hvorved effekten af cancerkemoterapeutika sandsynligvis øges [8].

### Hæmning af retrovirus-associated DNA sequences og transkriptionsfaktorer

*Retrovirus-associated DNA sequences* (Ras)-mutationer er af patogenetisk betydning for det aggressive sygdomsspektrum ved de fleste maligne blodsygdomme, og hæmning af Ras-signaler med farnesyltransferaseblokering (FTI) har vist lovende kliniske resultater ved AML, myelodysplastisk syndrom (MDS), KML og myelomatose (MM). Også mange andre kendte proteiner farnesyleres, hvilket åbner frugtbare muligheder ved konstruktion af nye lægemidler.

Ekspression af differentieringsregulerende transkriptionsfaktorer er også en del af det patogenetiske spektrum, som kan hæmmes eller snarere blokeres, og giver anledning til optimisme omkring nye gennembrud i AML-behandlingen baseret på overlappende blokeringer via kombinationsbehandling [9].

### Monoklonale antistoffer og passiv immunterapi

Antistoffer blev opdaget i 1890'erne, men først i 1960'erne blev det erkendt, at molekylerne var centrale i immunsystemets funktion. En af de mest betydningsfulde landvindinger i moderne kræftbehandling indtrådte med *Köhler & Milsteins* erkendelse af hybridometoden til produktion af monoklonale antistoffer (Mab). I dag foregår der masseproduktion af tusinder af forskellige monoklonale antistoffer i de mange biotekfirmaer, hvis mål er kliniske forsøg. Samtidig har man i laboratoriediagnostikken draget en kæmpefordel heraf.

Fordelen ved brug af Mab er specificiteten og de begræn-

selektive bivirkninger. Målet med behandlingen er at ramme en kræftcelle via et specifikt membranantigen på cellen eller i vævet. Resultatet er celledød sandsynligvis medieret via komplementaktivering og/eller programmeret celledød (apoptose). Der er flere antistoffer indregistreret til brug i hæmatologien. Det mest anvendte er rituximab, et kimært anti-CD20-antistof, som er vist at være effektivt med minimal toksicitet ved lymfomer af B-celle-type [10]. Campath-1H (anti-CD52) har effekt ved kronisk lymfocytær leukæmi af B-celle-type (B-KLL) og T-prolymfocyt-leukæmi, dog med betydelige bivirkninger. Anti-CD33 og anti-CD45-antistoffer er udnyttet til at afgive celledøds toksiske substanser til leukæmiske celler sammen med kemoterapeutika, og anti-vascular endothelial growth factor er under afprøvning ved myelomatose.

Mange nye antistoffer er på vej, og det må formodes, at der inden for få år vil være en række tilsvarende effektive nykonstruerede lægemidler af peptidnatur tilgængelige med specificitet mod andre differentieringsantigener, adhærens molekyler, receptorer, kemokiner, interleukiner og vækstfaktorer. Ligeledes vil aktiv immunisering med onkopeptider med stor sandsynlighed finde sin plads i hæmatologisk regi.

### Fremtidig klinisk implementering af ny hæmatologisk viden og behandling

En afgørende målsætning for hæmatologisk kræftforskning i de kommende år er at omsætte den nye viden til virksomme og skånsomme behandlinger. Mulighederne illustreres bedst af de forventeligt meget potente og forholdsvis bivirkningsfri konstruerede lægemidler, der som ovenfor beskrevet selektivt hæmmer molekulære kræftprocesser. Der tegner sig en fremtid, hvor behandlingen af den enkelte kræftpatient baseres på en påvisning af helt særlige molekulære forandringer, så behandlingen så at sige skræddersys til det enkelte menneske – men for at få fuldt udbytte heraf skal implementeringen i den kliniske hverdag styrkes med en velfungerende forskningsorganisation.

I de næste ti år vil der være tre store udfordringer for hæmatologisk kræftforskning. For det første at identificere nye kræftgener, specielt dem, som initierer kræftprocessen; for det andet at beskrive de stier, der følges ved aktivering af de muterede gener i de forskellige celler, specielt i kræftsygdommens stamceller, og for det tredje at udvikle nye strategier, hvorved de nyeste forskningsresultater kan omsættes til klinisk brug. Utvivlsomt vil de to første udvikles i en hurtig proces, som vil afdække flere kræftgener og protein-protein-interaktioner end det vil være muligt systematisk at vurdere i forbindelse med konstruktion af potentielle nye lægemidler. Hertil kommer, at den kræftbiologiske patogeneseforskning for at følge med de nye genteknologiske landvindinger må udvikles i nye retninger for at validere onkogenetiske events.

Den tredje udfordring er den største, idet absolut eliminering af maligne celler erfaringsmæssigt er en vanskelig opgave, som kun sjældent lykkes i hæmatologisk regi. Men der må

være plads til optimisme nu, hvor kræft ikke er en »ukendt størrelse«, men kan anskues som en flertrinnsproces af mere eller mindre velbeskrevne genetiske ændringer, som synes at benytte et afgrænset antal funktionelle stier, som kan erkendes og kvantificeres som »minimal restsygdom«.

Det kræver organisatoriske og økonomiske tiltag inden for hæmatologien, der som foreslået i Kræftplan og Forskning (KOF)-udvalgets rapport om klinisk kræftforskning til Statens Sundhedsvidenskabelige Forskningsråd, skal omfatte styrkelse af den regionale infrastruktur for klinisk kræftforskning (RIKK) og de danske multidisciplinære cancergrupper (DMCG) under kontrol af de regionale forskningsfora. Det drejer sig om tiltag, der skal afbalancere klinisk og basal hæmatologisk forskning. Med henblik på en effektiv nyttiggørelse af den basale viden i patientbehandlingen er det vigtigt, at miljøerne spiller sammen og er i en lokal optimal balance. Det drejer sig specielt om tiltag, der fremmer et nationalt hæmatologisk netværk med kontakt til og interesse fra internationale miljøer.

Disse tiltag haster inden den alvorlige økonomiske krise, som kan forudses pga. de stigende lægemiddelomkostninger, vil oversvømme specialet og bortvaske de innovative miljøer i de hæmatologiske afdelinger og laboratorier. Hvad, der kommer til at ske, afhænger af en kollektiv og solidarisk indsats fra mange, herunder personer, som normalt ikke sidder ved samme bord – men tiden er inde nu, hvor de internationale landvindinger inden for farmakogenetik skal implementeres i Danmark!

Til sidst må det ikke glemmes, at hele projektet bør sættes i forhold til de forventninger, som er rejst. Det er nødvendigt, at investeringerne på længere sigt afgørende kan reducere sygelighed og død hos hæmatologiske kræftpatienter. Forventningerne skal også omfatte det forhold, at identifikation af nye kræftgener og beskrivelse af deres funktioner med en vis sandsynlighed vil resultere i nye og simple diagnostiske blodtest, som kan bruges ved sikker screening og risikovurdering mhp. intervention – så antallet af kræftdødsfald reduceres i de næste ti år.

Opnå det, er der afsat endnu et blodspor.

Korrespondance: Hans E. Johnsen, Hæmatologisk Afdeling L, Amtssygehuset i Herlev, DK-2730 Herlev. E mail: h.e.johnsen@dadlnet.dk

Antaget: 8. april 2005

Interessekonflikter: Ingen angivet

### Litteratur

1. Arkin MR, Wells JA. Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing towards the dream. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:301-17.
2. Geysen HM, Schoenen F, Wagner D et al. Combinational compound libraries for drug discovery: an ongoing challenge. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:222-30.
3. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*. 2004;10:789-99.
4. Kusano K, Ebara S, Tachibana K et al. A potential therapeutic role for small nonpeptidyl compounds that mimic human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 2004;103:836-42.
5. Covic L, Misra M, Badar J et al. Pepducin-based intervention of thrombin-

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 metaboliseringsenzymers 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.