

**Anders Rane**, professor, klinikchef, Karolinska institutet, institutionen för medicinsk laboratorievetenskap och teknik, avdelningen för klinisk farmakologi, Huddinge Universitetssjukhus ([Anders.Rane@labtek.ki.se](mailto:Anders.Rane@labtek.ki.se))

## Kartläggningen av det mänskliga genomet bara början

### Utvecklingen av farmakogenomiken nästa stora steg

■ Trettio tusen gener och tre och en halv miljarder baspar har identifierats i människans genom. Kartläggningen har kostat enorma belopp och de akademiska och kommersiella insatserna saknar motstycke. Publiceringen av genomets sammansättning skedde samtidigt i *Nature* [1] och *Science* [2] i år, med stor uppmärksamhet i massmedierna. Manifestationerna gav uttryck för ett segerrus och en markering av kartläggningens slut.

Vad som inte blev uppmärksammat i samma utsträckning var att händelsen också markerar övergången till den postgenomiska fasen, som nu inleds. Den fasen kräver långt större insatser och resurser och kommer att ta mångfaldigt längre tid.

#### Från genotyp till fenotyp

Samhället har stora förväntningar på betydelsen av de nya kunskaperna och den forskning som genereras. Kommer nya principer för läkemedelsbehandling att snart kunna lanseras?

»Proteomics« är vetenskapen om mönstret och funktionen av genprodukterna. Denna vetenskap kommer att bli mycket viktig i framtiden. Möjligheten att förutse strukturen av ett äggviteämne utifrån genomsekvensen kan skapa förutsättningar att bestämma vilka läkemedelsmolekyler som proteinet kan interagera med och vad funktionen är – ett enzym, en receptor, ett transportprotein etc [3]. Men *in silico*-prediktion av funktionen är inte tillräcklig. Därför måste *in vitro*-test utföras, och eftersom majoriteten protein är integrerade med cellulära fettmembran måste deras funktion också testas i celler eller *in vivo* i den intakta organismen.

Identiteten hos proteinet och dess funktion kan ofta konfirmeras i försök, där genuttrycket moduleras med transfektion eller antisensnukleotidbehandling. Man måste dock komma ihåg att såväl genuttrycket som funktionen hos genprodukten kan vara olika i olika vävnader och organ.

Reduktionistiska forskningsinsatser är i sig inte tillräckliga för att förklara och predicera de komplexa förhållandena som gäller *in vivo*. Därför måste de kombineras med ett fysiologiskt forskningsperspektiv för att ge största nytta. För att pröva nya farmakologiska principer är det viktigt med tvärdisciplinärt samarbete mellan molekylär genetik och de fysiologiska, farmakologiska och kliniska vetenskaperna.

Sekvensbestämningen av det humana genomet har avslöjat ett stort antal variationspunkter av olika slag, bl a »single nucleotide polymorphisms« (SNP). De utgör den vanligaste formen för skillnader mellan individer och innebär att enstaka nukleotider i DNA-sekvensen är utbytta. Deletioner, dvs avsaknad av en sekvens, eller insertioner (extra nukleotider) är mindre vanliga än SNP. Man räknar med att det finns ca 1,42 miljoner SNP [4], men huvuddelen har troligen ingen betydelse för individens fenotyp eftersom de finns i de icke-kodande regionerna.

Även bland SNP i de kodande regionerna är en stor del utan betydelse, eftersom de inte leder till förändringar i proteinet (s k synonyma SNP). Det är därför sannolikt att relativt sett få förändringar i genomet har funktionell betydelse i ett biomedicinskt och kliniskt perspektiv.

#### Vad gör vi med all information?

Läkemedelsindustrin har redan gjort stora investeringar och letar nu efter nya och viktiga måltavlor för läkemedelsbehandling, s k »drug targets«. Dessa består av enzym eller receptormolekyler, vars funktion kan ha ett direkt eller indirekt samband med sjukdom eller sjukdomsbehandling. Jaktens på kandidatläkemedel som kan påverka de sjukdomsrelaterade genprodukterna pågår samtidigt.

Med s k »high throughput screening«-metodik (HTS) kan man använda expressionssystem, eller »bio-assays«, för att söka efter specifika effekter *in vitro*. Vad sådana resultat har för relevans i den intakta organismen är dock svårt att förut säga. Det slutliga beviset, »proof of concept«, ser man inte förrän läkemedelssubstansen undersöks i djurförsök eller i kliniska prövningar. Först då är det möjligt att bedöma utsikterna till en värdefull farmakologisk behandling.

För närvarande räknar man med att ca 500 proteiner är måltavlor för läkemedelsbehandling. Det är lätt att inse att ekonomiska och praktiska hinder gör det omöjligt att studera ett större antal av de ca 30 000 identifierade generna med utgångspunkten att söka efter måltavlor. Vägen från att förutse en proteinstruktur utifrån genomsekvensen (*in silico*) via *in vitro*-studier i HTS-format, prekliniska *in vivo*-studier och slutligen kliniska studier kommer att kräva massiva finansiella investeringar. Det är osannolikt att detta kommer att ge märkbara resultat under den närmaste tioårsperioden. Därför

## *Kartläggningen av det humana genomet markerar början på en oändligt lång tidsperiod för funktionell genomik eller, i ett farmakoterapeutiskt sammanhang, farmakogenomik.*

måste genetikbaserade läkemedelsutvecklingsprogram bygga på välgrundade teorier och intelligenta sökningar och studier av relevanta gener.

### **Från fenotyp till genotyp**

De flesta egenskaper fördelar sig i populationen enligt en normalfördelningskurva. Det gäller såväl fysiska som fysiologiska egenskaper, inklusive metabolism. Liksom hittills kommer det i fortsättningen att vara lika viktigt att upptäcka nya gener utifrån kliniska observationer av individer som faller utanför det normala området för en egenskap, exempelvis metabolisk kapacitet, eller receptormedierat behandlings-svar [5].

Sådana observationer har lett till många upptäckter av nya farmakologiska behandlingsprinciper och polymorfier [6, 7]. Ibland kan dock flera mål-molekyler påverka en sjukdom eller ett behandlingssvar. I sådana fall är chansen att hitta den andra, tredje etc mål-molekylen mindre.

Studier av egenskaper som styrs av en enda gen, t ex inom området läkemedelsmetabolism, har oftast utförts på »paneller« av individer med definierad fenotyp och genotyp, t ex »snabba« eller »långsamma« metaboliserare. Om man vill bekräfta eller utesluta att ett nytt läkemedel bryts ned via en sådan monogen väg är användningen av paneler praktisk och informativ. Principen kan tillämpas både in vivo [8] och in vitro [9]. Identifiering av etniska skillnader i läkemedels kinetik har också lett till upptäckter av nya allelvarianter av gener för läkemedelsmetaboliserande enzymer [10].

För de flesta enzymer och receptorer är dock nedärvnings-mönstret mer komplext. De flesta sjukdomar och egenskaper modifieras av ett flertal gener såväl som av mer eller mindre kända omgivningsfaktorer. Vi vet att genetiska egenskaper kan påverkas av omgivningsfaktorer såsom diet, kemiska miljöföroreningar, läkemedel, eller av konstitutionella faktorer såsom ålder, graviditet etc [11]. För att identifiera det genetiska bidraget till variationen i effekter av läkemedel eller läkemedelsmetabolism måste en annan metodik tillämpas. Om de »normala« fenotypiska varianterna är kända kan man leta efter »avvikande« fenotyper med avseende på t ex läkemedels effekter, absorption, metabolism eller utsöndring. I framtiden blir det viktigt att söka sådana »out-liers« i stora patientkohorter och studera sambandet mellan de avvikande

egenskaperna och förekomsten av specifika variationer i genomet, t ex SNP eller konstellationer av SNP.

Men kedjan blir aldrig starkare än dess svagaste länk. Att mäta de kliniska variablerna är en kritisk men begränsande faktor inom funktionell farmakogenomik. Därför måste de kliniska variablerna, dvs slutmåtpunkterna, »end-points«, vara mycket robusta och väldefinierade och kunna mätas med stor tillförlitlighet och precision. Det gäller oavsett om det är läkemedels effekter, uteblivet svar på en läkemedelsbehandling, biverkningar eller någon annan parameter som man studerar. Ofta underskattas betydelsen av detta.

### **»Polygena kohort-approachen«**

Sökandet efter genetiska förändringar i flera gener hos grupper av individer med avvikande fenotyp, den »polygena kohort-approachen«, kräver att man väljer ut relevanta avsnitt i de intressanta generna för sina studier. Kartan över SNP i det humana genomet [4] är till hjälp när man skall leta efter variationspunkter i de relevanta generna. SNP i den kodande regionen som leder till förändringar i proteinetts sammansättning kommer i första hand att vara av intresse. Men ibland kan även »tysta« SNP vara intressanta [12], eller SNP i den regulatoriska regionen av genen [13]. Mycket talar för att den sam-lade effekten av många SNP eller av specifika SNP-mönster är viktigare att jämföra mot sjukdomar eller andra egenskaper än vad en enstaka SNP är.

Således har det visats att vissa haplotyper i genen för beta 2-adrenerga receptorn har större informativt värde än enstaka SNP för prediktionen av behandlingssvaret för beta 2-adrenerga receptoragonister [14]. Om detta är en generell sanning innebär det att sökandet efter genetiska skillnader mellan olika fenotyper blir mer komplicerat och resultatet svårtolkade.

Numera finns avancerad och effektiv teknologi för att screena ett stort antal SNP. Sådana tekniker innefattar bl a DNA-»microarrays«, »pyrosequencing« etc. För att kunna hantera och tolka stora datamängder är det nödvändigt att involvera bioinformatik i arbetet.

### **Viktigt identifiera patienter i riskzonen för biverkningar**

Funktionell farmakogenomik på klinisk nivå kommer att bli viktigt för att identifiera kända genetiska varianter med rele-

vans inom läkemedelsterapin. Exempelvis blir det viktigt att identifiera patienter i riskzonen för biverkningar [15]. Säkerhet är en av hörnstenarna inom läkemedelsbehandlingen, och nya läkemedel med önskad eller oacceptabla biverkningsprofiler accepteras sällan hur effektiva de än är. Målet är att identifiera patienter som löper särskild risk för biverkningar. Storleken av problemet med biverkningar vid läkemedelsbehandling har nyligen debatterats och beskrivits [16]. I USA utgör biverkningar den femte till sjätte viktigaste dödsorsaken, med över 100 000 dödsfall 1994. Samma år uppskattades antalet patienter som läggs in på sjukhus med allvarliga biverkningar till 2,2 miljoner. Biverkningar drar alltså på sig mycket stora kostnader.

Funktionell farmakogenomik på den kliniska nivån blir också viktig för att identifiera genetiska varianter som svarar bäst på läkemedelsbehandlingen, »responders«.

Andelen patienter som ger förväntat behandlingssvar är en viktig faktor inte bara i den kliniska läkemedelsanvändningen, utan också inom läkemedelsutvecklingen. Avsaknad av effektiva behandlingsformer är mycket kostsam. Att kunna identifiera och utesluta »non-responders« i kliniska prövningar skulle rationalisera läkemedelsutvecklingen och göra den billigare. Därför kommer genetisk karakterisering sannolikt att göras både vid urvalet av studiepatienter i klinisk läkemedelsutveckling och i praktisk sjukvård.

Forskning som baseras på det humana genomet kommer att generera en massiv information om genetiska mönster och deras variationer hos ett stort antal gener i relation till sjukdomar eller deras behandlingar. Detta kallas ibland för »omics-research« [17], dvs en stor mängd data genereras utan förhållande till vilken information eller vilka korrelationer man kommer att finna. I viss utsträckning är våra projekt hypotesbaserade, medan andra delar baseras på hypotesen att vi kommer att hitta viktiga samband mellan å ena sidan sjukdom, läkemedelsvar etc, och å den andra sidan den genomiska variationen. Till sist kan denna »ny-linnéanska« forskningsmetodik leda till nya idéer och hypoteser som kan utgöra incitament till traditionella hypotesbaserade projekt.

## Långt steg från genomkarta till klinisk användning

Kartläggningen av det humana genomet markerar början på en oändligt lång tidsperiod för funktionell genomik eller, i ett farmakoterapeutiskt sammanhang, farmakogenomik.

För en framgångsrik forskning krävs ett antal förutsättningar. De tekniska framstegen har redan gjort det möjligt att kartlägga genomet. Tekniken möjliggör också höghastighetsgenotypning, »high-throughput«-genotyping, och studier av genexpressionsprofiler. Fler kraftfulla metoder och verktyg behövs för att hantera den enorma datamängden inom bioinformatisk vetenskap. Och i klinisk farmakogenomik är det nödvändigt med ytterligare ett antal förutsättningar.

Först och främst måste alla kliniska mätvariabler, »endpoints«, vara robusta och lätta att mäta för att identifiera »response«, »non-response«, biverkningar etc. Sådana data kan sedan kopplas till nationella eller internationella morbiditetsregister och bli utomordentligt värdefulla för studier av olika genvarianters betydelse för uppkomst av sjukdomar.

För det andra behöver vi DNA och vävnadsbanker som är kvalitetssäkrade. Leverbanken vid vår avdelning är ett exempel på en resurs som kan utnyttjas för metaboliska läkemedelsstudier av olika forskargrupper. Material ur fenotyp/genotypregistret kan användas för studier av nya läkemedelskandidater. Vi avser också att sätta upp en farmakogenomisk DNA-bank som skall kunna utnyttjas för klinisk validering av nya allelvarianter eller haplotyper utifrån information från läkemedelsmetabolisk genotypning, som automatiskt genereras i varje laboratorium för kliniska läkemedelsanalyser. Till sist

behövs nätverk och samarbete företrädesvis på IT-basis om man skall samla stora mängder kliniska data.

Steget från genomkartans färdigställande till den kliniska användningen av kunskaperna är stort. För att få ut största möjliga nytta måste ett brett samarbete etableras mellan de molekylära och de kliniska vetenskaperna. Det reduktionistiska forskningsparadigmet måste modifieras och rikta sig mot de fysiologiska och kliniska vetenskaperna för att förklara betydelsen av den genomiska variationen både mellan individer och mellan etniska grupper.

Den farmakogenomiska eran har just börjat.

## Referenser

1. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001;409:860-921.
2. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001;291:1304-51.
3. Bray D. Reductionisms for biochemists: How to survive in the protein jungle. *Trends Biochem Sci* 1997;22:325-30.
4. The International SNP Map Working Group. A map of human genome sequence variation containing 1.4 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001;409:928-33.
5. Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: Translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 1999;286:487-91.
6. Mahgoub A, Idle JR, Dring DG, Lancaster R, Smith RL. Polymorphic hydroxylation of debrisoquine in man. *Lancet* 1977;2:584-6.
7. Eichelbaum J, Spannbrucker N, Steinke B, Dengler HJ. Defective N-oxidation of sparteine in man: a new pharmacogenetic defect. *Eur J Clin Pharmacol* 1979;16:183-7.
8. Brynne N, Dalén P, Alván G, Bertilsson L, Gabrielsson J. Influence of CYP2D6 polymorphism on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of tolterodine. *Clin Pharmacol Ther* 1998;63:529-39.
9. Mortimer Ö, Persson K, Ladona MG, Spalding D, Zanger UM, Meyer UA, et al. Polymorphic formation of morphine from codeine in poor and extensive metabolizers of dextromethorphan. Relationship to the presence of immunoidentified cytochrome P-450IID1. *Clin Pharmacol Ther* 1990;47:27-35.
10. Johansson I, Oscarson M, Yue QY, Bertilsson L, Sjöqvist F, Ingelman-Sundberg M. Genetic analysis of the Chinese CYP2D6 locus. Characterization of variant CYP2D6 genes present in subjects with diminished capacity for debrisoquine hydroxylation. *Mol Pharmacol* 1994;46:452-9.
11. Wadelius M, Darj E, Frenne G, Rane A. Induction of CYP2D6 in pregnancy. *Clin Pharmacol Ther* 1997;62:400-7.
12. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, Johne A, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:3473-8.
13. Rebbeck TR, Jaffe JM, Walker AH, Wein AJ, Makowicz SB. Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1225-9.
14. Drysdale CM, McGraw DW, Stack CB, Stephens JC, Judson RS, Nandabalan K, et al. Complex promoter and coding region  $\beta_2$ -adrenergic receptor haplotypes alter receptor expression and predict in vivo responsiveness. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:10483-8.
15. Roses AD. Pharmacogenetics and the practice of medicine. *Nature* 2000;405:857-65.
16. Lazarou J, Pomeranz BH, Corey PN. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients. A meta-analysis of prospective studies. *JAMA* 1998;279:1200-5.
17. Weinstein JN, Myers TG, O'Connor PM, Friend SH, Fornace AJ Jr, Kohn KW, et al. An information-intensive approach to the molecular pharmacology of cancer. *Science* 1997;275:343-9.