

PROTEINLÄKEMEDEL KAN NU SKRÄDDARSYS

Målsökande och förstörande cancermedicin snart möjlig

Den bioteknologiska forskningen förändras mycket snabbt. Från att initialt vara produktion av naturligt förekommande proteiner, som kan användas vid substitutionsterapi, ser vi nu en rad andra områden inom den medicinska forskningen där biotekniken används som ett viktigt forskningsredskap.

Biotekniken utvecklas initialt för att ta fram proteiner och använda dessa vid substitutionsterapi. De första proteiner-na framställdes med hjälp av bakterier. En human gen kodande för ett protein som man ville framställa introducerades i en E coli-bakterie via en plasmid. Man kunde på detta sätt producera en rad olika proteiner (Figur 1). Som exempel kan nämnas insulin, tillväxthormon samt en rad olika proteiner för cancerbehandling, bl a α -interferon, interleukin-2 och granulocytkolonistimulerande faktor (GCSF).

Mer avancerade produktionssystem

För att kunna framställa mer komplexa, naturligt modifierade proteiner, där proteinerna t ex har många disulfidbindningar som måste formas på rätt sätt, proteinerna är glykosylerade eller

Författare

STAFFAN JOSEPHSON

fil dr, professor, Head of Biology/
Biotechnology Research

PETER LIND

fil dr, Project Team Leader, båda vid
Pharmacia & Upjohn

THOMAS TÖTTERMAN

professor, överläkare, sektionen för
klinisk immunologi och transfusionsmedicin, Institutionen för kliniska laboratorievetenskaper, Uppsala universitet, samt Akademiska sjukhuset, Uppsala.

andra posttranslationella förändringar är nödvändiga för full aktivitet, var man tvungen att ta fram mer avancerade produktionssystem [1]. Man använde sig av en animal cell, »Chinese hamster ovary cell» (CHO-cell), som produktionsredskap. CHO-cellen valdes då det är en av de celler som är bäst karakteriserad. Fördelen med att använda animalceller är att de på ett naturligt sätt kan modifiera de proteiner man vill framställa.

För att introducera humana gener in i en animalcell finns olika metoder. Den vanligaste går ut på att den gen man är intresserad av förs in i cellen med hjälp av en viral vektor. Genen kommer att inkorporeras i cellens eget genom. Man kan sedan med hjälp av vissa specifika droger amplifiera kopietalet av genen och på detta sätt få fram en stabil och högproducerande cellinje som tillverkar det önskade proteinet. Med hjälp av CHO-celler har man tagit fram en rad olika läkemedelssubstanser, exempelvis plasminogenaktivator för att lösa upp blodproppar, erythropoietin för att stimulera bildandet av röda blodkroppar och faktor VIII för behandling av blödersjuka.

På senare tid har det också börjat utvecklas andra generationens proteinläkemedel, där man arbetar med specialframställda proteiner. Man har framförallt inom cancerforskningen utvecklat en rad fusionsproteiner, där man har en antikroppsdel riktad mot en speciell cancercell kopplad till ett toxin. Det nyskapade proteinet kommer att söka sig till tumörcellen, som tar upp toxinet (fusionsprotein) och på detta sätt dödas. Inom läkemedelsindustrin arbetar man med en rad olika specialproteiner. Som exempel kan nämnas antikroppsfragment kopplade till superantigener (immunstimulerande substanser) för användning vid cancerterapi, ett modifierat apolipoprotein (viktigt för kolesteroltransporten) för behandling av ateroskleros samt ett modifierat faktor VIII-protein (bara den aktiva delen av proteinet produceras) för behandling av blödersjuka.

Vi kan alltså med hjälp av biotekniken skraddarsya en hel rad nya proteiner med specifika egenskaper vad gäller ak-

SERIE

Klinisk läkemedelsutveckling

Tidigare artiklar i serien »Klinisk läkemedelsutveckling» har varit införda i Läkartidningen nr 28–29/97.

tivitet och specificitet, för användning som läkemedel.

Kliniska aspekter på bioteknologiska produkter

Bioteknologiska produkter har ur klinisk synvinkel både för- och nackdelar jämfört med konventionella kemiska substanser. Det stora flertalet bioteknologiska läkemedel består av rekombinant uttryckta proteiner eller stora peptider som är identiska eller mycket lika människans egna proteiner. Nedbrytning och utsöndring av dessa rekombinanta läkemedel sker därför på samma sätt som för det endogena proteinet och ger då heller inte upphov till nya aktiva metaboliter som kan resultera i biverkningar. Halveringstiden och därmed den faktiska koncentrationen över tiden kan dock på grund av administrations-sättet skilja sig från den för det kroppsegna proteinet.

En av nackdelarna med bioteknologiska läkemedel är den oftast obekväma administrationsformen. Rekombinanta proteiner kan liksom de flesta proteiner inte absorberas intakta via mag-tarmkanalen. De måste därför i stort sett alltid ges via injektion, intravenöst, subkutan eller intramuskulärt och inte genom peroralt intag, vilket vore att föredra både för patient och för sjukvårdspersonal. Många försök pågår sedan länge att finna sätt att formulera proteiner i en form som tillåter peroralt upptag, men ännu har ingen lyckats. Försök görs även med intranasal administration av proteiner på samma sätt som används för mindre peptider.

Stora skillnader

Föroreningsmönstret hos rekombinanta proteiner skiljer sig mycket från det man finner hos kemiskt syntetiserade läkemedel. De speciella föroreningar som kan förekomma hos rekombi-

nanta läkemedel är produktspecifika proteinvarianter och värdcellsproteiner eller nukleinsyror. Varianter av proteinet kan uppkomma under odling, rening eller uppstå under lagring av den färdiga produkten. Dessa snarlika varianter av den önskvärda substansen kan ha förändrad biologisk aktivitet eller potentiellt ge upphov till immunologiska reaktioner hos patienten vid upprepad dosering. För läkemedelstillverkaren är det därför av största vikt att isolera, identifiera och karakterisera alla uppkomna varianter av det rekombinanta proteinet, speciellt med avseende på biologisk aktivitet. Med tiden har dock oron för immunologiska reaktioner av produktvarianter eller värdcellsproteiner minskat. På marknaden förekommer idag flera läkemedel, däribland insulin och tillväxthormon, som skiljer sig med en eller flera aminosyror från det kroppsegna proteinet. Erfarenheterna av de kliniska effekterna av ett antikroppssvar hos dessa har hittills varit odramatiska och som mest resulterat i minskad effekt av produkten.

Nukleinsyraföreningar kan potentiellt förekomma både från värdcell och från kontaminerande virus. Hypotetiskt skulle dessa kliniskt kunna resultera i celltransformation alternativt viruspropagation hos mottagaren. Rekombinanta läkemedel monitoreras därför noggrant både under produktionprocessen och som slutprodukt med avseende på förekomst av nukleinsyra ner till pikogramnivåer och förekomst av virus. Såvitt känt har det hittills inte förekommit några biverkningar beroende av denna typ av potentiella kontaminanter i rekombinanta läkemedel.

Bioteknik för produktion av målproteiner

De senaste tio åren har medfört en smärre revolution när det gäller den mo-

lekylära förståelsen för de farmakologiska effekterna av många av våra läkemedel. Den typ av ytreceptorer på cellen till vilka en stor del av dessa binder har kunnat karakteriseras i detalj tack vare moderna molekylärbioologiska tekniker. Den kanske viktigaste gruppen av dessa ytreceptorer utgörs av de så kallade sju-transmembran- eller serpentinreceptorerna [2]. Hit hör t ex monoaminreceptorerna och vissa hormonreceptorer. Genom kloningsarbete har man kunnat påvisa långt större diversitet inom denna grupp receptorer än som varit möjligt med farmakologisk metodik. Man har exempelvis påvisat att det existerar mer än tio olika serotoninreceptorer, varav endast en del karakteriserats farmakologiskt. Genom att ta fram molekylärt klonade receptorer, uttryckta på ytan av speciella cellinjer, kan man sedan använda dessa för att söka efter substanser som fungerar som mycket specifika agonister eller antagonister. Detta kan ske med rationella storskaliga tekniker varvid tiotusentals substanser kan utvärderas inom loppet av ett par månader. Flera stora läkemedelsföretag utnyttjar numera denna teknologi, och detta kan förväntas ge nya generationer mycket specifika läkemedelssubstanser med reducerat spektrum för biverkningar inom exempelvis psykofarmakaområdet.

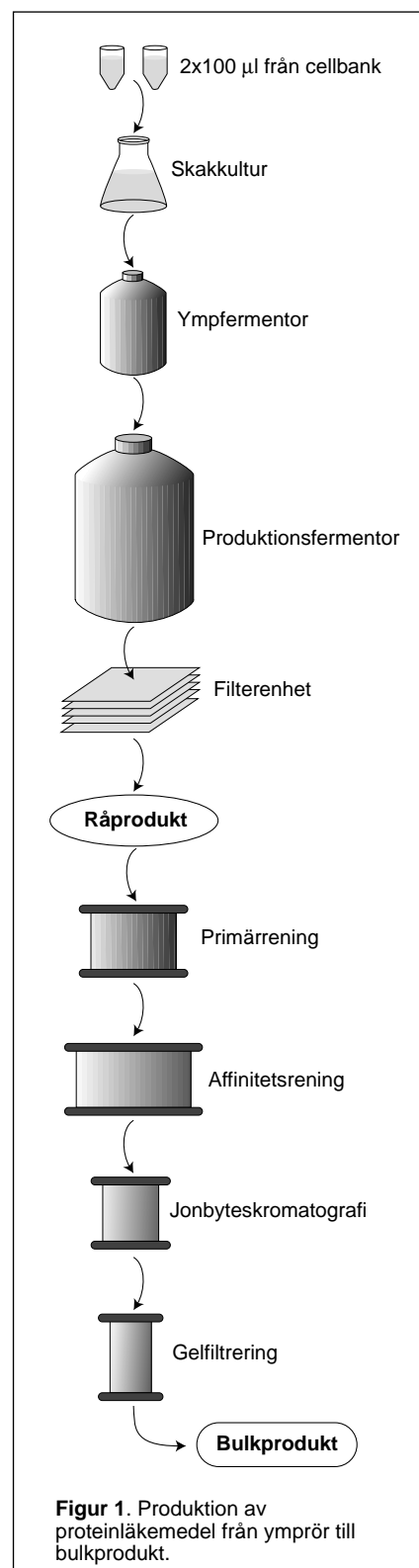
Förståelsen ökar

Ett annat område inom vilket vår kunskap ökat på ett påtagligt sätt de senaste åren är förståelsen av den molekylära bakgrunden för reglering av cellers tillväxt. Efter upptäckten av de cellulära onkgenerna för drygt tio år sedan har man nyligen börjat förstå de signaleringsvägar inom cellen som styr proliferation hos normal och malign vävnad. En del av dessa signaleringsvägar utgår från eller medieras via proteinkinaser som fosforylerar

aminosyrorna serin, treonin, respektive tyrosin. Flera olika typer av tyrosinkinaser tycks vara involverade i den maligna processen. Ett exempel på detta är tyrosinkinasen c-Abl som är felaktigt reglerat i kronisk myeloisk leukemi (KML). I detta fall har genom en translokation mellan kromosomerna 9 och 22 genen kodande för c-Abl sammansmält med en annan gen, BCR, vilket gör att det nya proteinet Bcr-Abl

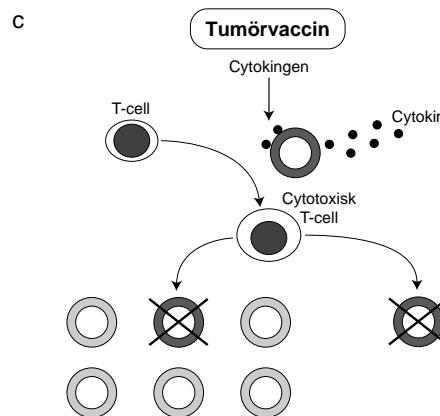
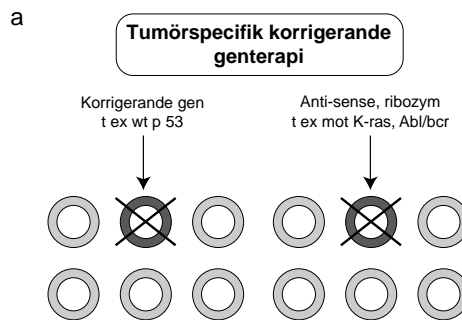
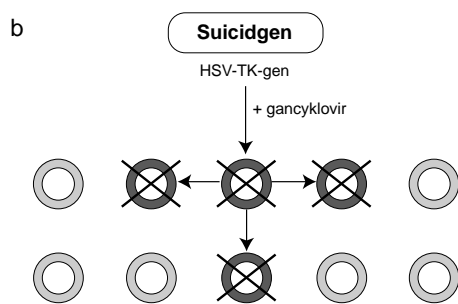
Tabell 1. Metoder för genöverföring till humana celler och deras troliga tillämpning vid genterapi.

Metoder	Tillämpning vid genterapi		Transient (T) eller stabilt (S) genuttryck	Krav på delande målceller
	ex vivo	in vivo		
Virala				
Retrovirus	+	+	S	+
Adenovirus	+	+	T	-
Adeno-associerat virus	+	?	S	-
Herpesvirus	+	+	T	-
Vacciniavirus	-	+	T	-
Poliovirus	-	+	T	-
Semliki Forest-virus	+	+	T	-
Icke-virala				
Ligand-DNA-konjugat	-	+	T	-
Adenovirus-ligand-DNA	-	+	T	-
Liposomer	+	+	T/S	-
Direktinjektion av DNA	-	+	T	-
Kalciumfosfat	+	-	S	-
Elektroporering	+	-	T/S	-



Figur 1. Produktion av proteinläkemedel från ymprör till bulkprodukt.

Figur 2 a–c. Tre principer för genterapi vid cancer. Cancerceller har markerats med mörkare cytoplasma. Vid *tumörspecifikt korrigerande genterapi* (a) strävar man efter att föra in den terapeutiska genen i samtliga tumörceller. På bilden en gen kodande för normalt p53 tumörsuppressor (wt p53)-protein, respektive gener för anti-sense- och ribozymmolekyler vilka blockerar abnormt onkogenuttryck. Metoden lämpar sig därför bäst vid lokaliserade tumörer (CNS, bronker, urinblåsa). Retrovirala vektorer används oftast eftersom dessa transducerar endast delande (=tumör)celler. Liknande principer och begränsningar gäller vid *suicidgenterapi* (b). En retrovirusvektor med genen för enzymet HSV-TK (se text) injiceras lokalt i en avgränsad tumör, varvid de prolifererande cellerna (främst tumörcellerna) kommer att uttrycka enzymet. Vid intravenös tillförsel av gancyklovir bryts detta ned av HSV-TK till toxiska metaboliter vilka stör DNA-syntesen och dödar cellen. En spridningseffekt ses till närliggande tumörceller. Immunmodulerande genterapi strävar efter att stimulera tumörspecifika mördar-T-celler. Vid tillverkning av *tumörvaccin* (c) tas patientens tumörceller ut och transduceras in vitro med en virusvektor kodande för ett cytokin, exempelvis interleukin-2 (IL-2), tillväxtfaktorn för T-lymfocyter. Efter bestrålning injiceras de IL-2-sekreterande tumörcellerna subakut som ett cellulärt vaccin.



har en okontrollerad konstant påslagen tyrosinkinasaktivitet.

Förhindrar tumörtillväxt

Detta medför att cellerna erhåller en kontinuerlig tillväxtestimulering och ej längre kan differentiera på normal sätt. Genom att utnyttja känd tredimensionell struktur hos proteinkinaser samt molekylärt klonat c-Abl har man på ett rationellt sätt kunnat utforma ett antal mycket specifika inhibitorer för detta tyrosinkinas [3]. Dessa substanser fungerar som effektiva tillväxthinhibitorer och kan in vitro avdöda tumörceller uttryckande Bcr-Abl. Djurförsök har visat att denna typ av substanser har en påtaglig förmåga att förhindra tumörtillväxt. Detta kan tjäna som exempel på hur fruktbarheten i kombinationen mellan molekylärt och strukturellt inriktad biologi kan ge en helt ny typ av mycket specifika läkemedelssubstanser inom området onkologi.

Genterapi

Den teoretiska grunden för genterapi vid monogena sjukdomar, cancer och HIV, dvs kunskapen om specifika genetiska förändringar och resulterande avvikelser på proteinnivå, är klarlagd i många fall. Den faktor som tills vidare begränsar tillämpningen av genterapi i klinisk skala är avsaknaden av

effektiva vektorer för uttryck av den terapeutiska genen i rätt cell, rätt vävnad och i korrekt omfattning. Edvard Smith [4] och Sven Britton m fl [5] har nyligen i Läkartidningen gett korta lägesrapporter rörande genterapi hos människor. De hittills använda metoderna för genöverföring kan indelas i virala och icke-virala (Tabell I). Säkerhetsmodifierade virala vektorer baserade på murint retrovirus (Moloney murine leukemia virus) respektive humant adenovirus (serotyp 5) har använts mest [6], medan katjoniska liposomer innehållande plasmid-DNA fått viss tillämpning vid cystisk fibros. De virala vektorerna måste byggas om för ändamålet: gener som styr virusdelning och kodar för strukturproteiner elimineras och ersätts med den nya terapeutiska genen kombinerad med ett styrelement, promotor. Vektorn byggs sedan in i ett »tomt» virushölje i en för ändamålet omkonstruerad producentcelllinje.

Rigorös kontroll

Produktens kvalitet kontrolleras rigoröst med avseende på genskvens, kontamination av delningskompetent virus, pyrogen, etc. Vektorer avsedda för klinisk genterapi måste tillverkas i särskilda GMP(good manufacturing practice)-laboratorier under mycket

noggrann kontroll, vilket har begränsat tillgången och driver upp kostnaden på det genetiska materialet. Man diskuterar nu i Sverige inrättandet av ett nationellt GMP-laboratorium för att befärma utvecklingen. Omfattande grundforskning kring virusvektorer är nödvändig för att eliminera problem med tropism, immunogenicitet och effektivitet. Trots dess begränsningar förefaller virusbaserade vektorer att förbli genterapeutens bästa verktyg under de närmaste åren.

Innovativa strategier

Cancer är den hittills viktigaste indikationen för preklinisk och klinisk genterapiforskning. Ett flertal innovativa strategier för genterapi vid cancer har utvecklats och testats i djurmodeller, och försök pågår i människa [7]. Ett uppenbart syfte för genterapi kunde vara att ersätta muterade supressorgener (t ex p53), eller förhindra uttrycket av muterade (t ex K-ras) och translokerade (t ex Bcr-Abl vid KML) onkogen i tumörcellerna (Figur 2a). Denna »korrigerade» genterapi kräver dock att man lyckas föra in en vektor kodande för terapigenen i samtliga cancerceller men ej i normala celler, vilket kan visa sig svårt. Principen för »suicidgener» (Figur 2b) innebär att tumörceller transduceras med en vektor kodande för ett

»pro-drug converting»-enzym, såsom herpes simplex virus tymidinkinas (HSV-TK). Detta enzym spjälkar det antivirala läkemedlet gancyklovir till toxiska metaboliter vilka dödar transducerade, men även kringliggande tumörceller. Den kanske mest lovande metoden är sk immunmodulerande genterapi, dvs försök att på olika sätt stimulera tumörspecifika T- och B-lymfocytters förmåga att döda tumören. Tumörspecifika/associerade antigener har nyligen identifierats vid bl a melanom, ovarial-, njur- och bröstcancer samt vissa typer av leukemi/lymfom. Tumörvacciner (Figur 2c) konstrueras genom att isolerade tumörceller transduceras in vitro med en viral vektor kodande för immunstimulerande molekyler, t ex T-cellsaktiverande cytokiner. Efter bestrålning används cellerna som ett subkutant vaccin, avsett att aktivera tumörriktade cytotoxiska T-celler (och antikroppsproducerande B-celler). Recirkulerande T-celler uppsöker och avdödar även mikrometastaser. Lovande resultat ses i djurmodeller.

Referenser

1. Kaufman RJ. Mammalian recombinant proteins structure function and immunological analysis. *Current Opinion in Biotechnology* 1990; 1: 141-50.
2. Watson S, Arkininstall S. The G-protein linked receptor factsbook. London: Academic Press, 1994.
3. Drukes BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S et al. Efforts of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nature Medicine* 1996; 2(5): 561-6.
4. Smith E. Genterapi – förväntningar och förverkligande. *Läkartidningen* 1996; 93: 349-50.
5. Britton S, Larsson S, Åhrhult-Richter L. Ribozym-baserad genterapi mot HIV. *Läkartidningen* 1994; 91: 3491-4.
6. Jolly D. Viral vectors for gene therapy. *Cancer Gene Ther* 1994; 1: 51-64.
7. Collins MKL, ed. Gene therapy. *Seminars in Cancer Biology* 1994; 5: 403-43.

DE AVGÖRANDE STEGEN KOSTAR MILJARDER

Omfattande studier svarar på många frågor

Vetenskaplig planläggning och ett kvalitetspräglat genomförande är två nyckelbegrepp inom all klinisk forskning, men speciellt betydelsefulla är dessa i de omfattande program som syftar till att säkerställa sambandet mellan läkemedel och nytta, relaterat till icke önskade effekter.

Kommer det att fungera? är den primära frågeställningen för de avgörande stegen inom klinisk forskning, fas III och en del fas IV-prövningar.

Aldrig är läkemedelsindustrin och de kliniska forskarna så övertygade om ett nytt läkemedels möjligheter som efter de initiala prövningarna i fas I och fas II då man visat att preparatet kan komma att fungera. Men det är först efter de omfattande och rigorösa fas III-prövningarna och vissa tidskrävande fas IV-program som man verkligen vet om ett läkemedel fungerar.

Tid och kostnader är två andra viktiga begrepp vid utveckling av ett nytt läkemedel. Att föra en ny substans från syntes till registrering beräknas ta omkring tio år till en kostnad av i storleksordningen 1 miljard kronor eller mer (Figur 1).

En annan betydande faktor som är relaterad till tidskomponenten är patienttiden för en substans eller en process. Denna faktor har på ett avgörande sätt bidragit till att läkemedelsindustrin idag fokuseras på att korta utvecklingstiden med bibehållna kostnader för att uppnå en maximal marknadsfas under gällande patentskydd. Detta har lett till stegrade krav på kunskap och kreativitet hos de personer som deltar i det kliniska utvecklingsprogrammet.

Logiskt tänkande viktigt

Logiskt tänkande, förmåga att ställa de rätta frågorna samt att ifrågasätta svaren är viktiga egenskaper vid planering av alla prövningar, men speciellt viktiga i fas III och fas IV på grund av deras omfattning.

Vad innebär det att studierna är omfattande? Vi har här valt att försöka be-

SERIE

Klinisk läkemedelsutveckling

Tidigare artiklar i serien »Klinisk läkemedelsprövning» har varit införda i Läkartidningen 28–29/97.

svara frågorna Vem? Vad? Hur? och När?

VEM?

I fas III-prövningar är svaret på frågan vem en stor grupp frivilligt medverkande patienter hos vilka behandlingseffekten skall påvisas. Detta gäller såväl registrering av nya behandlingsprinciper som etablering av nya indikationer för ett befintligt läkemedel. Patientmaterialen i fas III är också större än i fas II för att om möjligt efterlikna klinisk praxis och stärka resultatens generaliserbarhet.

De stora utmaningarna i fas III-studierna beror till en del på slumpfaktorn, men i en högre grad på de systematiska felen (bias). Ett större patientantal dämpar slumpens inflytande på resultatet, men alltmer komplicerade protokoll och allt fler centra i multicenterprövningar ökar risken för systematiska fel, dvs situationsbetingade avvikelser ifrån protokollet. Det är viktigt att känna till om de 200 patienter som inkluderats i studien härrör från en för prövningen tillgänglig patientpopulation på 200, 1 000 eller 4 000, om prognostiska faktorer påverkat selektionen medvetet eller omedvetet samt om randomiseringen genomfördes konsekutivt som ut-

Författare

ANNIKA WALLSTRÖM
apotekare, Pharmacia & Upjohn
Metabolic Diseases, Stockholm

ANDERS ROSÉN

professor, Firma Anders Rosén (f d Bristol Myers-Squibb och Läkemedelsverket), Stockholm

MARIANNE KEISU

med dr, Astra Arcus AB, Södertälje.