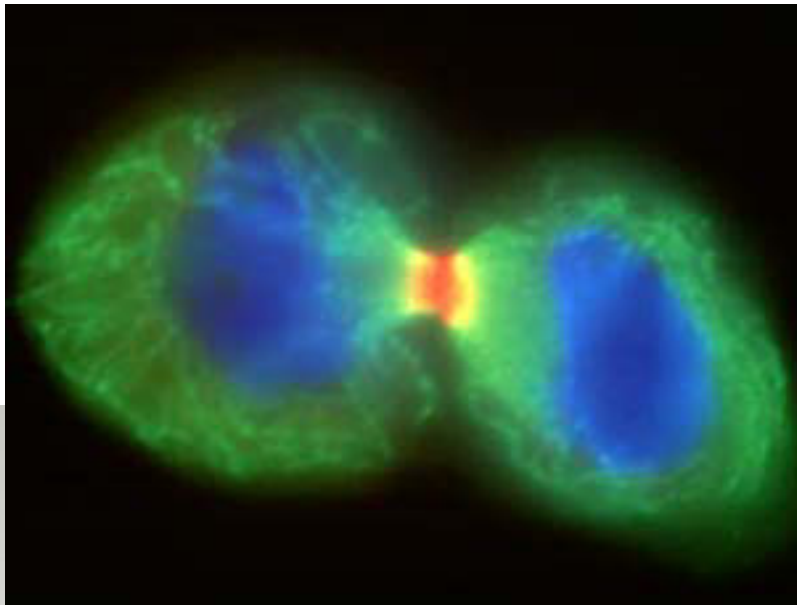


Neue Strategien zur Krebsbekämpfung



Penzberg
September 2001

Roche
Media
Roundtable

Neue Strategien zur Krebsbekämpfung

Zum Titelbild

Zellteilung ermöglicht Leben, Wachstum von Organismen und die Erneuerung von Zellen, deren Lebenszeit abgelaufen ist. Bei Krebs ist dieser Vorgang jedoch außer Kontrolle geraten. Was dabei auf molekularer Ebene geschieht, beginnen wir immer besser zu verstehen.

Die Abbildung auf dem Umschlag zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von humanen Zervixkarzinomzellen während der Zellteilung. Die rot-gefärbten Bereiche zeigen das Vorhandensein des Proteins Survivin, welches bei der Zellteilung eine wichtige Rolle spielt. Das Zellskelett ist grün gefärbt. Die Zellkerne, die die Erbinformation der Zelle tragen, sind blau dargestellt. Die Abbildung stammt von Olaf Mundigl, Roche Penzberg (Abt. Zellbiologie). Penzberg ist für Roche der wichtigste Forschungsstandort im Bereich Onkologie. Am 25. September 2001 fand hier der Roche Media Roundtable «Future Strategies in Cancer Care» statt, über den auf den kommenden Seiten berichtet wird.

Herausgeber:

F. Hoffmann-La Roche AG

Corporate Communications

4070 Basel, Schweiz

© 2001 Editiones Roche

Wiedergabe der Texte und Bilder unter Angabe der Quelle gestattet.

Alle erwähnten Markennamen sind gesetzlich geschützt.

Diese Broschüre ist in Deutsch und Englisch erhältlich.

Redaktion: Dr. Sabine Päuser

Gestaltung: Atelier Urs & Thomas Dillier, Basel

Druck: Gissler Druck, Allschwil

7000 507

Erhebliche Anstrengungen werden in der Forschung unternommen, um künftige Tumorthapie-Konzepte spezifisch auf den jeweiligen Patienten zuzuschneiden. Die Vision ist dabei, die einem Patienten verabreichten Medikamente an die molekularbiologische Charakteristik seines Tumors und dessen genetische Veränderungen anzupassen. Möglich wird dies durch das wachsende Verständnis der molekularen Mechanismen der Tumorentstehung und -ausbreitung. Das zunehmende Wissen wird es künftig erlauben, Diagnoseverfahren auf molekularer Ebene zu entwickeln, und damit die beim jeweiligen Tumorgeschehen relevanten Veränderungen zu erfassen. Eine solche molekulare Diagnostik wird nicht nur neue Therapieentscheidungen ermöglichen; ein positives Testergebnis auf molekularer Ebene wird künftig auch eine Voraussetzung für die Durchführung einer gezielten Therapie sein. Eine spezifische Diagnostik, die voraussagen kann, ob ein Tumor auf die Therapie anspricht, liefert dem Arzt nicht nur Informationen, die bislang nicht zur Verfügung standen, sondern spart auch Kosten im Gesundheitswesen. Für den Patienten können so Lebenszeit und -qualität gewonnen werden, wenn falsche und/oder ungeeignete Behandlungen vermieden werden.

Während es der Diagnostik wesentlich schneller gelingen wird, die neuen Erkenntnisse der Genetik und Genomik in für den Arzt und Patienten nutzbare Informationen umzusetzen, ist die Mehrzahl der Therapieansätze auf molekularer Ebene noch in weiter Ferne. Es ist daher zu erwarten, dass die heute klassischen Grundpfeiler einer Krebstherapie Strahl, Stahl und Chemie, d. h. Strahlentherapie, chirurgische Entfernung des Tumors und medikamentöse Therapien, nach wie vor erhalten bleiben. Je nach Tumorart und -ort werden sie auch in Zukunft zur Krebsbekämpfung eingesetzt – wobei bei all diesen therapeutischen Ansatzpunkten derzeit daran gearbeitet wird, eine möglichst auf das Tumorgewebe beschränkte Wirkung zu erzielen.

So reichen die Versuche, die Chemotherapien effizienter zu gestalten, beispielsweise von der Erprobung neuer Kombinationen und neuer Verabreichungsschemata bekannter Antikrebsmittel, über die Modifikation bekannter Medikamentenstrukturen, bis hin zum Auffinden neuer Wirkstoffkandidaten.

Auch die Suche nach neuen Medikamenten gestaltet sich als molekulare Maßarbeit. Werden mittels Ultra-High-Throughput-Screening biologisch aktive Substanzen aufgespürt, kann ihre Struktur vor der Synthese am Computer mittels *Molecular Modelling* so modifiziert werden, dass sie möglichst genau in eine Schlüsselstruktur des biologisch ausgewählten Zielmoleküls passen.

Im Folgenden möchten wir Ihnen Einblicke in neuere Entwicklungen in den Bereichen der molekularen Diagnostik und der medikamentösen Therapien von Krebs gewähren und einen Ausblick auf ein zukünftiges Gesamtkonzept Tumorthherapie geben. Die Artikel basieren auf den Vorträgen der Referenten des Roche Media Roundtable «Future Strategies in Cancer Care» vom 25. September 2001 in Penzberg, Deutschland.



**Molekulare Onkologie:
Perspektiven für Krebs-
diagnostik und -therapie**

Prof. Dr. Christoph Wagener 7



**Wie uns molekular-
biologische Erkenntnisse
zu neuen Krebs-
medikamenten verhelfen**

Prof. Dr. Dr. Klaus Strein 21



**Immuntherapie
maligner Erkrankungen:
Tumorbehandlung jenseits
von Chemotherapie**

Prof. Dr. Christoph H. Huber 35



**Alltag in einem
onkologischen Labor
Über den Nutzen und die
Grenzen derzeitiger Tumor-
markerbestimmungen**

Dr. Petra Stieber 45



**Neue Diagnostika
ermöglichen spezifische
Krebsbekämpfung**

Prof. Dr. Bärbel Porstmann 57

Prof. Dr. Christoph Wagener

Molekulare Onkologie: Perspektiven für Krebsdiagnostik und -therapie



Während die Anzahl der Todesfälle aufgrund von Herz-Kreislauf-Erkrankungen in den Industrieländern erheblich abgenommen hat, ist die Krebssterblichkeit in den letzten Jahrzehnten fast gleich geblieben. Wenn diese Trends extrapoliert werden, sind maligne Erkrankungen in fünf bis zehn Jahren die häufigste Todesursache. Dennoch ist zu hoffen, dass unsere besseren Kenntnisse über die molekularen Ursachen von Krebserkrankungen zu neuen Strategien in der Krebsbekämpfung führen.

Jeder Tumor ist anders

Warum ist Krebs so schwierig zu behandeln?

Warum sind die Therapieerfolge so gering, dass Krebs wahrscheinlich in weniger als einem Jahrzehnt zur führenden Todesursache in den westlichen Industrieländern avancieren wird, trotz der beträchtlichen finanziellen Mittel, die in die Krebsforschung fließen? Die Antwort ist: Weil Krebs eine so schwierige Erkrankung mit so heterogenen Ursachen, heterogener Entwicklung und heterogenem Verlauf ist. Auf molekularer Ebene versucht man das Problem der Krebssterblichkeit hauptsächlich auf drei Wegen anzugehen.

1. Erfassung jener Patienten, die eine bestimmte Disposition für Krebs haben, durch Nachweis von Mutationen in Keimbahnzellen bei Patienten mit familiärer Häufung einer Krebserkrankung sowie Feststellung von genetischen Veränderungen in Körperzellen, die eine Entartung zu Tumorzellen wahrscheinlich machen;
2. Frühererkennung: Der beste Weg der Krebsbekämpfung ist die *frühe* Diagnose. Frühe Krebsstadien können meist gut behandelt werden, Krebsleiden in weit fortgeschrittenen Entwicklungsstadien sind dagegen schwierig zu behandeln und haben eine schlechte Prognose sowie
3. Entwicklung neuer molekularer Therapieansätze mit der Tumorzelle oder der Tumorumgebung als Angriffsziel.

Um zu verstehen, warum Krebs eine so schwierig zu diagnostizierende und zu behandelnde Erkrankung ist, sollen zunächst einige sehr allgemeine Aspekte der Erkrankung Krebs betrachtet werden.

Tumorentwicklung: ein mehrstufiger Prozess

Im Allgemeinen sind Tumoren klonaler Natur, d. h. sie entwickeln sich aus einer einzigen Zelle.

Diese Zelle erwirbt nach und nach Mutationen bzw. epigenetische Veränderungen, die bestimmte zelluläre Wege oder Prozesse beeinflussen. Bei solchen Prozessen handelt es sich z. B. um Wege der Signalübertragung oder der DNA-Reparatur. Genetische oder epigenetische Veränderungen, die bestimmte zelluläre Prozesse stören, werden im Folgenden als «Prozessereignisse» (engl.: *pathway events*) bezeichnet. Bei Prozessereignissen kann es sich zum Einen um Veränderungen in der Basensequenz der DNA handeln, zum Anderen um die Methylierung¹ von DNA-Basen in sog. Promoterbereichen² von Genen [1]. Wird eine normale Zelle vom ersten Prozessereignis getroffen, erhält der entstehende Zellklon einen Wachs-

Glossar

- Amplifikation:** Vervielfachung eines Gens. In Tumorzellen ist dies häufig mit einem Wachstums- oder Überlebensvorteil verbunden und kann zur Resistenzentwicklung eines Tumors gegenüber Chemotherapie beitragen.
- Deletion:** Verlust von einzelnen Nukleotidbasen der DNA, DNA-Fragmenten oder Chromosomenabschnitten.
- Promotermethylierung:** Methylierung der Promoterregion. Die Promoterregion ist die Sequenz auf der DNA, an der die Transkription beginnt. Sie ist Erkennungsort für die RNA-Polymerase.
- Polymorphismus:** Die Existenz von zwei oder mehr alternativen Formen eines Gens, die sich am selben Genlocus zweier homologer Chromosomen befinden und die in der Bevölkerung mit einer signifikanten Häufigkeit vorkommen.
- Transkription:** Die Synthese einer RNA-Kopie eines Gens.
- Translation:** Synthese eines Polypeptides, dessen Zusammensetzung durch die Abfolge der Basen in der Boten-RNA (m-RNA) bestimmt ist.
- Translokation:** Übertragung von Chromosomenabschnitten zwischen nicht homologen Chromosomen.

Bedeutung der Abkürzungen

- APC:** Gen, das bei der familiären adenomatösen Polyposis coli von Veränderungen betroffen ist.
- BRCA1 / BRCA2:** Gene, die bei vererbten Formen von Brustkrebs bestimmte Mutationen aufweisen. Die Bezeichnung kommt vom englischen Wort **B**rest **C**ancer.
- K-RAS:** RAS-Gene sind Onkogene, d. h. diese Gene können, wenn sie Mutationen oder Fehlregulationen aufweisen aktiv an der Entstehung eines malignen Tumors beteiligt sein.
- MEN II:** steht für **M**ultiple **E**ndokrine **N**eoplasie Typ II, krankhafte Veränderungen mit hormonproduzierenden Tumoren in zwei oder mehreren Organen.
- P53:** Gen, welches für das Phosphoprotein P53 kodiert. Das Protein P53 übt die Funktion eines Tumorsuppressors aus.
- RAD51:** Das vom *RAD51*-Gen kodierte RAD51-Protein spielt eine Rolle bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen, die z. B. durch Bestrahlung hervorgerufen werden. Die Bezeichnung stammt vom englischen **RAD**iation.
- RET:** Onkogen, das eine Rezeptor-Tyrosinkinase kodiert und in vielen bösartigen Schilddrüsentumoren verändert ist. Die Bezeichnung stammt von **R**Earranged during **T**ransfection.

tumsvorteil. Nach Expansion des Klons wird eine Zelle dieses Klons von einem zweiten Prozessereignis getroffen, welches dieser Zelle wiederum einen Wachstumsvorteil verleiht usw. Dieses Modell der Abfolge von «richtigen» Prozessereignissen in der «richtigen» Reihenfolge während seiner Entwicklung ist als Mehrschrittmodell der Karzinogenese bekannt [2]. Es besagt, dass ein Tumor während seiner Entwicklung verschiedene Stadien bis zur manifesten Malignität durchläuft. Der Übergang von einem Stadium zum nächsten geht mit einem bestimmten neuen Prozessereignis einher. Während durch Methylierung der DNA im Promoterbereich zelluläre Prozesse im Allgemeinen inaktiviert werden, können Mutationen Prozesse aktivieren oder inaktivieren.

Die zellulären Prozesse, die die klonale Entwicklung von Tumoren vorantreiben, wurden vor allem anhand der Charakterisierung tumorassoziierter genetischer Läsionen charakterisiert. Gewichtige Argumente sprechen dafür, dass die normale Mutationsrate

1 Das Anhängen von Methylgruppen (-CH₃) an Cysteinreste wird als Methylierung bezeichnet.

2 siehe Glossar

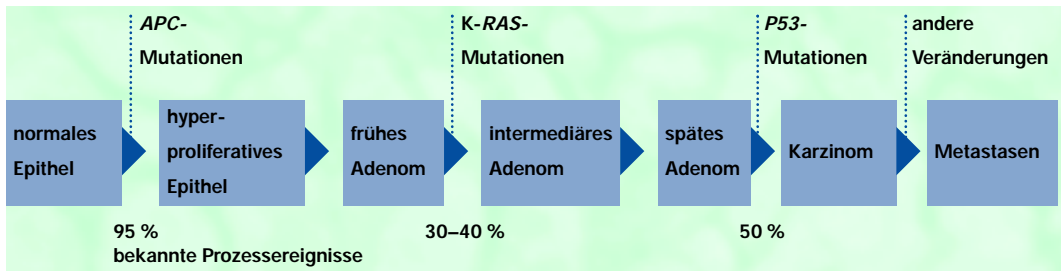


ABBILDUNG 1: Aufeinanderfolgende (sequenzielle) Mutationen von Tumorgenen und die Wahrscheinlichkeiten ihres Auftretens bei der Entwicklung kolorektaler Karzinome (nach [2] mit Modifikationen). Für den Übergang des normalen in ein hyperproliferatives Epithelgewebe scheinen Veränderungen des *APC*-Gens essenziell zu sein. In nahezu allen kolorektalen Karzinomen sind Veränderungen im *APC*-Gen nach-

weisbar. Nur 30 bis 40 % der Tumoren weisen im Stadium des Adenoms (gutartiges nicht metastasierendes Gewächs) Punktmutationen im *K-RAS*-Onkogen auf. Auch das Tumorsuppressorgen *P53* ist nur bei 50 % der auftretenden Tumoren mutiert, bei den restlichen 50 % spielen offenbar andere Prozessereignisse eine Rolle.

nicht ausreicht, um die sequenziellen Mutationen zu erklären, die eine Zelle während der malignen Transformation durchmacht. In der Tat sind Prozesse, die eine genomische Instabilität verursachen, für die Entwicklung von Tumorzellen von zentraler Bedeutung. Andere Prozesse beeinflussen die Zellzahl, indem sie Proliferation (Zellvermehrung), Differenzierung oder Apoptose (den programmierten Zelltod) steuern.

Für die Entwicklung eines bestimmten Tumortyps können einzelne Prozesse essenziell sein. Jedoch können sich Tumoren auch über alternative Wege entwickeln. So scheint für die Entstehung spontaner kolorektaler Karzinome die Inaktivierung des *APC*-Signalwegs eine notwendige Bedingung zu sein. Dagegen sind Mutationen des *K-RAS*-Gens nur bei einem Drittel der Tumoren und Mutationen des *P53*-Gens bei ungefähr der Hälfte dieser Tumoren vorhanden (siehe Abb. 1). Bei den restlichen Tumoren müssen andere Prozessereignisse für die Tumorentstehung eine Rolle spielen.

Zelluläre Prozesse können von verschiedenen genetischen Veränderungen betroffen sein

In verschiedenen Tumoren können einzelne Prozesse an verschiedenen Punkten und durch unterschiedliche genetische Läsionen verändert sein. Der Retinoblastom-(RB)-Prozess kann dafür als Beispiel dienen [3]. Das Retinoblastom-(RB)-Protein hat eine wichtige Funktion bei der Kontrolle des Zellzyklus³. Im Zentrum der Regulation des Zellzyklus steht

Prozessereignis	Veränderungen	Tumoren
p16 ^{INK4a}	Deletion, Punktmutation	Gliome, Karzinome, Sarkome, akute lymphatische
Zyklin D1	Promotermethylierung	Leukämie, familiäres malignes Melanom
CDK4	Translokation	Mantelzell-Lymphom, Nebenschilddrüsenadenom,
	Amplifikation	Karzinome im Kopf-Hals-Bereich, Karzinome der Speiseröhre, der Harnblase und der Brust
RB	Amplifikation	Gliome, Sarkome, familiäres malignes Melanom
	Deletion, Punktmutation	Sarkome, kleinzelliges Lungenkarzinom, Karzinome
	Inaktivierung durch E7-Protein von Papillomaviren	der Harnblase, Prostata und des Zervix, Retinoblastom

ABBILDUNG 2: Die Kontrolle des Zellzyklus durch den Retinoblastom-(RB)-Weg ist in humanen Karzinomen durch verschiedene genetische Veränderungen ge-

stört. Sie führen zur Inaktivierung oder zum Verlust des RB-Proteins.

eine Klasse kleiner Proteine, sog. Zykline. Zykline können nicht alleine arbeiten. Um ihre Wirksamkeit zu entfalten, brauchen sie Partner: Zyklin-abhängige Kinasen (CDK). Diese Kinasen beeinflussen wiederum andere Partner durch Phosphorylierung³. Weitere zelluläre Proteine, wie z. B. p16^{INK4a}, hemmen die Aktivität Zyklin-abhängiger Kinasen.

In der G1-Phase oder Ruhephase des Zellzyklus oder bindet das RB-Protein Transkriptionsfaktoren. Es kann auf diese Weise die Zellen daran hindern, die G1-Phase zu verlassen und in die nächste Phase einzutreten, in der die DNA verdoppelt wird. Der Zyklin D1-CDK4/6 -Komplex phosphoryliert am Ende der G1-Phase des Zellzyklus das RB-Protein, welches dadurch die Bindung zum Transkriptionsfaktor E2F lösen muss. Transkriptionsfaktoren regulieren die Aktivität von Genen. Im Fall von E2F handelt es sich um Gene, die die Zellzyklus-Passage steuern. Wie Abb. 2 zeigt, kann der RB-Weg in verschiedenen Tumoren an unterschiedlichen Stellen beeinflusst werden. Alle Läsionen bewirken letztlich eine Inaktivierung des RB-Proteins. Die Aktivität eines Proteins kann durch unterschiedliche genetische

3 Als Zellzyklus bezeichnet man den Phasenablauf einer teilungsaktiven Zelle von einer Teilung bis zur nächsten. Er umfasst die G1-Phase mit Synthese von RNA und Proteinen, die S-Phase mit Verdopplung der DNA, gefolgt von der G2-Phase, in der erneut Synthese von RNA und Protei-

nen und die Ausbildung des Spindelapparates stattfinden, sowie die Mitosephase (M-Phase), in der Kern- und Zellteilung erfolgen.

4 Das Anhängen einer anorganischen Phosphatgruppe -PO₄ bezeichnet man als Phosphorylierung.

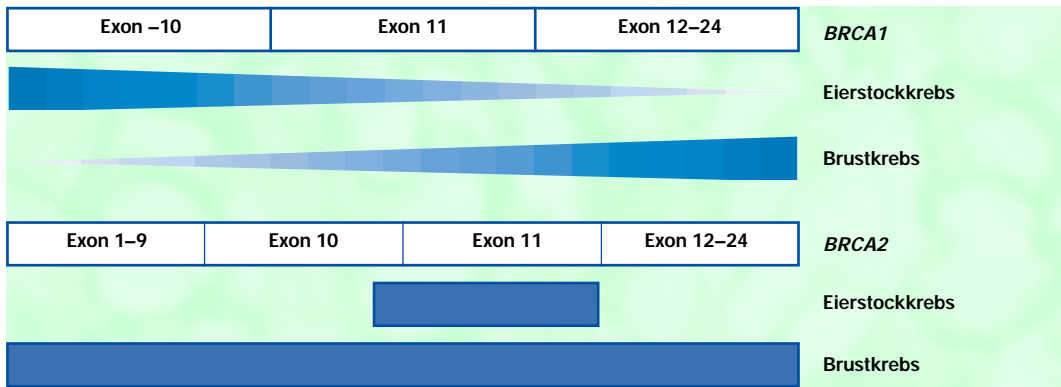


ABBILDUNG 3: Korrelation zwischen der Position von Mutationen im *BRCA1*- und im *BRCA2*-Gen, die zu einem Stopp bei der Protein-Biosynthese führen, und dem Auftreten eines Ovarial- bzw. Mammakarzinoms (nach [6] mit Modifikationen).

oder epigenetische Ereignisse beeinflusst werden. So kann z. B. das p16^{INK4a}-Protein durch folgende Veränderungen im dafür kodierenden Gen inaktiviert werden:

- Punktmutationen,
- Methylierungen im Bereich der Promoterregion sowie
- Verlust des Gens.

Der RB-Weg ist bei den meisten, wenn nicht bei allen bösartigen Tumoren (Karzinomen) des Menschen gestört.

Krebsbekämpfung auf molekularer Ebene

Gendiagnostik eines familiären Krebsrisikos

Menschen, die Mutationen in bestimmten Tumorgenen in Keimzellen (Ei- bzw. Spermazellen) aufweisen, haben ein erhöhtes Risiko, Krebserkrankungen zu entwickeln. Nach dem Mehrschrittmodell der Karzinogenese erwerben die Tumorzellen zusätzlich zu Keimbahnmutationen, die in allen Körperzellen vorhanden sind, weitere Läsionen. Der prädiktive Wert einer Mutation in einem Tumorgen hängt davon ab, wie wahrscheinlich weitere Prozessereignisse sind. Er ist von entscheidender Bedeutung, wenn therapeutische oder invasive diagnostische Maßnahmen in Erwägung gezogen werden. So entwickeln beispielsweise Angehörige von MEN-II-Familien, die eine Keimbahnmutation im *RET*-Gen tragen, mit hoher Wahrscheinlichkeit eine bestimmte Form eines bösartigen Tumors der Schilddrüse (medulläres Schilddrüsenkarzinom) [4]. Dieses Karzinom kann durch Entfernung der Schilddrüse im Kindesalter verhindert werden. Bei genetischen Defekten in

TABELLE 1: Diagnostische und therapeutische Maßnahmen, die die Diagnose einer genetischen Tumordisposition rechtfertigen.

Maßnahmen	Beispiele
präventive Diagnostik	Kolonoskopie bei HNPCC- und FAP-Patienten
Vermeidung invasiver diagnostischer Maßnahmen	Ausschluss des Krebsrisikos bei Mitgliedern von HNPCC und FAP-Familien
präventive therapeutische Maßnahmen	Entfernung der Schilddrüse bei Patienten aus MEN-II-Familien
Screening von Familienangehörigen auf Keimbahnmutationen in Fällen von negativer oder unklarer Familienanamnese	Patienten mit «spontanen» Tumoren typisch für vererbare Krebserkrankungen (z. B. medulläres Schilddrüsenkarzinom)
	FAP familiäre adenomatöse Polyposis Coli
	HNPCC hereditäres nicht-polypöses kolorektorales Karzinom

anderen Tumorgenen ist der prädiktive Wert dagegen erheblich niedriger. In einer neueren Studie wurde das Lebenszeitrisiko für Brustkrebs bei Ashkenasi-Juden untersucht, die Träger von Mutationen in den Brustkrebsgenen *BRCA1* und *BRCA2* waren, bei denen aber keine familiäre Häufung von Brustkrebs vorlag [5]. Die Manifestationswahrscheinlichkeit betrug im Alter von 70 Jahren sowohl für Mutationen im *BRCA1*- als auch im *BRCA2*-Gen weniger als 50 %. Die Häufigkeit des Vorkommens maligner Erkrankungen kann von der Art und Position der Mutationen in einem bestimmten Gen abhängen. So kommt es auch bei Trägern von Mutationen im *BRCA1*- und *BRCA2*-Gen darauf an, wo die Mutationen lokalisiert sind, die schließlich zu einem Translationsstopp und damit zu einem unvollständigen Protein führen (Abb. 3) [6]. Je nach Position der Mutationen in *BRCA1*- und *BRCA2*-Genen variiert die Wahrscheinlichkeit, ein Ovarial- oder Mammakarzinom zu entwickeln. Die Wahrscheinlichkeit der Tumorentwicklung kann auf weiteren genetischen Faktoren beruhen. Bei Trägern von *BRCA2*-Mutationen ist beispielsweise das Brustkrebsrisiko dann erhöht, wenn zusätzlich ein Polymorphismus im *RAD51*-Gen vorhanden ist [7]. Ähnlich wie die *BRCA*-Gene scheint auch das *RAD51*-Gen für die genomische Stabilität von Bedeutung zu sein. Für Träger des *BRCA1*-Gens bedeutet der Polymorphismus dagegen kein erhöhtes Risiko. In Tab. 1 sind diagnostische und therapeutische Maßnahmen aufgeführt, die eine genetische Diagnose der Tumordisposition rechtfertigen [3].

Frühd Diagnose durch Nachweis von Tumorgenen

Obwohl noch viele Probleme zu lösen sind, ist der Nachweis mutierter Tumorgene in Körpersekreten und -exkreten einer

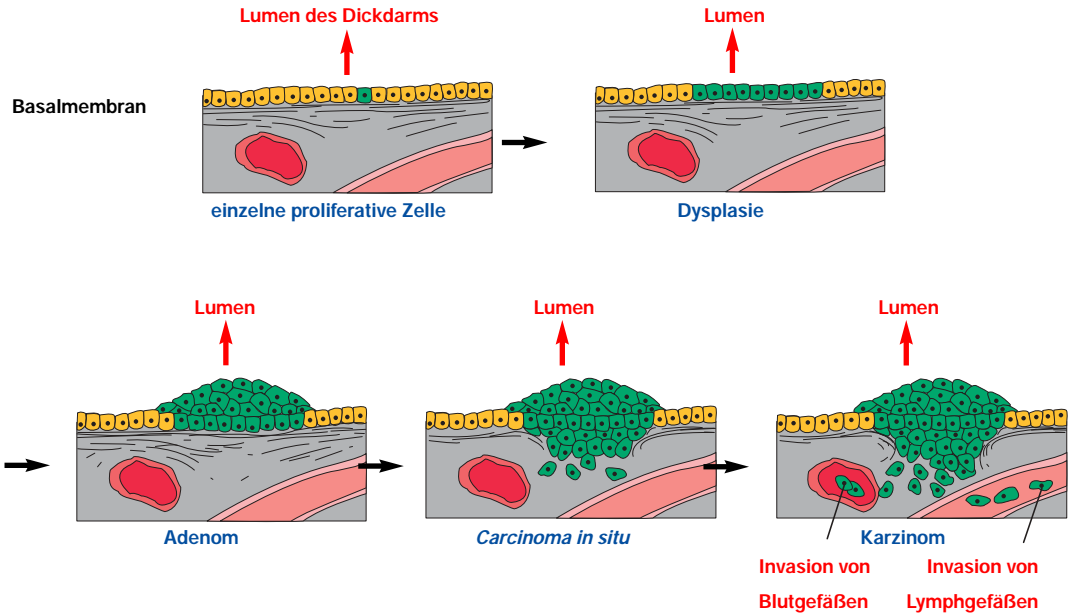


ABBILDUNG 4: Schematische Darstellung der Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms. Bereits in einem sehr frühen Stadium werden die Tumorzellen in das Darmlumen abgegeben. Erst in späteren Stadien bekommen die Tumorzellen Zugang zu Lymph- oder Blutgefäßen und können dann ihre Produkte ins Blut

abgeben. Der Nachweis von Tumorgenen in Stuhlproben könnte die Diagnose neoplastischer Darmveränderungen in Stadien ermöglichen, in denen eine vollständige und damit kurative Entfernung des Tumors möglich ist (nach [14] mit Modifikationen).

der viel versprechendsten Ansätze zur Senkung der Krebsmortalität. Als Beispiel kann das Zervixkarzinom (bösartiger Tumor vom Gebärmutterhals oder vom Gebärmuttermund ausgehend) dienen. Es ist das einzige solide Karzinom, für das in den letzten Jahrzehnten eine signifikante Abnahme der Mortalität nachgewiesen wurde. Diese Abnahme ist auf dessen Frühdiagnose durch den Nachweis zytologischer Veränderungen im Rahmen von Vorsorgeuntersuchungen zurückzuführen und beweist, dass eine sehr frühe Diagnose maligner Tumoren möglich ist, wenn die Tumorzellen in Frühstadien analysiert werden können. Tumorzellen können in Körpersekrete oder -exkrete wie Urin, Pankreassekret und Stuhl abgegeben werden. Weisen Tumorzellen bestimmte Mutationen oder Methylierungsmuster auf, sollte der empfindliche und spezifische Nachweis solcher Veränderungen eine Krebsfrühdiagnose ermöglichen. Beispielsweise werden beim kolorektalen Karzinom die Tumorzellen in sehr frühen Stadien ins Darmlumen abgegeben (Abb. 4). Erst in

späteren Stadien gewinnen die Tumorzellen Zugang zu Lymph- oder Blutgefäßen; erst dann gelangen die Produkte der Tumorzellen ins periphere Blut. In diesen relativ späten Stadien ist der Tumor bereits weiter fortgeschritten. Der Nachweis von Tumorgenen in Stuhlproben könnte hingegen die Diagnose neoplastischer Darmveränderungen in Stadien ermöglichen, in denen noch eine vollständige Entfernung des Tumors möglich ist.

Welche Genveränderungen eignen sich für die Krebsdiagnostik?

Bei der Überlegung, welche Tumorgene zur Diagnostik geeignet sind, muss ein grundlegendes Merkmal der Tumorbiologie berücksichtigt werden. Es wird immer deutlicher, dass die Abfolge der genetischen Ereignisse während der klonalen Entwicklung von Tumoren essenziell ist. So finden sich z. B. Mutationen des *K-RAS*-Gens relativ häufig in hyperproliferativen (wuchernenden) Dickdarmläsionen; diese entwickeln sich allerdings selten zu einem kolorektalen Karzinom [8]. Offensichtlich induzieren *K-RAS*-Mutationen ohne zusätzliche *APC*-Mutationen eher Apoptose anstatt Proliferation. Die Tatsache, dass Mutationen in einem Onkogen nicht notwendigerweise tumorspezifisch sind, wird durch unsere neueren Ergebnisse bei der Identifizierung von *K-RAS*-Mutationen in Pankreassekretproben von Patienten mit Pankreaskarzinom und chronischer Pankreatitis unterstützt [9]. In allen Proben von Patienten mit Pankreaskarzinom wurden *K-RAS*-Mutationen nachgewiesen. Eine Mutation wurde jedoch auch in einer Probe von einem Patienten mit chronischer Pankreatitis gefunden, bei dem in der Nachbeobachtung kein Pankreaskarzinom auftrat. Für eine Frühdiagnose des kolorektalen Karzinoms wäre daher wahrscheinlich *P53* das beste Zielgen, da Mutationen in diesem Gen in der kolorektalen Karzinogenese erst relativ spät, nämlich im Stadium des *Carcinoma in situ*, auftreten.

Molekulare Therapieansätze

In der Vergangenheit wurden viele molekulare Prozesse charakterisiert, die die klonale Entwicklung von Tumoren vorantreiben. Es wurden Wirkstoffe entwickelt, die diesen Prozessen entgegenwirken. In Tumoren können Prozesse entweder inaktiviert oder aktiviert werden. Theoretisch ist die Aktivierung eines inaktivierten Weges schwieriger als die Hemmung eines aktivierten Weges.

Aktivierung inaktivierter Prozesse

P53 ist dasjenige Tumorgen, welches in Tumoren des Menschen am häufigsten inaktiviert ist. Es sind verschiedene Strategien denkbar, mit deren Hilfe die Inaktivierung von *P53* rückgängig gemacht werden kann [10]. Jedoch sind Ansätze zur Reaktivierung von *P53* und anderer in Tumoren inaktivierter Prozesse noch weit vom Stadium der klinischen Prüfung entfernt. Dagegen gibt es erste klinische Erfahrungen mit Wirkstoffen, die aktivierte Prozesse hemmen.

Inaktivierung aktivierter Prozesse

Obwohl dieser Ansatz konzeptionell einfacher ist, haben sich bisher nur relativ wenige Substanzen in klinischen Prüfungen als wirksam erwiesen. Die erste Substanz, die verwendet wurde, bevor der molekulare Defekt überhaupt identifiziert worden war, ist die all-*trans*-Retinsäure, die zur Behandlung der Promyelozyten-Leukämie (PML) eingesetzt wurde. Die Substanz wirkt auf ein tumorassoziiertes Fusionsprotein, das aus Anteilen des Retinsäurerezeptor- α und des sog. PML-Proteins besteht. Eine zweite Substanz ist Trastuzumab (Herceptin®), ein monoklonaler Antikörper, der die Wirkungen des vom Onkogen *ERBB2* (auch bekannt als *HER-2*) kodierten Proteins bei einem Teil der Patientinnen mit Brustkrebs hemmt. Keines dieser beiden Medikamente bewirkt allerdings eine länger anhaltende Remission (Rückgang von Krankheitserscheinungen ohne vollständige Normalisierung aller Parameter).

Hemmung der ABL-Kinase bei Leukämien

STI571 ist eine neu entwickelte Wirksubstanz, die zur Behandlung von Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie (CML) und akuter lymphatischer Leukämie (ALL) eingesetzt wird. Bei über 95 % der Patienten mit CML und bei einem Teil der Patienten mit ALL führen reziproke Translokationen zwischen den Chromosomen 9 und 22 zu Hybridgenen, die Fusionsproteine kodieren, welche die ABL⁵-Kinase und ein unvollständiges BCR⁶-Protein enthalten. STI571 hemmt die Kinaseaktivität der BCR-ABL-Fusionsproteine. Da die Substanz auch an die normale ABL-Kinase bindet, ist sie nicht für die onkogene Version des Enzyms spezifisch.

5 ABL steht für zelluläres Homolog zum Onkogen des **Abelson**-Leukämie-Virus.

6 BCR steht für *breakpoint cluster region*.

Die genetische Instabilität von Tumorzellklonen führt zu Resistenzproblemen

In einer ersten Studie kam es unter STI571-Therapie bei 53 von 54 Patienten, die an der frühen chronischen Phase der Krankheit litten, zu einer lang anhaltenden Remission mit nur wenigen Nebenwirkungen [11]. Ein Teil der Patienten mit einer Blastenkrise (sehr starke Vermehrung unreifer Vorstufen bestimmter weißer Blutzellen [Granulozyten]) sprach anfänglich ebenfalls auf die Substanz an. Jedoch kam es bei den Patienten mit Blastenkrise im weiteren Verlauf bei allen ALL-Patienten und einem großen Teil der CML-Patienten zu einem Rezidiv [12].

Auf molekularer Ebene wurde die Resistenz gegen STI571 durch zwei verschiedene Ereignisse verursacht [13]. In einem Teil der Leukämiezellen wurde das *ABL*-Gen vermehrt. Der zweite Mechanismus ist exemplarisch für die genetische Plastizität von Tumorzellen, die einer dauerhaften Wirkung von Medikamenten entgegensteht. So wurde nach einer gewissen Behandlungsdauer festgestellt, dass in der STI571-Bindungstasche die Aminosäure Threonin an Position 315 durch Isoleucin ersetzt wurde. Dieser Aminosäure-Austausch verhindert die Bindung des Medikaments, die Kinaseaktivität bleibt jedoch erhalten. Es ist bemerkenswert, dass bei allen sechs Patienten, die eine Punktmutation hatten, der Aminosäureaustausch derselbe war. Man vermutet, dass nur wenige Substitutionen von Amino-

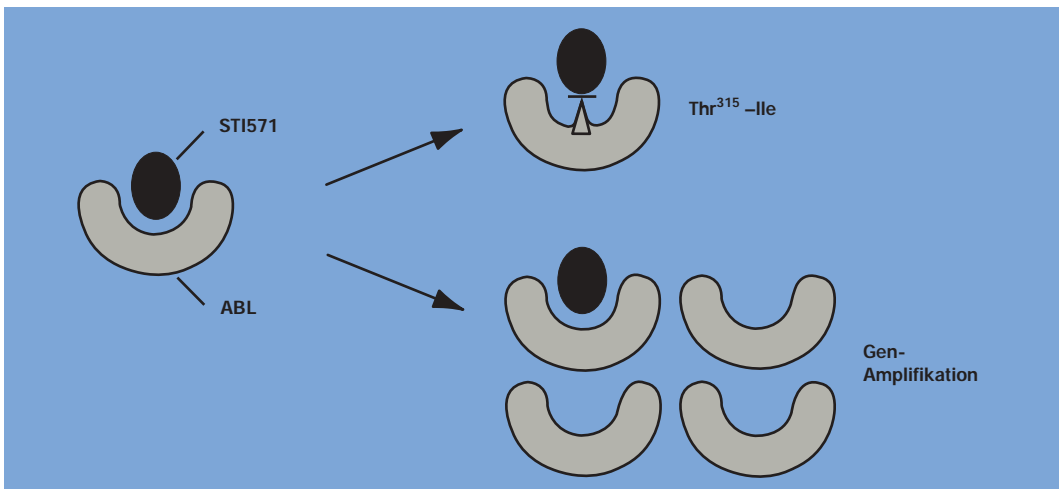


ABBILDUNG 5: Spielt ein Protein eine wesentliche Rolle in einem neoplastischen Prozess, können Punktmutationen oder Vervielfältigungen des dafür

kodierenden Gens zur Resistenzentwicklung gegenüber Arzneimitteln führen, die mit diesem Protein in Wechselwirkung treten.

säuren, oder möglicherweise nur diese eine, die Bindung von STI571 hemmen (siehe Abb. 5).

Im Fall der CML ist das BCR-ABL-Fusionsprotein offenbar für die maligne Transformation durch Aktivierung des entsprechenden Signalwegs essenziell. Diese Annahme wird durch die Tatsache gestützt, dass bei allen gegen STI571 resistenten Patienten das Gen, welches das Fusionsprotein kodiert, entweder mutiert oder vervielfacht ist. Jedoch kann – wie oben beschrieben – bei anderen Tumortypen ein Prozess an den verschiedenen Punkten gestört sein oder ein Prozess durch einen anderen ersetzt werden. DNA-Arrays machen es möglich, durch die Analyse von mRNA-Expressions-Profilen die verschiedenen Prozesse in Tumoren voneinander abzugrenzen. Bei Karzinomen sind mRNA-Expressions-Profile außerordentlich heterogen. Bei Brustkrebs waren z. B. die Genexpressionsmuster zwischen Tumoren verschiedener Personen durch eine sehr grosse Variabilität gekennzeichnet. Diese Variabilität ist mehrdimensional; d. h., viele verschiedene Gengruppen zeigen überwiegend voneinander unabhängige Variationsmuster. Hieraus folgt, dass in verschiedenen Tumoren unterschiedliche Prozesse aktiviert bzw. inaktiviert sind. Die Tatsache, dass die Expressionsprofile in primären Tumoren und ihren Metastasen ähnlicher sind als in Tumoren von verschiedenen Patienten, deutet darauf hin, dass einzelne Prozesse während der Progression von Karzinomen in einem bestimmten Patienten erhalten bleiben.

Ausblick: Bekämpfe nicht (nur) Tumorzellen, sondern Strukturen, die sie versorgen

Genomische Heterogenität und Instabilität sind wesentliche Hindernisse für eine molekulare Tumorthherapie. Prinzipiell sind die Probleme mit denjenigen vergleichbar, die bei der Therapie einer HIV-Infektion auftreten. Sowohl HIV als auch

Tumorzellen sind durch eine hohe Mutationsrate gekennzeichnet. Nur ist die Zahl der Gene und damit die Zahl möglicher Varianten in Tumorzellen ungleich höher als bei HIV.

Um den Problemen der genomischen Heterogenität und Plastizität von Tumorzellen auszuweichen, könnte es Erfolg versprechender sein, diejenigen Strukturen therapeutisch zu attackieren, die einen soliden Tumor versorgen. Die bedeutendsten Versorgungsstrukturen solider Tumoren sind Blutgefäße, die die Zufuhr von Sauerstoff und Nährstoffen gewährleisten. Solide Tumoren können nur dann einen Durchmesser von über 1 mm erreichen, wenn sie mit Blutgefäßen ver-

sorgt werden. Die an der Bildung der Blutgefäße beteiligten Endothelzellen sind genetisch stabil und daher gut als Angriffspunkte für eine molekulare Therapie geeignet. In einer Reihe von Tiermodellen wurde gezeigt, dass das Tumorstadium gehemmt werden kann, wenn die Ausbildung von Blutgefäßen (Angiogenese) in einem Tumor verhindert wird. Da Endothelzellen beim Erwachsenen mit wenigen Ausnahmen (z. B. Schwangerschaft oder Reifung des Gelbkörpers) eine niedrige Teilungsrate aufweisen, sollte eine anti-angiogene Therapie keine schweren Nebenwirkungen haben. Neuere Ergebnisse klinischer Studien geben zu der Hoffnung Anlass, dass das Tumorstadium nicht nur in experimentellen Modellen, sondern auch bei Tumorkranken durch eine anti-angiogene Therapie gehemmt werden kann.

Literatur:

1. Ponder, B. A. Cancer genetics. *Nature*, 411: 336-341, 2001
2. Fearon, E. R. and Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61: 759-767, 1990.
3. Wagener, C. Molekulare Onkologie. Entstehung und Progression maligner Tumoren. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 1999
4. Komminoth, P. The *RET* proto-oncogene in medullary and papillary thyroid carcinoma. Molecular features, pathophysiology and clinical implications. *Virchows Arch*, 431: 1-9, 1997
5. Satagopan, J. M., Offit, K., Foulkes, W., Robson, M. E., Wacholder, S., Eng, C. M., Karp, S. E., and Begg, C. B. The lifetime risks of breast cancer in Ashkenazi Jewish carriers of *BRCA1* and *BRCA2* mutations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 10: 467-473, 2001
6. Gayther, S. A., Warren, W., Mazoyer, S., Russell, P. A., Harrington, P. A., Chiano, M., Seal, S., Hamoudi, R., van Rensburg, E. J., Dunning, A. M., et al. Germ-line mutations of the *BRCA1* gene in breast and ovarian cancer families provide evidence for a genotype-phenotype correlation. *Nat Genet*, 11: 428-433, 1995
7. Levy-Lahad, E., Lahad, A., Eisenberg, S., Dagan, E., Papperna, T., Kasinetz, L., Catane, R., Kaufman, B., Beller, U., Renbaum, P., and Gershoni-Baruch, R. A single nucleotide polymorphism in the *RAD51* gene modifies cancer risk in *BRCA2* but not *BRCA1* carriers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 3232-3236, 2001
8. Jen, J., Powell, S. M., Papadopoulos, N., Smith, K. J., Hamilton, S. R., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions. *Cancer Res*, 54: 5523-5526, 1994
9. Nollau, P., Fischer, C., Tschentscher, P., and Wagener, C. Enrichment of mutant alleles by chromatographic removal of wild type alleles: a new principle for the detection of alleles with unknown point mutations at excess of wild type alleles. *Clin Chem Lab Med*, 37: 877-881, 1999
10. Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. Achilles' heel of cancer? *Nature*, 412: 865-866, 2001
11. Druker, B. J., Talpaz, M., Resta, D. J., Peng, B., Buchdunger, E., Ford, J. M., Lydon, N. B., Kantarjian, H., Capdeville, R., Ohno-Jones, S., and Sawyers, C. L. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 344: 1031-1037, 2001
12. Druker, B. J., Sawyers, C. L., Kantarjian, H., Resta, D. J., Reese, S. F., Ford, J. M., Capdeville, R., and Talpaz, M. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med*, 344: 1038-1042, 2001
13. Gorre, M. E., Mohammed, M., Ellwood, K., Hsu, N., Paquette, R., Rao, P. N., and Sawyers, C. L. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science*, 293: 876-880, 2001
14. Copper, G.M.: The Cell: a Molecular Approach. ASM-Press Washington DC p. 603, 1997

Prof. Dr. Dr. Klaus Strein

Wie uns molekularbiologische Erkenntnisse zu neuen Krebsmedikamenten verhelfen



Die molekularen Mechanismen der Tumorentstehung und -ausbreitung werden durch den gezielten Einsatz moderner molekularbiologischer Methoden zunehmend besser verstanden. Dadurch erhöhen sich die Chancen, mit Arzneimitteln die Prozesse, die bei Krebs außer Kontrolle geraten sind, therapeutisch zu beeinflussen.

Wie Krebs entsteht

In unseren Körperzellen treten ständig Genmutationen auf. Diese werden aber in der Regel von der Zelle selbst repariert, die veränderten Zellen werden vom Körper entfernt oder bleiben einfach stumm. Durch das unglückliche Zusammentreffen verschiedener Kombinationen solcher Veränderungen besteht die seltene Möglichkeit, dass aus einer Normalzelle ein Klon von veränderten Zellen entsteht, dessen Einzelzellen

- Wachstumsvorteile haben (Proliferation),
- dem programmierten Zelltod (Apoptose) entgehen,
- sich der Immunabwehr entziehen,
- zu einem malignen Tumor auswachsen,
- in benachbartes fremdes Gewebe hineinwachsen (Invasion),
- sich in fremdem Gewebe ansiedeln und dort Tochtergeschwülste bilden (Metastasierung).

Welche medikamentösen Therapieansätze gibt es?

Aufgrund dieser Vorstellung über die Entstehung und Ausbreitung von Krebs ergeben sich vor allem folgende prinzipielle Ansatzpunkte für

eine medikamentöse Therapie:

- die Hemmung oder Zerstörung des Wachstums von Tumorzellen durch zelltoxische Substanzen (z. B. Störung der DNA-Synthese, DNA-Struktur oder der Proteine der Zellteilung, *zytostatische Therapien*);
- die Wachstumshemmung hormonabhängiger Tumoren durch Blockade der Hormonwirkung, z. B. Blockade der Wirkung der männlichen bzw. weiblichen Geschlechtshormone bei hormonabhängig wachsenden Prostatakarzinomen bzw. Brustkrebs (*Hormontherapien*);
- die gezielte Beeinflussung der bei Krebs außer Kontrolle geratenen molekularen Mechanismen des Zellwachstums bzw. des programmierten Zelltods, der Apoptose (*Target¹-spezifische Therapien*);
- die Beeinträchtigung bzw. Behinderung der Ausbildung von Blutgefäßen, die den Tumor versorgen (*Antiangiogene-Therapien*);

¹ Als Target (Zielort, Angriffspunkt) bezeichnet man einen biochemischen Reaktionsweg, ein Enzym, einen Transkriptionsfaktor oder ein anderes biologisch wirksames Molekül oder einen biologisch

bedeutsamen Prozess, an welchem ein Medikament ansetzen / den ein Medikament beeinflussen kann, um in ein Krankheitsgeschehen einzugreifen.

- eine Hemmung des invasiven Wachstums und der Metastasierung (*antimetastatische Therapien*) sowie
- die Stärkung bzw. Wiederherstellung der Immunabwehr (*immunstimulierende Therapien*).

Den Zellstoffwechsel nutzen

Jüngstes Beispiel einer erfolgreichen Weiterentwicklung eines bereits etablierten Krebsmittels ist **Xeloda®** zur Behandlung von Patienten mit metastasierendem Brust- bzw. Dickdarmkrebs. Dieses Zytostatikum ist eine Weiterentwicklung des 1956 von Robert Duschinsky (Roche Nutley) und Charles Heidelberger (Universität Wisconsin) erstmals synthetisierten und 1962 als Antikrebsmittel eingeführten 5-Fluorouracils (5-FU). 5-FU wird in den Zellen anstelle des Uracils in die RNA eingebaut. Dadurch ist eine Weitergabe der Erbinformation und somit eine Zellteilung nicht mehr möglich. 5-FU schädigt damit aber alle sich teilenden Zellen. Im Gegensatz zu 5-FU ist der Wirkstoff von Xeloda® inaktiv und wird erst durch bestimmte Enzyme aktiviert (siehe Abb. 1). Da diese Enzyme in Tumorzellen in weit größerem Ausmaß vorhanden sind als in normalen Zellen, schädigt dieses neuentwickelte Zytostatikum die Tumorzellen mehr als normale Zellen (Targeting von Tumorzellen). In ausgedehnten klinischen Untersuchungen wurde belegt, dass auf diesem Weg eine nebenwirkungsärmere Therapie als mit 5-FU erreicht wird. Für die Bestimmung der Enzyme im Tumorgewebe, die Xeloda® aktivieren und deaktivieren, sind Methoden entwickelt worden, die es erlauben werden, Responder, d. h. Patienten mit der

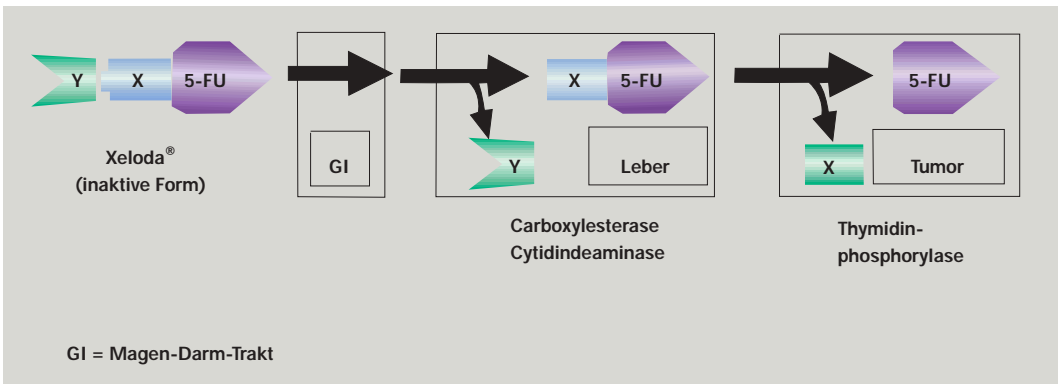


ABBILDUNG 1: Oral verabreichtes Xeloda® wird durch eine erste enzymatische Spaltung in der Leber und weitere Spaltung in der Tumorzelle zu zelltoxischem 5-FU aktiviert.

geeigneten Enzymausstattung, um Xeloda® im Tumor zu aktivieren, von Nonrespondern zu unterscheiden (siehe auch Seite 64).

Wachstumsfaktoren abschalten

Die molekularen Mechanismen der Tumorentstehung und -ausbreitung werden durch den gezielten Einsatz moderner molekularbiologischer Methoden zunehmend besser verstanden. Dadurch erhöhen sich die Chancen, mit Arzneimitteln die bereits genannten Prozesse wie Zellwachstum, Apoptose, Angiogenese und / oder Metastasierung zu beeinflussen. Dies soll am Beispiel der Hemmung der Aktivität rezeptorgekoppelter Tyrosinkinasen näher erläutert werden.

Tyrosinkinasen wird ein zentraler Stellenwert bei der Regulation von Wachstumsprozessen und dem Prozess der Tumorentstehung zugeschrieben. Es handelt sich um Enzyme, die wie ein Schalter wirken: Durch Anhängen einer Phosphatgruppe (Phosphorylierung) an den Tyrosinrest bestimmter Proteine lassen sich diese Proteine an- oder abschalten, sprich ihre Funktion aktivieren oder deaktivieren. Tyrosinkinasen spielen daher eine bedeutende Rolle in Prozessen der Signalübertragung und -umwandlung.

Transmembrane Rezeptoren (durch die Zellmembran reichende Rezeptoren, mit einem extra- und einem intrazellulären Anteil), wie

- der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor EGF-R (*epidermal growth factor receptor*),
- der sich auf der Oberfläche von humanen Brustkrebszellen in verstärktem Ausmaß befindende HER-2-Rezeptor,
- der VEGF-Rezeptor (*vascular endothelium growth factor Receptor*),
- der FGF-Rezeptor (*fibroblast growth factor receptor*),
- der PDGF-Rezeptor (*platelet-derived growth factor receptor*),
- der IGF-I-Rezeptor (*insulin like growth factor type Receptor*)
oder
- der c-met-Rezeptor (*hepatocyte growth factor receptor*)

aktivieren, nach dem sich an ihren extrazellulären Teil ein bestimmter Ligand (wie z. B. VEGF, EGF oder IGF) geheftet hat, die intrazellulär gelegene Tyrosinkinase. Diese phosphoryliert, wie schon erwähnt, spezifische Moleküle in den Zielzellen. Über eine Signalkette, deren Faktoren zu einem guten Teil bekannt sind, kann dann letztlich Tumorentstehung und -progression

gefördert werden. Daher ist die Enzymklasse der Tyrosinkinase ein beliebtes Target für die Arzneimittelforschung und -entwicklung. Das Ziel besteht darin, durch Hemmung dieser Enzyme übermäßiges Zellwachstum zu hemmen. Bei einer durch einen Rezeptor gesteuerten Tyrosinkinase gibt es vor allem folgende Ansatzpunkte einer Hemmung:

- die Neutralisation des Liganden, z. B. von VEGF, durch einen Antikörper oder ein anderes den Liganden bindendes und neutralisierendes Protein,
- die Blockade der Ligandenbindungsstelle am Rezeptor durch einen konkurrierenden Antikörper sowie
- die Hemmung der intrazellulären Tyrosinkinase mit einem niedermolekularen Hemmstoff.

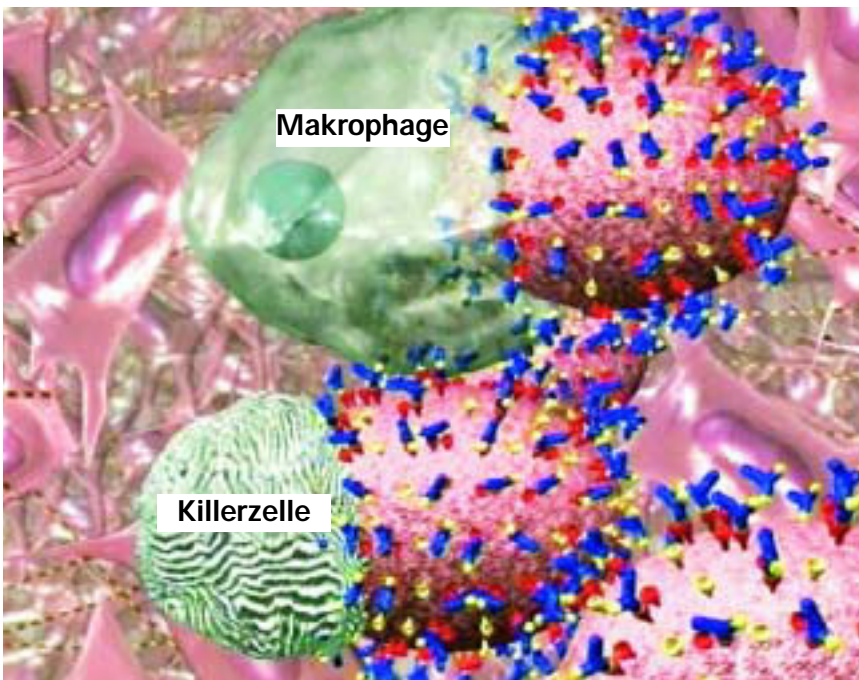


ABBILDUNG 2: Wirkmechanismus des monoklonalen Antikörpers Trastuzumab (Herceptin®) auf HER-2 überexprimierende Tumorzellen. Nach Bindung des Antikörpers an die Rezeptoren werden diese blockiert. Der bis jetzt noch unbekannte Ligand, der nach Bindung an diesen Rezeptor die intrazelluläre Tyrosin-

kinase und damit die Zellteilung aktivieren würde, kann die Signalkette somit nicht in Gang setzen. Gleichzeitig werden immunologische Abwehrmechanismen in Gang gesetzt, die, wie hier gezeigt, eine Aktivierung von natürlichen Killerzellen und Makrophagen bewirken.

Monoklonale Antikörper

Beispiel Herceptin®

Zur Blockade des Tyrosinkinase-gekoppelten Rezeptors HER-2 wurde erfolgreich der Antikörper Trastuzumab (Herceptin®) entwickelt. Herceptin® ist als Monotherapie und auch in der Kombination mit verschiedenen Chemotherapeutika wirksam. Sowohl die Zeit des Fortschreitens der Erkrankung als auch die Überlebenszeit können durch eine Behandlung deutlich verlängert werden, allerdings nur bei den Patientinnen, deren Tumorzellen auf der Oberfläche den Wachstumsfaktorrezeptor HER-2 in verstärktem Maß tragen, die also HER-2 überexprimieren (Abb. 2). Dies ist bei rund 25 % der Patientinnen mit Brustkrebs der Fall. Geeignete Verfahren zur Diagnose der Überexpression in Gewebeschnitten sind heute in vielen Laboratorien verfügbar. Durch das Andocken von Herceptin® an den HER-2-Rezeptor werden neben der Hemmung der Tyrosinkinaseaktivität wahrscheinlich auch immunologische Abwehrmechanismen (Aktivierung von Makrophagen und natürlichen Killerzellen) in Gang gesetzt.

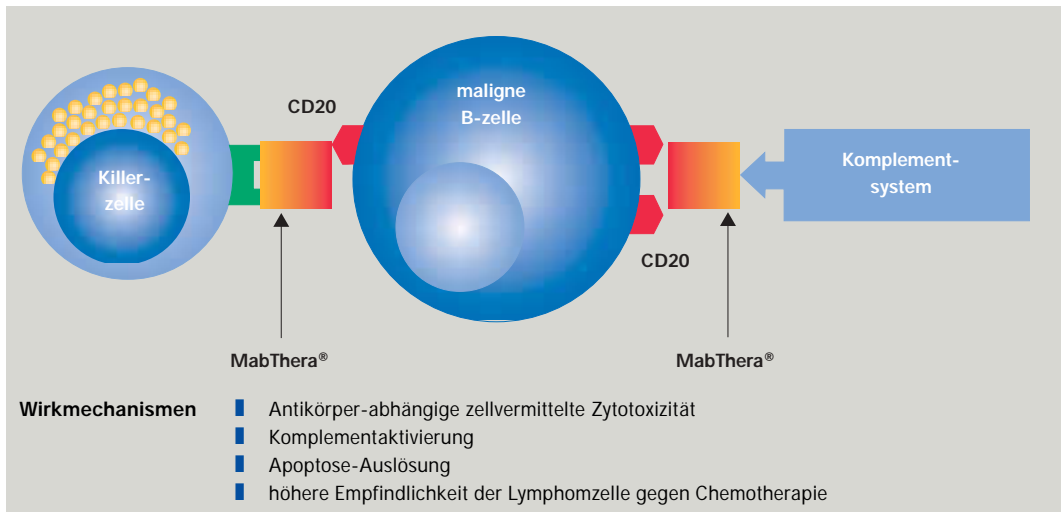


ABBILDUNG 3: Wirkmechanismus von MabThera® (Rituximab): Es handelt sich um einen monoklonalen Antikörper, der sich an das CD20-Antigen bindet. Dieses Antigen befindet sich auf unreifen ruhenden und aktivierten B-Lymphozyten sowie auf den meisten B-Zell-Lymphomen, nicht aber auf lymphoiden Stamm-

zellen oder Plasmazellen. Durch die Bindung des Antikörpers an das CD20-Antigen werden körpereigene Abwehrmechanismen, wie die Antikörper-vermittelte Zytotoxizität, eine Aktivierung des Komplementsystems oder das Auslösen von Apoptose, in Gang gesetzt.

TABELLE 1: Übersicht über einige monoklonale Antikörper in fortgeschrittenen Entwicklungsphasen.

Arzneistoff	Firma	bestuntersuchte Indikation	Target	Entwicklungsphase
Rituximab MabThera®	Roche / Genentech IDEC	Non-Hodgkin- Lymphom	CD20	Vermarktung
Trastuzumab Herceptin®	Roche / Genentech	metastasierender Brustkrebs	HER-2	Vermarktung
Alemtuzumab Campath®	ILEX Millennium Pharmaceuticals Inc.	chronische lymphatische Leukämie	CD52	Registrierung
Cetuximab C225	ImClone Systems Inc.	Dickdarmkrebs (kolorektales Karzinom)	EGF-R	Phase III
rhu-Mab-VEGF	Roche / Genentech	kolorektales Karzinom nichtkleinzelliges Lungenkarzinom	VEGF	Phase II/III

Andere monoklonale Antikörper

Neben Herceptin® sind eine Reihe weiterer monoklonaler Antikörper (Mabs) zur Krebsbekämpfung eingeführt bzw. in klinischer Entwicklung. Einige davon richten sich gegen Tyrosinkinase-gekoppelte Rezeptoren, andere haben andere Angriffspunkte. In Tab. 1 sind beispielhaft einige Antikörper aufgeführt, über die es u. a. publizierte klinische Daten gibt. Während die Wirkung von Herceptin® nach heutiger Vorstellung mehr auf einer Hemmung der HER-2 vermittelten Signalkette beruht, spielen für die klinische Wirkung von MabThera® bei Non-Hodgkin-Lymphomen immunologische Mechanismen eine entscheidende Rolle (siehe Abb. 3).

Sobald ein neuer, potenziell Erfolg versprechender extrazellulärer Angriffspunkt identifiziert wurde, haben wir heute verschiedene Technologien, um dagegen relativ rasch humane oder humanisierte monoklonale Antikörper herzustellen. So kann man z. B. transgene Mäuse, bei denen die für Antikörperbildung zuständigen Gene weitgehend durch die entsprechenden humanen Gene ersetzt wurden, durch Impfung mit einem Target wie z. B. HER-2 oder EGF-R zur Bildung von humanen Antikörpern veranlassen. Solche Antikörper zeichnen sich durch gute Verträglichkeit beim Menschen aus. Roche hat kürzlich mit der Firma Genmab eine Kooperation über die Entwicklung von humanen monoklonalen Antikörpern abgeschlossen. Es gibt aber noch weitere geeignete Methoden zur Herstellung von Antikörpern.

TABELLE 2: Übersicht über einige niedermolekulare Tyrosinkinase-Inhibitoren in fortgeschrittenen Phasen der klinischen Entwicklung.

Verbindung	Firma	inhibierte Kinasen	Phase
Glivec® STI 571	Novartis	BCR-ABL, PDGF-R, c-Kit	■ zugelassen für CML ■ in Phase II/III für solide Tumoren z. B. Lungenkrebs
Iressa™ ZD 1839	AstraZeneca	EGF-R	III
Tarceva™ OSI 774	Roche/Genentech OSI Pharmaceuticals	EGF-R	III
SU-6668	Pharmacia/Sugen	Flk-1/KDR, PDGF-R FGF-R	III

Kleine Moleküle mit großen (Aus-)Wirkungen

Antikörper wie Herceptin® blockieren den Liganden oder den extrazellulären Teil des Rezeptors. Eine Folge ist die Hemmung der Aktivität der intrazellulär gelegenen Tyrosinkinase und damit, der sich anschließenden Signalkette. Nachdem klar war, dass Tyrosinkinase-Targets eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung spielen, wurden große Anstrengungen unternommen, Tyrosinkinasen auch intrazellulär spezifisch mit niedermolekularen Substanzen zu hemmen. Mit Glivec® von Novartis wurde eine Substanz zugelassen, die eine nicht rezeptorgekoppelte Tyrosinkinase hemmt. Weitere spezifische Hemmstoffe (siehe Tab. 2) sind in fortgeschrittenen Phasen der klinischen Entwicklung. Erfolg versprechende Phase-II-Daten wurden zum Beispiel für Iressa™ und Tarceva™ bekannt. Der eigentliche Stellenwert dieser Substanzen kann aber erst nach Vorliegen der Ergebnisse der Phase III der klinischen Prüfung eingeschätzt werden.

Den Tumoren die Versorgung entziehen

Der VEGF (*vascular endothelium growth factor*) spielt eine wichtige Rolle beim Aufbau der Blutversorgung (Angiogenese) eines wachsenden Tumors. Tumoren produzieren erhebliche Mengen an VEGF. Daher ist dieser zelluläre Faktor ein weiterer interessan-

ter Ansatzpunkt für die Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers, der diesen Prozess hemmen könnte. Eine Hemmung der Angiogenese sollte zu einer Hemmung des Tumorwachstums führen. Insbesondere in Kombination mit zytotoxischen Substanzen sollte somit eine Tumorzerstörung erreicht werden können. Genentech und Roche entwickeln derzeit gemeinsam einen monoklonalen Antikörper: rhu-Mab-VEGF. Kürzlich wurde auf einem internationalen Kongress über positive Phase-II-Daten mit diesem Antikörper in Monotherapie wie auch in Kombination mit Zytostatika bei Dickdarm- und Lungenkrebs berichtet.

Gestörtes Gleichgewicht

Die medizinischen Gelehrten des Altertums, die Krankheiten auf ein gestörtes Gleichgewicht zwischen verschiedenen Kräften oder Körpersäften zurückführten, ahnten mit ihren intuitiven Vorstellungen, was wir von Krebserkrankungen heute wissen. Tumorleiden sind durch ein gestörtes Gleichgewicht gekennzeichnet: das Gleichgewicht zwischen den gegenläufigen Prozessen Zellvermehrung (Proliferation) und Zelltod (Apoptose). Im Tumorgewebe dominiert die Proliferation. Sowohl Rezeptoren an der Zelloberfläche und deren Liganden als auch ein Netzwerk von intrazellulären Signal- und Regelfaktoren beeinflussen Apoptose und Proliferation. Es sind bereits eine ganze Reihe von Mutationen bekannt, die Faktoren in diesem Netzwerk betreffen und damit zur Tumorentstehung und Progression beitragen.

TABELLE 3: Identifizierte mögliche Angriffspunkte für die Entwicklung von Krebsmedikamenten.

Target-Klasse	Beispiele
Rezeptor-Tyrosinkinasen	HER-2, EGF-R, c-met, IGF-IR
intrazelluläre Tyrosinkinasen	src; lyn; yes; FAK
Serin-Threonin-Kinasen	cdk2, 4, 6; MAPK; Aurora Kinase
Enzyme involviert in epigenetischen DNA-Modifizierungen	HDAC, DMT
andere Enzyme	Telomerase, MMPs, Farnesyl-Transferase ...
Transkriptionsfaktoren	PPAR γ , fos, c-myc, jun
Targets, die antiapoptotische Signale vermitteln	Survivin, bcl-2
Protein-Protein-Wechselwirkungen	P53/MDM-2, STAT3

Suche nach Schlüsselstrukturen

Solche Faktoren sind ebenso wie die Tyrosinkinasen wichtige Angriffsorte (Targets) für die Suche nach neuen Arzneimitteln. Hinzu kommen Targets aus den biologischen Prozessen der Angiogenese und der Metastasierung. Einige davon sind beispielhaft in Tab. 3 genannt. Dabei wurden nur die Targets aufgezählt, zu denen bereits Daten veröffentlicht wurden. Daneben werden weitere Targets bearbeitet, die noch nicht der breiten Öffentlichkeit zugänglich gemacht wurden.

Neue Targets werden vor allem in Forschungsarbeiten von öffentlich geförderten Institutionen (z. B. Universitäten, National Cancer Research Centers) und von Biotech- und Pharmafirmen identifiziert und auf ihre mögliche Relevanz untersucht. Für diese Arbeiten sind die modernen Methoden der gentechnischen und biotechnologischen Forschung unentbehrlich.

An die Phase der Identifizierung und Validierung des Targets schließt sich die Suche nach geeigneten Substanzen an, die in gewünschter Weise diese Zielstruktur beeinflussen. Dabei geht es meistens um eine Hemmung.

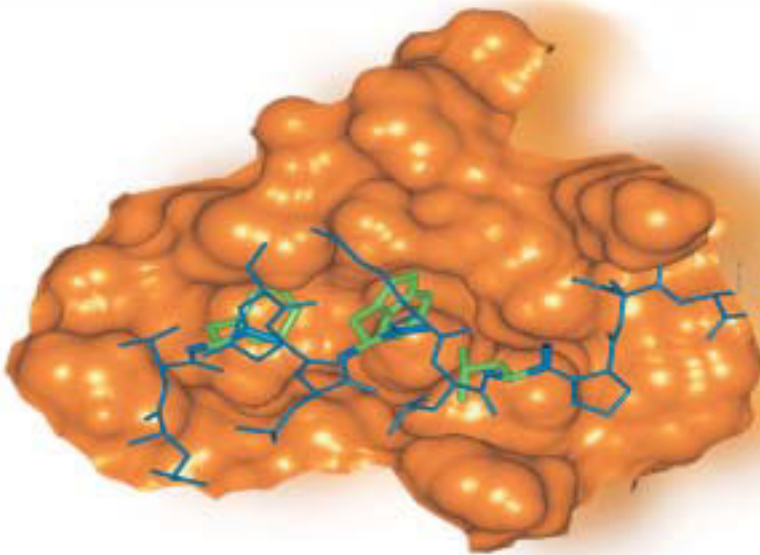


ABBILDUNG 4: Computeranimation der räumlichen Anordnung des Tumorsuppressor-Proteins P53 und des natürlichen Hemmstoffes MDM-2. MDM-2 blockiert die tumorunterdrückende Wirkung von P53. Ein

geeignetes Molekül, das die gezeigte Verknüpfung von P53 und MDM-2 lösen könnte, hätte vermutlich Antitumorwirkung.

Diesen Abschnitt der Arzneimittelforschung unterteilt man gewöhnlich in

- Leitstruktur-Identifizierung und
- Leitstruktur-Optimierung.

In der Phase der Leitstruktur-Identifizierung werden in der Regel zunächst Hunderttausende bis Millionen von Substanzen getestet, um geeignete Molekülstrukturen (z. B. Hemmstoffe) herauszufinden. Diese Strukturen müssen dann in der überwiegenden Zahl der Fälle noch weiter optimiert werden. Für all diese Arbeiten sind in den vergangenen Jahren verschiedene Technologien optimiert worden, insbesondere

- der Aufbau großer Substanzbibliotheken,
- das Hochdurchsatz- und Ultrahochdurchsatz-Screening,
- schnelle chemische Synthesemethoden wie die Parallelsynthese sowie
- das *Molecular Modelling*, worunter man die Ermittlung der Raumstruktur der zu beeinflussenden Targetmoleküle und die gezielte Anpassung der Inhibitoren (Hemmstoffe) an die ermittelten Raum- und Bindungsverhältnisse versteht.

Abbildung 4 gibt als Beispiel die räumliche Anordnung und Interaktion zwischen dem Tumorsuppressor-Protein P53 und dem natürlichen Hemmstoff MDM-2 wieder. Inhibition dieser Interaktion mit einem geeigneten Wirkstoff würde zu einer gesteigerten Aktivität von P53 führen, was wiederum die Balance zwischen Proliferation und Apoptose in die gewünschte Richtung Apoptose verschieben kann.

Wie kann man aussichtsreiche (Medikamenten-) Kandidaten prüfen?

Substanzen, die über das Screening gefunden und durch *Molecular Modelling* und chemische Synthese optimiert wurden, werden in der Regel zunächst an Tumorzellen und danach im Tiermodell auf antikanzerogene Wirkung geprüft.

Am häufigsten kommen dabei die sog. Xenograft-Modelle (siehe Abb. 5) zum Einsatz. Dabei handelt es sich um speziell dafür gezüchtete immundefiziente Mäuse, in denen humane Tumorzellen nach Implantation einen Tumor bilden, der ggf. sogar metastasieren kann. An diesen Tumormodellen kann man gut die Wirksamkeit einer Substanz oder von Substanzkombinationen auf humane Tumoren studieren. Nach solchen präklinischen Studien bedarf es zur Prüfung der Wirksamkeit aber letztlich immer sorgfältiger klinischer Studien.

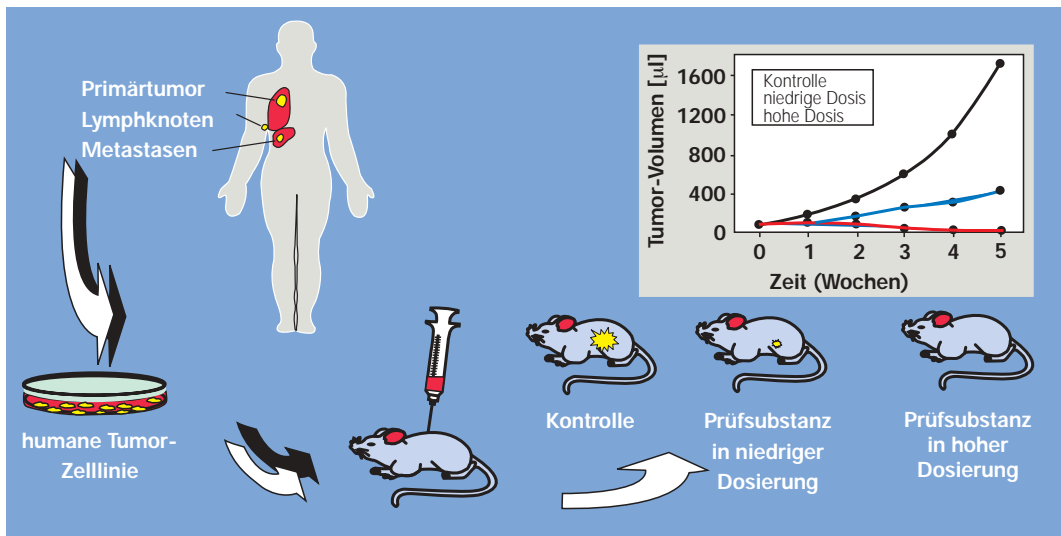


ABBILDUNG 5: Nach der Implantation von humanen Tumorzellen in immundefiziente Mäuse werden diese mit einer Kontrollsubstanz oder einer möglichen Wirksubstanz behandelt. Während Kontrollsubstanzen das Wachstum der Tumoren nicht beeinflussen, können

wirkungsvolle Medikamentenkandidaten das Wachstum stoppen. Die ins Tier implantierten Tumorzellen können zudem genetisch modifiziert werden, um neue Angriffspunkte in Tumorzellen aufzuspüren.

Erfolgreiche Arzneimittelentwicklung ist heute vor allem in enger Kooperation von Universitäten, öffentlichen Instituten, Biotechnologie-Firmen und der pharmazeutischen Industrie möglich. Abbildung 6 zeigt in welcher Phase, angefangen von der Grundlagenforschung bis zum Auffinden eines geeigneten Medikamentenkandidaten, welche Institutionen welche Beiträge leisten.

Welche Substanzen befinden sich derzeit bei Roche in der Entwicklung?

Auf der Grundlage der geschilderten molekularen Erkenntnisse und Methoden der Arzneimittelforschung wurden verschiedene Substanzen in die klinische Entwicklung gebracht. Die Palette

der bereits eingeführten und der sich in Entwicklung befindlichen Produkte von Roche im Bereich Onkologie umfasst nahezu alle eingangs erwähnten Ansatzpunkte einer medikamentösen Krebstherapie. In jüngerer Vergangenheit eingeführt wurden:

- Herceptin® (Target-spezifische Therapie bei Brustkrebs),
- Xeloda® (Zytostatikum bei metastasierenden kolorektalen Karzinomen),

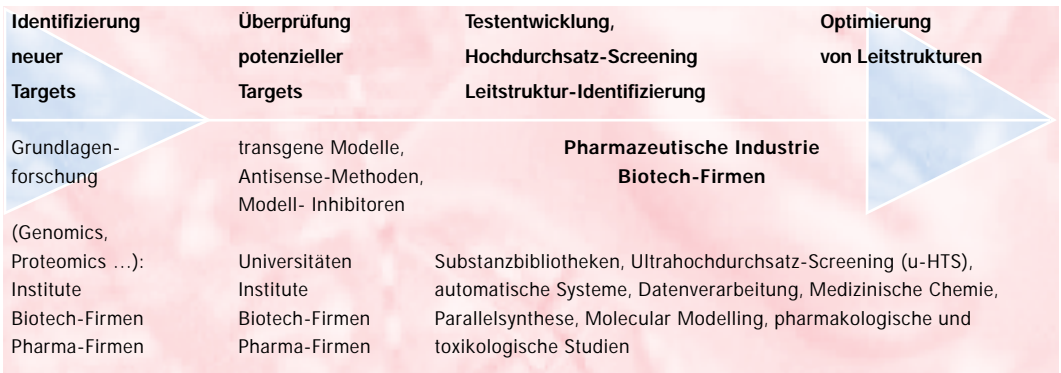


ABBILDUNG 6: Viele Institutionen mit unterschiedlichen Spezialisierungen arbeiten an der Entwicklung eines neuen Medikaments mit. Gezeigt wird der Weg eines Medikaments von der Grundlagenforschung bis hin zum Wirkstoffkandidaten, der in klinische Prüfungen Eingang findet.

- MabThera® (immunstimulierende Therapie bei Non-Hodgkin-Lymphomen) und
- Bondronat® (Ibandronat, Bisphosphonatverbindung zur Verbesserung der Lebensqualität bei Knochenmetastasen: hemmt den Knochenabbau und die Vermehrung der Tumorzellen im Knochen).

In Phase II oder III der klinischen Entwicklung befinden sich:

- Tarceva™ (Target-spezifische Therapie/Tyrosinkinasehemmer),
- das schon erwähnte rhu-Mab-VEGF (Antiangiogenese-Therapie),
- pegyliertes Interferon (immunstimulierende Therapie bei z. B. malignem Melanom, chronischer myeloischer Leukämie) sowie
- ein sog. Zellzyklus-Inhibitor (neuartiges Zytostatikum).

Wie könnte die Arzneimitteltherapie von Krebs in 10 bis 20 Jahren aussehen?

Die medikamentöse Basistherapie bei Krebs bilden heute Zytostatika, die in einigen Tumoren gut wirksam sind, in anderen Krebsarten aber nur begrenzt oder gar nicht.

Eine deutliche Erweiterung des therapeutischen Spektrums brachten Antikrebsmittel wie Herceptin®, MabThera® oder auch Glivec®, die gezielt molekulare Schaltstellen angehen. Weitere Target-spezifische, antiangiogenetische, antimetastatische und immunstimulierende Substanzen werden folgen. Die für einen vorgegebenen Patienten bzw. dessen Tu-

morerkrankung maßgeschneiderte Kombination solcher Wirkstoffe inklusive zytotoxischer Substanzen könnte für häufige, aber derzeit nur begrenzt medikamentös behandelbare Tumoren wie z. B. Lungenkrebs einen Durchbruch bringen. Dass dieses Vorgehen im Prinzip erfolgreich sein kann, wurde in der Aids-Behandlung demonstriert: Die Kombinationen von Proteasehemmern und Hemmstoffen der reversen Transkriptase führten zu einer dramatischen Verbesserung der Lebensqualität und Lebenserwartung HIV-infizierter Patienten.

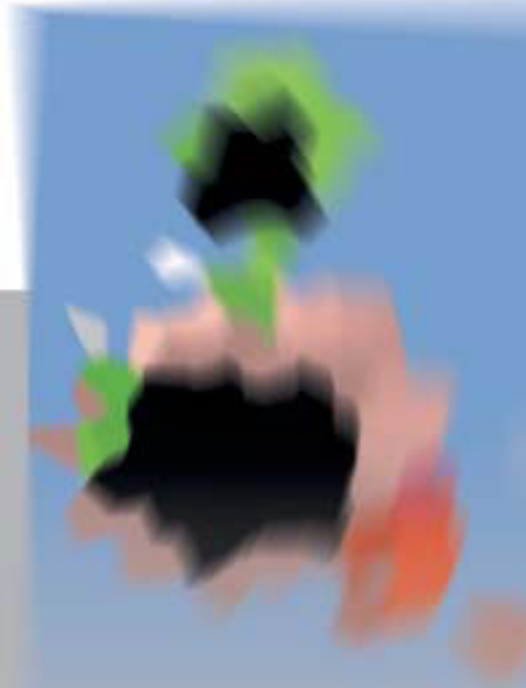
Der Durchbruch in der Aids-Therapie beruht auch auf der Entwicklung und Einführung einer einfachen und zuverlässigen diagnostischen Methode zur Überwachung des Medikamentenerfolges. Der Test basiert auf der Messung der Viruszahl im Blut und der Bestimmung der Resistenzentwicklung.

Für eine erfolgreiche Kombination der genannten Wirkprinzipien bei Krebs wird ebenfalls eine genaue Diagnose der molekularen Veränderungen des zu behandelnden Tumorlebens notwendig sein. Auf dieser Basis lassen sich dann gezielt die am besten geeigneten Medikamentenkombinationen auswählen.

Prof. Dr. Christoph H. Huber

Immuntherapie maligner Erkrankungen: Tumorbehandlung jenseits von Chemotherapie

Seit den 1950er Jahren stellte die Chemotherapie mit zellschädigenden und meist relativ einfach gebauten chemischen Substanzen die einzige Behandlungsoption für fortgeschrittene weitgestreute Tumorerkrankungen dar. Erst in den letzten zwei Jahrzehnten wurden komplementäre Strategien zur Krebstherapie entwickelt, die besser definierte Angriffspunkte zur Bekämpfung von Tumorzellen nutzen, spezifisch sind und damit dem Ziel der besseren Krankheitskontrolle mit geringeren Nebenwirkungen näher kommen. Immuntherapeutika, Signalübertragungshemmer und Gentherapeutika haben in dieser Hinsicht besondere Hoffnungen geweckt.



Mit steigendem Wissen über die biologischen Grundlagen der Immunabwehr und den daraus resultierenden Möglichkeiten, sie zu beeinflussen, wurden in den letzten zwei Jahrzehnten drei unterschiedliche immuntherapeutische Strategien in der Behandlung maligner Erkrankungen breiter geprüft. Dabei handelt es sich um den Einsatz

- rekombinanter Zytokine,
- monoklonaler Antikörper und
- sog. «T-Zell-basierter Tumorthapien».

Diese drei Strategien (siehe Abb. 1). beruhen auf drei unterschiedlichen immunologischen Mechanismen und werden in Folge kurz erläutert.

Zytokine

Zytokine sind Regelmoleküle, die die Interaktion zwischen Zellen unterschiedlichen Ursprungs in vielfältiger Weise steuern. Zytokine sind besonders wichtig bei der Regulation der Blutbildung, des Immunsystems und von Entzündungsvorgängen. In der Tumorthapie können Zytokine über direkte Hemmung des Tumorwachstums zur Tumorabstoßung führen oder durch indirekte Wirkungen wie z. B.

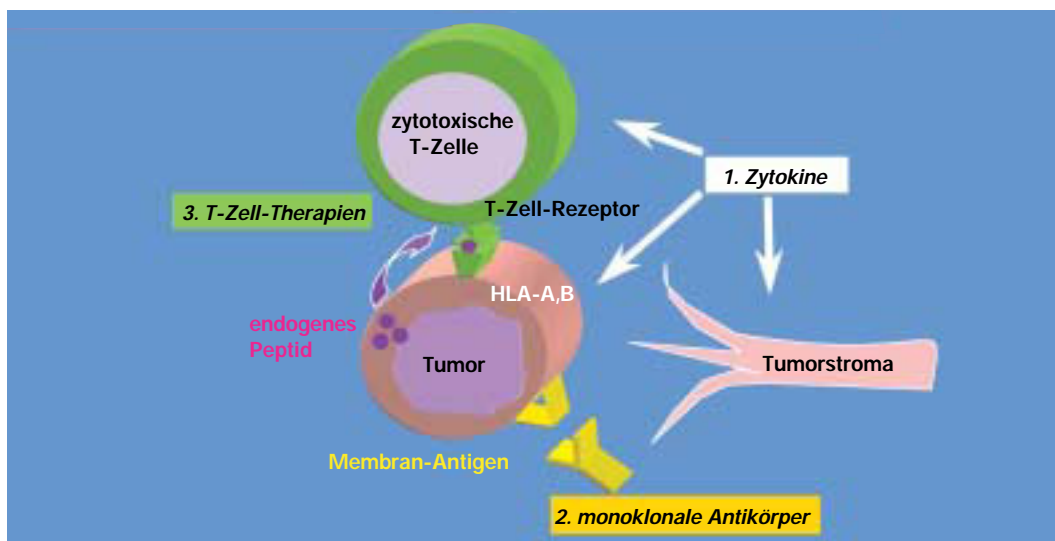


ABBILDUNG 1: Die Entwicklung von Immuntherapien maligner Tumorerkrankungen während der letzten 20

Jahre (Bedeutung der Abkürzung: HLA von engl.: *human lymphocyte antigen*).

- eine antiangiogenetische Wirkung,
- die Hemmung der Wachstumsfaktor-Produktion am gefäßhaltigen Bindegewebe des Tumors (Tumorstroma) oder
- eine Steigerung der Immunabwehr.

Über die in den 1970er Jahren entwickelte Methode zur Herstellung rekombinanter Proteine (DNA-Rekombinationstechnik¹) wurden in den letzten 20 Jahren über ein Dutzend Zytokine gentechnisch in größeren Mengen hergestellt und in die klinische Testung gebracht. Während wachstumsstimulierende Zytokine wie G-CSF (engl.: *granulocyte colony-stimulating factor*) und GM-CSF (engl.: *granulocyte-monocyte colony-stimulating factor*) zur Wiederherstellung der Granulozytopoese² nach Chemotherapie und insbesondere zur Gewinnung von Stammzellen bei der Stammzelltransplantation breiten Einsatz fanden, haben nur zwei rekombinante Zytokine einen gesicherten Platz in der Therapie maligner Erkrankungen erhalten:

- Interferon- α zur Behandlung der chronischen myeloidischen Leukämie und der Haarzell-Leukämie, mit Einschränkungen auch bei malignen Lymphomen, beim Kaposi-Sarkom, bei der essenziellen Thrombozythämie und der Polyzythämie sowie
- der T-Zell-Wachstumsfaktor Interleukin-2 zur Behandlung des fortgeschrittenen Melanoms und des Nierenzell-Karzinoms.

Es ist unbefriedigend, dass der genaue Wirkungsmechanismus dieser beiden Zytokine bis heute noch nicht geklärt ist. Trotz viel versprechender präklinischer Wirkprofile hat sich kein weiteres Zytokin zur Einleitung von Remissionen³ bei malignen Erkrankungen bewährt. Lediglich Erythropoietin mit seiner selektiven Wirkung zur Steigerung der Bildung roter Blutkörperchen, hat in der Behandlung der Tumoranämien, die zahlreiche fortgeschrittene bösartige Erkrankungen begleiten, Eingang gefunden.

1 Gentechnische Methode zur Schaffung neu (re)kombinierter DNA-Moleküle, die u. a. die genetische Modifikation von Säugtierzellen oder Mikroorganismen ermöglichte, so dass bestimmte Proteine in industriellem Maßstab hergestellt werden konnten.

2 Bildungsprozess von Zellen im blutbildenden Knochenmark, die der unspezifischen zellulären Immunabwehr dienen.

3 Rückgang von Krankheitssymptomen ohne Heilung

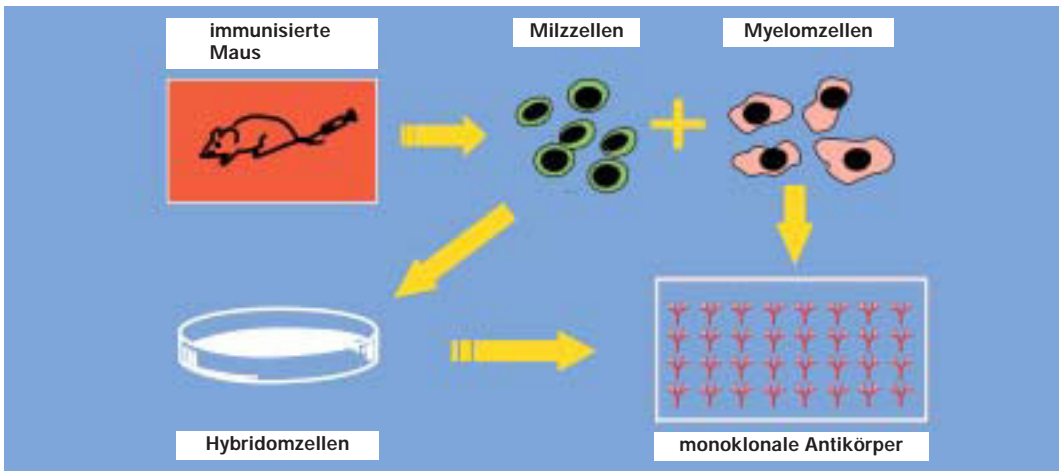


ABBILDUNG 2: Zur Herstellung monoklonaler Antikörper in großer Menge und Reinheit werden kurzlebige verschiedene Antikörper produzierende Milzzellen der Maus mit unsterblichen, sich laufend teilenden Tumorzellen zu Hybridomen fusioniert. Diese genetisch einheitlichen Zelllinien lassen sich in Zellkulturen halten und vermehren, wobei jede Zell-

linie eine einheitliche Art von (monoklonalen) Antikörpern bildet [1]. Monoklonale Antikörper (mAk) einheitlicher Struktur und Zusammensetzung werden für Forschungs-, diagnostische oder therapeutische Zwecke eingesetzt. Humanisierte mAk dienen als hochwirksame Medikamente auch in der Krebstherapie.

Monoklonale Antikörper

Monoklonale Antikörper sind in den letzten 20 Jahren unverzichtbare Werkzeuge der immunhistologischen Diagnostik maligner Erkrankungen geworden. Das Prinzip ihrer Herstellung ist in Abb. 2 gezeigt. In den letzten Jahren haben technische Verbesserungen, die die Herstellung therapeutisch genutzter monoklonaler Antikörper durch

- DNA-Rekombination,
- die Humanisierung muriner⁴ Antikörper und
- die Kopplung der Antikörper an Toxine bzw. Radionukleide betrafen, zu den ersten erfolgreichen klinischen Anwendungen mit daraus resultierenden Zulassungen als Medikamente geführt. Eine Zusammenstellung von derzeit bereits für die klinische Routineanwendung zugelassenen Antikörpern, ihrer Zielantigene und Indikationen findet sich in Tab. 1. Bei den ersten beiden in Tab. 1 aufgeführten Antikörpern handelt es sich um humanisierte Antikörper. Im Fall von MylotargTM wurde zusätzlich das Toxin Calicheamycin an den CD33-spezifischen

4 murin bedeutet von der Maus stammend

TABELLE 1: Zugelassene monoklonale Antikörper.

Antikörper	Handelsname	Zielantigen	Indikation	Literatur
Rituximab	Mabthera®	CD20	Behandlung rezidivierter bzw. refraktärer niedrig-maligner Non-Hodgkin Lymphome	[2]
Trastuzumab	Herceptin®	HER-2	Behandlung Chemotherapie-refraktärer Mammakarzinompatienten in Kombination mit Cisplatin	[3]
Gemtuzumab	Mylotarg™	CD33	Behandlung der rezidivierten akuten myeloischen Leukämie der Älteren	[4]

chimären Antikörper gekoppelt. Es handelt sich somit um ein synthetisiertes Immuntoxin. Allen drei Antikörpern ist gemeinsam, dass

- sie auch bei Chemotherapie-refraktären⁵ Krankheiten Remissionen erzielen können,
- sie für die Zielgewebe spezifisch sind und
- ihre Toxizität gering ist.

Zahlreiche weitere Antikörper gegen tumorassoziierte Membrankomponenten befinden sich derzeit in der klinischen Zulassung und versprechen, das Instrumentarium biologischer Wirkstoffe in der Tumorthherapie bedeutsam zu erweitern, aber auch zu verteuern.

T-Zell-Therapien

Eine ständig wachsende Zahl von Zelltherapien haben tumorreaktive T-Lymphozyten als gemeinsames Wirkprinzip. Die T-Zell-Therapien und eine schematische Darstellung ihres wesentlichen Wirkprinzips sind in Abb. 3 gezeigt. Alle Zellen des Körpers stehen unter der Kontrolle der T-Lymphozyten, welche als externes Überwachungssystem die immunologische Zerstörung von verändertem Geweben vermitteln. Evolutionär hat sich das T-Zell-Überwachungssystem insbesondere der Zerstörung virus-

⁵ refraktär bedeutet schwer oder nicht beeinflussbar

Vielseitige T-Zellen

Unser Blut enthält zu 0,07 % weiße Blutkörperchen (Leukozyten). Sie werden in Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten unterschieden. Alle diese Zellen werden aus Blutstammzellen im Knochenmark gebildet. Die B-Lymphozyten produzieren nach Differenzierung zur Plasmazelle und Kontakt mit einem Antigen Antikörper (humorale Immunabwehr). Die T-Lymphozyten reifen im Thymus. Hier lernen sie z. B. zwischen körpereigen und körperfremd zu unterscheiden. Die T-Lymphozyten sorgen für die zelluläre Immunabwehr. Man unterscheidet dabei zwischen:

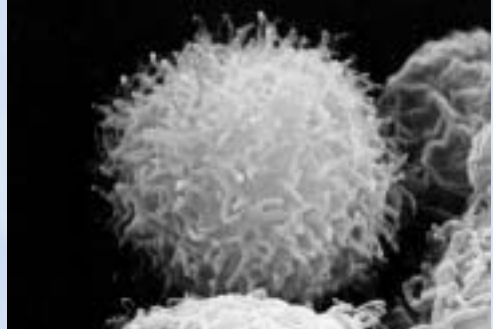
- T-Helferzellen,
- zytotoxischen T-Zellen (T-Killerzellen),
- T-Suppressorzellen und
- sog. Memory-Zellen (Gedächtniszellen).

T-Helferzellen helfen den B-Lymphozyten bei der Antikörperbildung, indem sie Wachstumsfaktoren (Zytokine bzw. Lymphokine) produzieren.

Zytotoxische T-Zellen zur Ausübung zellvermittelter Immunreaktionen können Apoptose (den programmierten Zelltod) auslösen, indem sie lytische Enzyme (Perforine und Granzyme) freisetzen. Dieser Prozess kommt allerdings nur in Gang, wenn vorher eine Bindung zwischen Rezeptoren auf der Oberfläche von T-Zellen (T-Zell-Rezeptoren) an einen Peptid-MHC-I-Molekül-Komplex (von engl.: *major histocompatibility complex*) auf der Oberfläche der zu vernichtenden Zellen erfolgte.

T-Suppressorzellen sind eine Untergruppe von T-Lymphozyten, die die Immunantwort durch T-Helferzellen und zytotoxischen Zellen unterdrücken können.

Die Memory-Zellen sind für das immunologische Gedächtnis verantwortlich. Diese Gedächtniszellen werden von B- und von T-Lymphozyten gebildet.



Elektronenmikroskopische Aufnahme eines menschlichen T-Lymphozyten in 20 000 facher Vergrößerung. Die Abbildung wurde entnommen aus [6].

infizierter Zellen entwickelt. Die gleichen Mechanismen dürften aber auch bei der Kontrolle mancher menschlicher Tumorerkrankungen und Leukämien wirksam sein. Endogene Peptide, die aus dem intrazellulären Abbau von viruskodierten Proteinen oder Tumorproteinen entstehen, werden im endoplasmatischen Retikulum an Histokompatibilitätsantigene des HLA-A, B-Lokus gebunden und als Peptid/HLA-Komplex in der Zellmembran verankert. T-Lymphozyten mit zytotoxischer Funktion vermögen diesen Komplex als fremd zu erkennen und die Peptid/HLA-Komplex- tragende Zelle zu zerstören.

Spender-Lymphozyten-Infusionen

Schon lange ist bekannt, dass T-Lymphozyten bei allogener⁶ Knochenmarkstransplantation einen starken immunologischen Schutzeffekt gegen residuale⁷ Leukämie vermitteln. Die zentrale Bedeutung der T-Lymphozyten zum Schutz vor Leukämie rezidiven nach allogener Knochenmarkstransplantation wird insbesondere durch

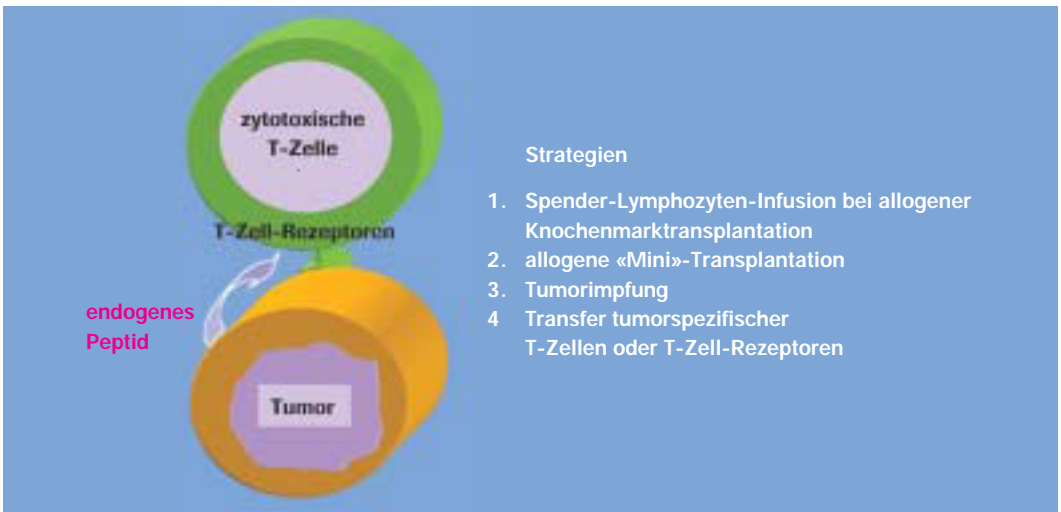


ABBILDUNG 3: Übersicht über die verschiedenen T-Zell-Therapien.

zwei Beobachtungen gestützt:

- Die Entfernung von T-Lymphozyten aus Knochenmarkstransplantaten verursacht vermehrtes Auftreten von Leukämierезидивen und
- bei bestimmten Leukämierезидивen kann die erneute Verabreichung von Spender-Lymphozyten-Infusionen bei der Mehrzahl der Patienten zu Krankheitsrückbildungen führen.

Das Konzept der «Mini-Transplantation»

Die Auffassung von der allogenen Knochenmark- und Stammzelltransplantation als T-Zell-basierte Immuntherapie führte in den letzten Jahren zur Entwicklung des «Mini-Transplantations-Konzepts». Bei der Mini-Transplantation zur Bekämpfung von Hoch-Risiko-Leukämien wird die Intensität der Ganzkörperbestrahlung- und/oder der Chemotherapie-Vorbehandlung soweit vermindert, dass eine Ausmerzung der Leukämie durch diese minimale Behandlung nicht mehr möglich ist. Die wesentlichen Behand-

6 Bei der allogenen Blutstammzelltransplantation (BSZT) werden die Blut bildenden Stammzellen des Patienten nach Zerstörung durch Chemotherapie und / oder Bestrahlung durch die eines gewebever-

träglichen Spenders ersetzt. Bei der autologen BSZT werden die eigenen Blutzammzellen reinfundiert.
7 zurückgebliebene

lungseffekte werden bei dieser Transplantationsform über die immunologische Wirkung von leukämiereaktiven Lymphozyten erreicht. Diese Transplantationsform beginnt sich insbesondere bei älteren Patienten durchzusetzen oder bei Patienten, bei denen aufgrund begleitender Organerkrankungen eine konventionelle allogene Transplantation nicht durchführbar ist.

Tumorimpfungen

Die Tumorimpfung stellt seit langem eine starke Hoffnung zur Behandlung fortgeschrittener Tumoren und insbesondere zur Vorbeugung von Tumorrezidiven nach chirurgischer Entfernung dar. Bisherige Anläufe mit autologen Tumorzellvakzinen haben aber eher enttäuscht.

Drei Fortschritte innerhalb der letzten 10 Jahre lassen nun eine erfolgreiche Umsetzung dieses Konzepts viel wahrscheinlicher erscheinen:

- Erstens wurden in den letzten Jahren eine ständig wachsende Gruppe molekular gut definierter Tumorantigene charakterisiert, die Zielstrukturen für zytotoxische T-Lymphozyten darstellen. Eine Reihe von überexprimierten Tumorproteinen wie HER-2, P53 und CEA, von Differenzierungsantigenen wie Tyrosinase, von sog. «Cancer-Testis»-Antigenen wie MAGE, von mutierten Tumorproteinen, wie CDK4R24C und von viralen Onko-Proteinen wie HPV-E6 und HPV-E7 stehen nun zur Prüfung in formalen Tumorimpfstudien zur Verfügung.
- Zweitens wurde die Methodik der Impfungen bedeutend verbessert. Definierte Tumorantigene wie rekombinante Tumorproteine, Tumorpeptide, Tumor-DNA in Form rekombinanter Impfviren, die für Tumorantigene kodieren, aber auch Tumor-RNA, dienen dabei als Immunogene. In den letzten Jahren wurde ebenfalls gezeigt, dass die Beladung von Antigen-präsentierenden Zellen, den sog. dendritischen Zellen ex vivo, eine besonders effiziente Möglichkeit ist, starke Impfreaktionen auszulösen und damit zumindest bei Melanom-Patienten in Einzelfällen auch Tumorrückbildung zu erreichen.
- Drittens wurden innovative Methoden wie die ELISPOT[®] und Tetramertechnologien entwickelt, mit deren Hilfe die Frequenz (Häufigkeit des Auftretens) tumorantigenspezifischer T-Lymphozyten in klinischen Studien gemessen werden kann. Die nun heranreifende Generation von innovativen Tumorimpfstudien nutzt molekular definierte Tu-

morantigene zur Impfung und will den Impferfolg sowohl über die klinische Tumorrückbildung als auch über die Induktion tumorspezifischer T-Zellen messen.

Es ist zu hoffen, dass diese innovativen Strategien in den nächsten Jahren zu verbesserten klinischen Ergebnissen führen werden.

Adoptive Immuntherapien Auch die sog. adoptive Immuntherapie maligner Erkrankungen durch Verabreichung tumorspezifischer Lymphozyten oder durch den genterapeutischen Transfer tumorspezifischer T-Zell-Rezeptoren machte in den letzten Jahren bedeutsame Fortschritte. Mehreren Gruppen ist es gelungen, ex vivo virus- oder tumorantigenspezifische T-Lymphozyten zu vermehren. Die Übertragung solcher Tumor-spezifischer T-Lymphozyten in Patienten hat in Einzelfällen zur Verminderung der Viruslast z. B. bei post-Transplantations-Epstein-Barr-Virus-Erkrankungen oder von Melanozyten beim Melanom geführt. Diese Anstrengungen waren jedoch durch große Schwierigkeiten und einen enormen Aufwand bei der Herstellung dieser zellulären Therapeutika auf individueller Basis begleitet und scheinen derzeit für eine Routineanwendung noch nicht geeignet. Eigene Untersuchungen und die anderer Arbeitsgruppen waren in den letzten Jahren daher der Etablierung des genterapeutischen T-Zell-Rezeptor-Transfers gewidmet [5]. T-Zell-Rezeptorgene aus tumorantigenspezifischen T-Zell-Linien der Maus wurden kloniert, rekombinante T-Zell-Retroviren konstruiert und mit diesen Viren ex vivo primäre menschliche T-Lymphozyten infiziert (transduziert). Mit diesem Verfahren ist es gelungen, die Fähigkeit zur Zerstörung verschiedenster Tumoren in normale menschliche Lymphozyten gesunder Spender zu übertragen (transduzieren). Es bleibt nun abzuwarten, ob diese präklinisch wirksamen Verfahren auch in der adoptiven Immuntherapie maligner Erkrankungen Erfolg haben werden.

8 ELISPOT: **ELISA-SPOT**-Methode zum quantitativen Nachweis tumorspezifischer T-Zellen

Literatur:

1. Koehler, G., Milstein, C. : Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497 1975
2. McLaughlin, P., Grillo-Lopez, A.J., Link, B.K. et al.: Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol.* Aug;16(8): 2825-33 1998
3. Pegram, M.D., Lipton, A., Hayes, D.F. et al.: Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/ neu- overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. *J Clin Oncol.* Aug; 16(8): 2659-71 1998
4. Sievers, E.L., Larson, R.A., Stadtmauer, E.A. et al.: Efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first relapse. *J Clin Oncol.* Jul 1;19(13):3244-54 2001
5. Stanislawski, T., Voss, R.H., Lotz, C., Sadovnikova, E. et al.: Circumventing tolerance to a human MDM2-derived tumor antigen by TCR gene transfer. *Nat. Immunol.* Oct 2 (10): 962-970 2001
6. Zink, B., Gerber, F., Colombo, V., Ryser, S.: *Lebende Mikrowelt*, Editiones Roche, S. 53, 1991

Dr. Petra Stieber

Alltag in einem onkologischen Labor

*Über den Nutzen und die Grenzen derzeitiger
Tumormarkerbestimmungen*

Tumormarker sind Substanzen, die bei Vorhandensein von malignen Tumoren in erhöhten Konzentrationen in Tumorgeweben und/oder Körperflüssigkeiten vorliegen können. Sie werden von Tumorzellen gebildet, befinden sich auf ihrer Oberfläche oder werden vom Körper als Reaktion auf das Tumorgeschehen gebildet. Tumormarkerbestimmungen sind klinisch-chemische Untersuchungen, die bei der Diagnose, der Prognosefindung, der Therapie-Effizienzkontrolle und der Verlaufsbeobachtung von malignen Tumoren eingesetzt werden.



Ein onkologisches Labor ist heute hauptsächlich mit folgenden klinischen Situationen konfrontiert:

1. Screening und Vorsorgeuntersuchungen,
2. Aufspüren von Primärtumoren bzw. Diagnosestellung bei Patienten mit Symptomen, entsprechenden Befunden in der bildgebenden Diagnostik und/oder der klinischen Untersuchung sowie
3. Nachsorge von Patienten mit bekannten Krebserkrankungen.

Screeninguntersuchungen *Das Problem der Cut-off-Werte*

Die diagnostische Spezifität eines Tumormarkers gibt an, bei wie viel Prozent der Gesunden beziehungsweise bei von gutartigen (benignen) Erkrankungen Betroffenen das Testergebnis richtig-negativ ausfällt. Eine diagnostische Spezifität von 100 % würde bedeuten: keine falsch-positiven Ergebnisse; eine 100 %ige Sensitivität eines Tumormarkers: keine falsch-negativen Resultate (siehe Abb. 1a). Für die Diagnostik wäre es ideal, wenn eine Zelle erst nach ihrer malignen Transformation diese Signalsubstanzen in genügender Konzentration in das Blut abgeben würde und wenn man durch ihren Nachweis den Ursprungsort des Tumors feststellen könnte. Solche Tumormarker im eigentlichen Sinne, d. h. Marker mit nahezu 100 %iger Spezifität (bei benignen Erkrankungen und gesunden Personen

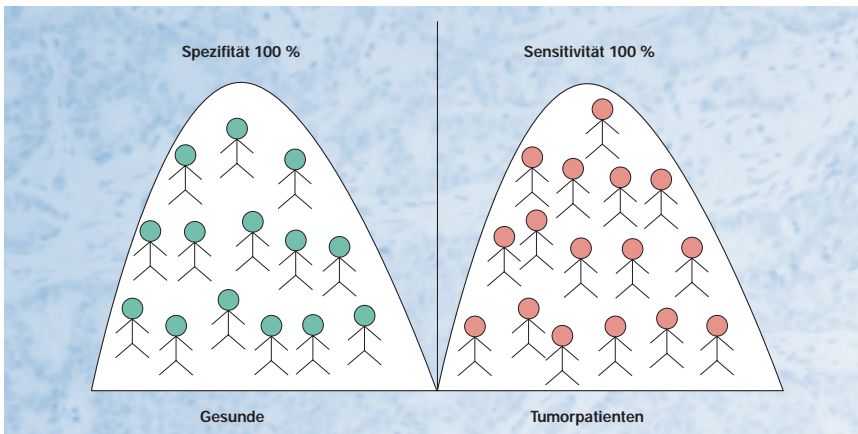


ABBILDUNG 1 a: Idealvorstellung: Eine ideale Tumormarkeruntersuchung sollte negative Testergebnisse bei allen benignen Erkrankungen und gesunden Personen (100 % Spezifität) und positive Testergebnisse

bei allen «Tumorkranken» (100 % Sensitivität) ergeben. Bei dem gewählten Cut-off-Wert (Grenzwert) ist die Unterscheidung der beiden Kollektive möglich.

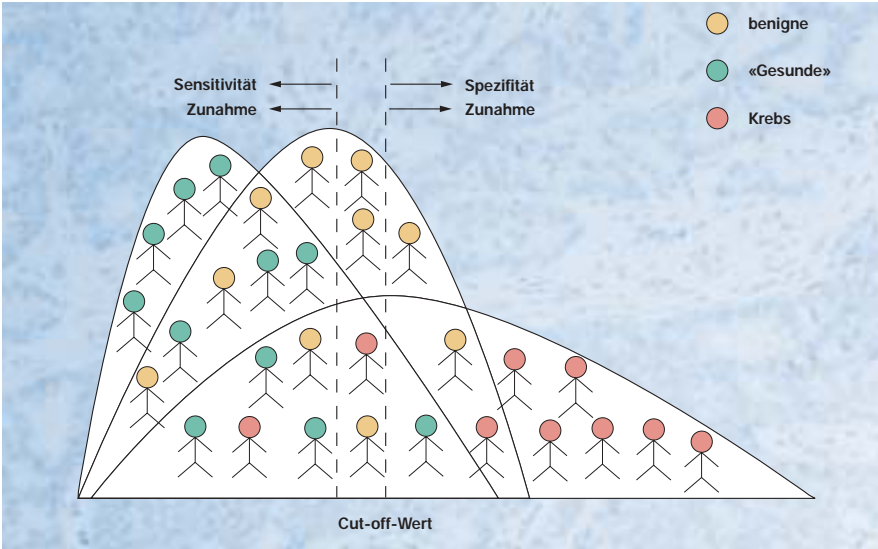


ABBILDUNG 1 b: Wirklichkeit: Komplette Überlappung von hoffentlich gesunden Menschen und Tumorpatienten. Außerdem können alle gutartigen Erkrankungen aller Organsysteme mehr oder weniger stark tumorassoziierte Substanzen freisetzen. Falsch-ne-

gative und falsch-positive Befunde werden in Abhängigkeit vom gewählten Grenzwert (Cut-off-Wert) ermittelt. Je höher die Spezifität eines Tumormarkers ist, desto geringer ist die Sensitivität.

nicht nachweisbar) und 100%iger Sensitivität (bei Tumoren auch im Frühstadium immer nachweisbar) gibt es bisher nicht. Vielmehr kommen alle bislang verfügbaren Tumormarker bei jedem Menschen physiologischerweise im Blut vor, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß. Somit entsteht eine deutliche Überlappung der Kollektive von gesunden Personen bzw. nicht-tumorkranken Personen und Tumorpatienten (siehe Abb. 1b). Der sog. Cut-off-Wert bezeichnet den oberen Grenzwert eines Tumormarkers bei gesunden Personen beziehungsweise bei benignen Erkrankungen. Die Festlegung dieses Grenzwerts bestimmt in Abhängigkeit von der Spezifität eines Markers dessen Empfindlichkeit (Sensitivität). Der Cut-off-Wert ist keine starre Grenze und kann der klinischen Fragestellung angepasst werden. Will man zum Beispiel möglichst viele Tumorpatienten erfassen, sollte der Grenzwert eher tiefer angesetzt werden. Man nimmt dafür allerdings zwangsläufig eine erhöhte Rate falsch-positiver Ergebnisse in Kauf – und umgekehrt (siehe Abb. 1b). Leider kann man bei einem niedrigen Wert eines Tumormarkers nie einen vorhandenen Tumor ausschließen. Asymptomatische Gesunde sollten wegen mangelnder Spezifität und Sensitivität

keiner Tumormarkeruntersuchung unterzogen werden. Eine Ausnahme ist hier die PSA-Serumuntersuchung bei Männern über 50 Jahren (PSA = Prostataspezifisches Antigen). Diese Analyse kann dazu beitragen, Prostatakarzinome aufzuspüren. PSA ist organspezifisch aber nicht tumorspezifisch, und kann somit kein Prostatakarzinom diagnostizieren, sondern lediglich als Indikator für eine Prostatabiopsie dienen. Auch hier stellt sich wieder das Problem: Wo ist der Cut-Off-Wert anzusetzen? Weltweit wird häufig ungeachtet einer deutlichen Methoden- und Altersabhängigkeit (siehe Abb. 2) ein Grenzwert von 4 ng/ml für den Gesamt-PSA-Wert eingesetzt. Da dieser Grenzwert dem individuellen Patienten nicht gerecht werden kann, orientiert man sich derzeit an den altersentsprechenden Referenzbereichen prostatagesunder Männer, angepasst an die verwendete Methodik zur PSA-Bestimmung. Liegt die PSA-Konzentration bei einem Patienten oberhalb des altersentsprechenden Referenzbereichs, so wird die zusätzliche Bestimmung des freien ungebundenen PSA durchgeführt. Der daraus resultierende Quotient (freies PSA/Gesamt-PSA) ermöglicht eine präzisere Aussage über die individuelle Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen eines Prostatakarzinoms (siehe Abb. 3). Es ist gesichert, dass durch die Bestimmung des PSA in der Screeningsituation organbegrenzte Karzinome früher ent-

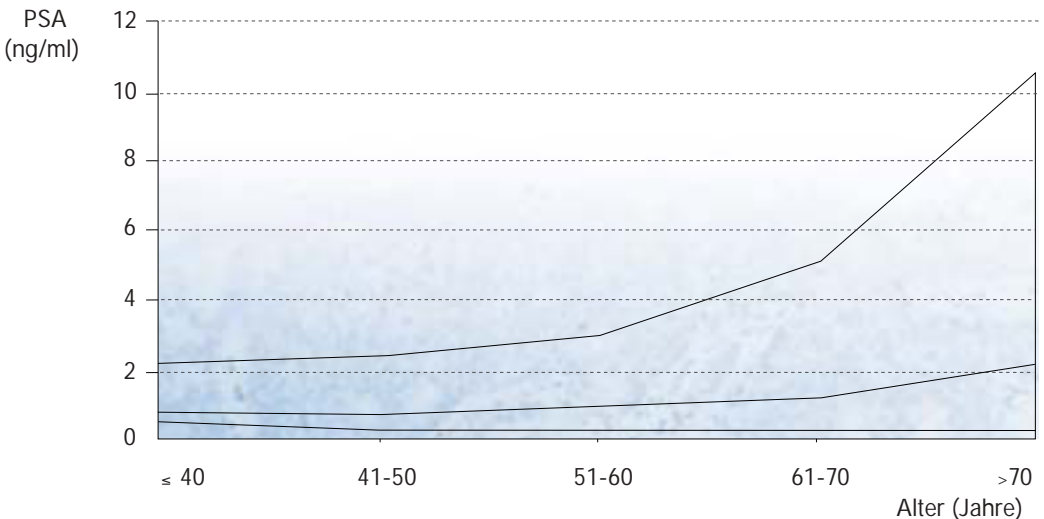


ABBILDUNG 2: Abhängigkeit des Gesamt-PSA-Wertes im Serum vom Alter der untersuchten Person. Selbst bei sehr hohem Spiegel an Gesamt-PSA kann

man nicht sicher sein, dass ein Prostata-Karzinom vorliegt.

Gesamt-PSA (ng/ml)	Q = freies PSA/Gesamt-PSA (ng/ml)			
	< 10 %	10-15 %	15-25 %	> 25 %
	pos. Biopsierate	pos. Biopsierate	pos. Biopsierate	pos. Biopsierate
2-4	67	54	17	15
4-6	75	33	17	8
6-8	78	44	40	20
8-10	89	57	57	14
>10	94	88	67	50

ABBILDUNG 3: Interpretation des Quotienten: freies PSA/Gesamt-PSA.

deckt werden. Kann aber durch das PSA-Screening das Überleben von Patienten mit Prostatakarzinom verlängert werden? Diese Frage kann erst beantwortet werden, wenn die beiden großen Screening-Studien, die derzeit in den USA und in Rotterdam laufen, 2004 und 2009 abgeschlossen sein werden. In Deutschland gilt zurzeit folgende Empfehlung: Keine Screening-Untersuchung, wenn der Patient es nicht selber wünscht. Tabelle 1 zeigt, bei welchen Tumorerkrankungen und welchen Risikogruppen eine Screening-Untersuchung mit welchem Tumormarker sinnvoll sein kann.

Diagnosestellung

Die Primärdiagnose und Primärtherapie bei Tumorpatienten sollten durch die klinische Anamnese, radiologische Verfahren und durch den intraoperativen Befund bestimmt werden.

In Ermangelung von Tumorspezifität und insbesondere auch von Organspezifität haben die meisten tumorassoziierten Antigene in der Unterstützung der Diagnosefindung zumindest bei

TABELLE 1: Tumormarker bei Risikopatienten.

chronische Lebererkrankungen	ja (AFP)
Männer > 50 Jahre	ja (PSA)
postmenopausale Frauen	nein
familiäre Poliposis coli	nein
Raucher	nein
genetische Prädisposition	nein

unbekannter Lokalisation eines eventuellen Tumors einen geringen Stellenwert.

In schwierigen Fällen, z. B. mit unklarem histologischem Befund und/oder unklarem Primärtumor, geben gezielte Tumormarker-Bestimmungen wichtige Zusatzinformationen, die im Einzelfall die Wahl der Therapie entscheidend beeinflussen können. Sinn der präoperativen Tumormarkerbestimmung ist zumeist nicht die Diagnosefindung; vielmehr geht es darum, geeignete Parameter für die Nachsorge, d. h. die Kontrolle der Effektivität der ersten Therapie, zu erhalten und eventuell auch um eine prognostische Information.

Primärtumor oder Metastasen?

Für die Unterscheidung zwischen primärem Leberkarzinom und Lebermetastasen die von einem anderen Primärtumor ausgehen, gibt es beispielsweise zwei sehr hilfreiche Tumormarker: das AFP (Alfa-Fetoprotein) und das CEA (karzinoembryonales Antigen). Hohe AFP-Werte und niedrigere CEA-Werte sprechen für einen primären Lebertumor (siehe Abb. 4). Ist das Verhältnis umgekehrt, so liegen eher Lebermetastasen eines anderen Primärtumors vor.

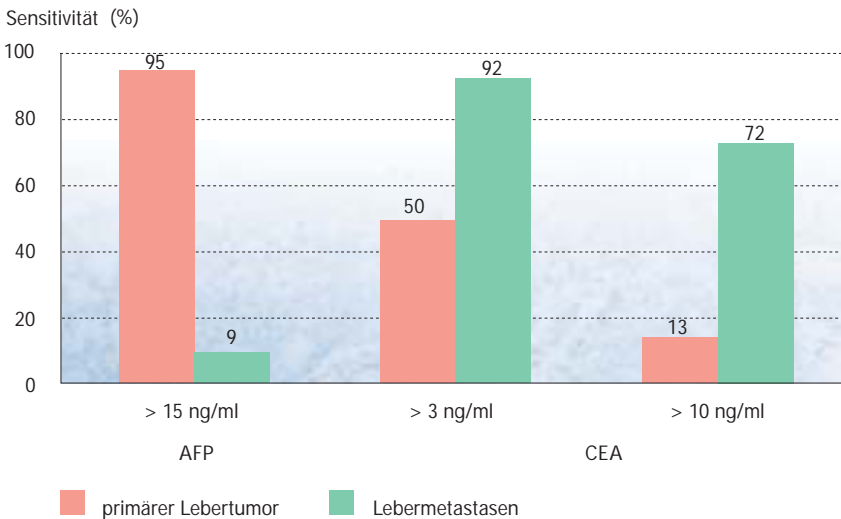


ABBILDUNG 4: Konzentrationen der Tumormarker Alfa-Fetoprotein (AFP) und karzinoembryonales Antigen (CEA) bei Patienten mit malignen Lebererkrankungen.

Anteil der Patienten (%)

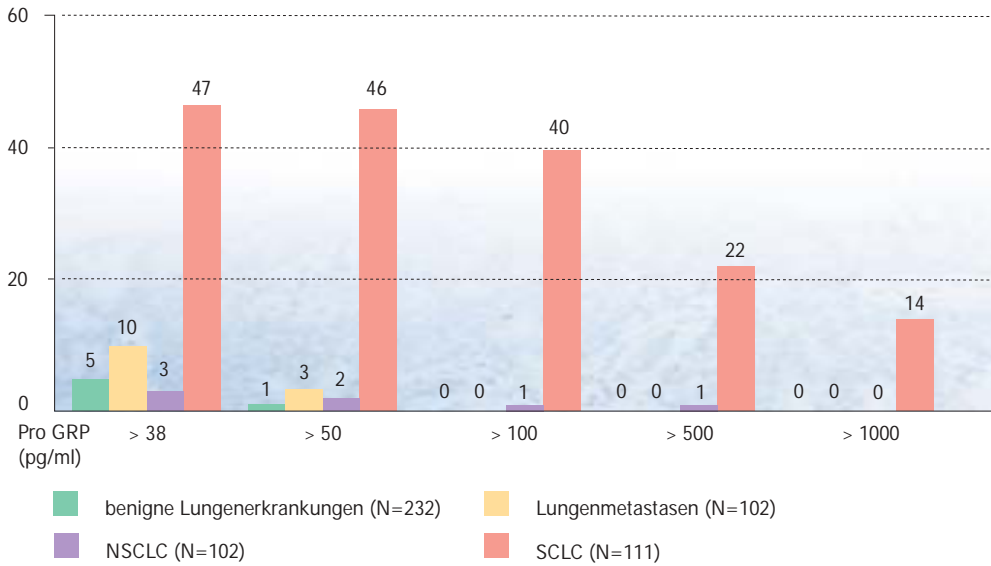


ABBILDUNG 5: Konzentrationen des Tumormarkers ProGRP (Pro-Gastrin-Releasing-Peptid) im Blut von Patienten mit verschiedenen gut- und bösartigen Er-

krankungen der Lunge. (N = Anzahl der Patienten, NSCLC = nichtkleinzelliges Lungenkarzinom, SCLC = kleinzelliges Lungenkarzinom).

Differenzierung von Tumoren

Zur Differenzierung von Lungentumoren unbekannter Ursache steht seit zwei Jahren ein Tumormarker, das Pro-Gastrin-Releasing-Peptid (ProGRP) zur Verfügung. Bei gutartigen Tumoren der Lunge werden sehr niedrige Werte dieses Markers gemessen. Extrem hohe Werte finden sich beim kleinzelligen Lungenkarzinom (siehe Abb. 5). Durch Verschieben des Cut-off-Wertes kann außerdem zwischen kleinzelligem und nichtkleinzelligem Lungenkarzinom unterschieden werden. Bei sehr hohen Cut-off-Werten erfasst man nur noch die Patienten mit kleinzelligem Lungenkarzinom. Bei anderen Tumorerkrankungen wird dieses tumorassoziierte Antigen nicht freigesetzt. Bei einem wenig differenzierten Bronchialkarzinom mit nicht eindeutiger Zuordnung zum kleinzelligen oder nicht kleinzelligen Typ würde man bei einem sehr hohen Wert für ProGRP oder NSE (neuronenspezifische Enolase) den Tumor wie ein kleinzelliges Bronchialkarzinom behandeln und die Wirksamkeit der Therapie über die Kinetik der Marker im Verlauf beurteilen.

Therapiekontrolle mittels Tumormarkern

Nicht die Einmal-Messung, sondern die in Abständen wiederholte Bestimmung des jeweiligen Indikator-Markers spiegelt die Effektivität einer Therapie wieder, wenn der Tumor genügend hohe Spiegel an tumorassoziertem Antigen ins Blut abgibt.

Somit kommt der postoperativen Bestimmung von Tumormarkern eine sehr große Bedeutung zu. Ist der Tumor vollständig entfernt, müssen die Tumormarker wieder Konzentrationen erreichen, die der Verteilung von Tumormarkern bei gesunden Personen entsprechen.

Bei fortgeschrittenen bzw. metastasierten Tumoren und systemischer Therapie wie z. B. Chemotherapie weisen kontinuierlich abfallende Tumormarkerwerte auf die Effektivität der Therapie hin; konstant bleibende oder zunehmende Tumormarkerwerte sind verdächtig im Hinblick auf ein Nicht-Ansprechen des Tumorwachstums auf die angewandte Therapie: Sie weisen auf die Notwendigkeit hin, das therapeutische Konzept zu wechseln! Tumormarkeruntersuchungen können sehr viel eher das aktuelle Verhalten des Tumors unter Therapie widerspiegeln als andere Untersuchungsverfahren. Ein Beispiel für den Nutzen von Tumormarkeruntersuchungen zur Überwachung des metastasierenden Mammakarzinoms ist in Abb. 6 dargestellt. Der Anstieg des Tumormarkers CA 15-3 konnte bereits vor einem Wiederauftreten von Symptomen und Befunden in der bildgebenden Diagnostik diagnostiziert und damit ein Fortschreiten der Krebserkrankung und eine Unwirksamkeit der verabreichten Therapie festgestellt werden.

Tumornachsorge

Während die Tumormarkerbestimmung unter einer laufenden Therapie heute allgemein als akzeptierter Standard gilt, ist ihre Anwendung in der Nachsorge oft noch umstritten. Unter Berücksichtigung der wichtigen Kriterien zur korrekten Anwendung und Interpretation von Tumormarkern (s. u.) bedeutet ihr Einsatz in der Nachsorge von Tumorerkrankungen sehr häufig einen Zeitgewinn von mehreren Monaten in der Diagnostik einer Rezidivierung bzw. Metastasierung, da sie sehr viel sensitiver als die bildgebende Diagnostik sind. Tumormarker können auf Krankheitsrezidive bis zu 24 Monaten vor Auftreten klinischer Symptome oder entsprechender Befunde in den bildgebenden Untersuchungen hinweisen (lead time).

Bei der Nachsorge von Tumorpatienten ist ein Anstieg der Tumormarker jedoch nur dann von Bedeutung, wenn er prognos-

T1NOMO

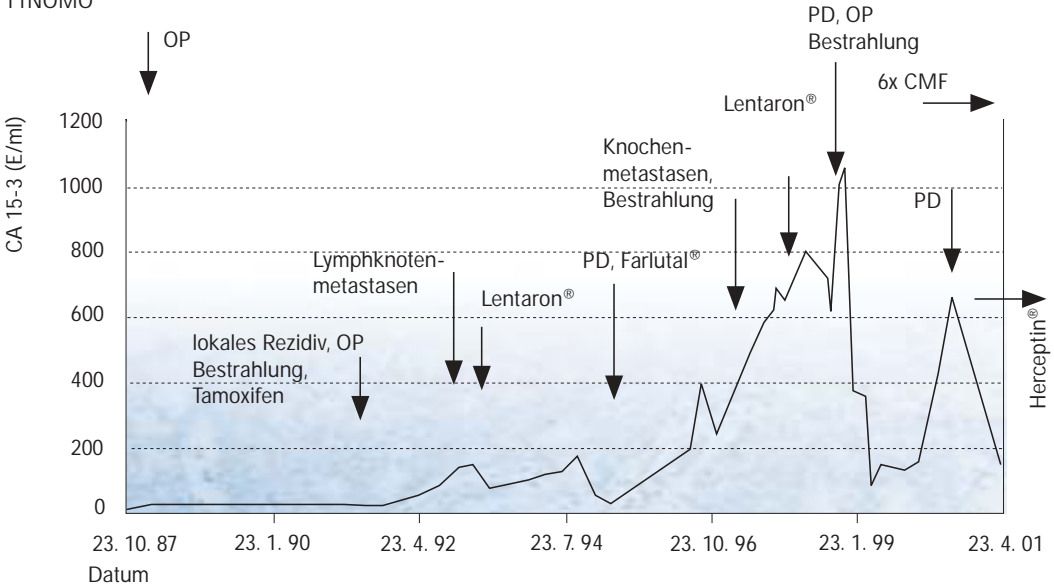


ABBILDUNG 6: Konzentration des Tumormarkers CA15-3 bei einer Patientin mit metastasierendem Brustkrebs im Verlauf von 14 Jahren. Man sieht einen Anstieg des Tumormarkers bereits vor dem Auftreten von Symptomen und Befunden der bildgebenden Diagnostik. Der Wiederanstieg von individuellen Tu-

mormarkerwerten kann auch die Unwirksamkeit einer Therapie anzeigen. (PD = progressive disease = Fortschreiten der Erkrankung, OP = Operation, CMF = Kombinationstherapie mit den Chemotherapeutika: Cyclophosphamid, Methotrexat und 5-Fluorouracil)

tische oder therapeutische Folgen hat, d. h. nur dann, wenn die Früherkennung dieser rezidivierenden Tumorerkrankung eine Verbesserung oder Verlängerung des rezidivfreien Intervalls oder sogar des Überlebens der Patienten bedeutet.

Genutzt wird dieser zeitliche Vorsprung bislang (nicht zuletzt auch wegen der guten therapeutischen Möglichkeiten) bei Keimzelltumoren und beim multiplen Myelom. Bei den übrigen, sehr viel häufigeren Tumoren wie dem Mamma-, Bronchial-, Prostata- und Pankreaskarzinom fehlt oft eine effiziente Therapiemöglichkeit (Pankreaskarzinom, Bronchialkarzinom) oder aber bislang der Beweis, dass eine frühzeitigere Therapie das rezidivfreie Intervall verlängert bzw. das Überleben oder die Lebensqualität verbessern kann (Mammakarzinom, Prostatakarzinom) [3]. Bei Darmkrebs ist zwar belegt, dass die frühzeitige Entdeckung und anschließende Operation von Lokalrezidiven und Lebermetastasen vorteilhaft für die Patienten ist und dass die Tumormarkerbestimmung von CEA zu

einem frühen Zeitpunkt diese Rezidivierung anzeigen kann, dennoch wurde im Rahmen der allgemeinen Kostenreduktion im Gesundheitswesen das Intervall der CEA-Bestimmung in der Nachsorge in Deutschland von 3 auf 6 Monate verlängert.

Zur Klärung der Bedeutsamkeit einer frühzeitigen Diagnostik und Therapie in der Nachsorgesituation bedarf es somit insbesondere beim Mamma-, Colon- und Prostatakarzinom prospektiv angelegter randomisierter therapeutischer Interventionsstudien.

Deshalb wurde 1997 an der Universität München im Klinikum Großhadern in Zusammenarbeit des Instituts für Klinische Chemie, der onkologischen Klinik und der Frauenklinik eine Studie initiiert, die klären soll, ob durch die regelmäßige Bestimmung der Tumormarker CEA und CA 15-3 eine Metastasierung im sehr frühen Stadium erfasst werden kann. Damit soll auch geklärt werden, ob frühe therapeutische Eingriffe die Zeit bis zur Manifestation eines klinisch feststellbaren Fortschreitens der Erkrankung und damit die Lebensqualität und eventuell auch das Gesamtüberleben verlängert.

Die Methode muss beibehalten werden

Von der Zuverlässigkeit analytischer Ergebnisse hängt die Verlässlichkeit eines klinisch-chemischen Befundes ab. Da Tumormarkerbefunde insbesondere zur Verlaufsbeurteilung herangezogen werden sollen, sind reproduzierbare Analyseergebnisse eine unerlässliche Voraussetzung. Weniger als 10 % Varianz von Untersuchung zu Untersuchung (damit auch von Charge zu Charge des jeweiligen Assays) sind zwingend erforderlich. Dank weitgehender Automatisierung können Tumormarkerbestimmungen heute diese Anforderungen erfüllen [3].

Jedoch sollte aus einem einmaligen Anstieg der Werte im Verlauf einer Tumorerkrankung zunächst keinerlei Konsequenz gezogen, sondern eine Kontrolluntersuchung nach 2-3 Wochen unter Verwendung der gleichen Methodik abgewartet werden. Trotz Fortschritten bei der Standardisierung der Tests verschiedener Hersteller durch Verfügbarkeit international anerkannter Referenzpräparationen der Weltgesundheitsorganisation WHO und anderer Einrichtungen sind Tumormarkerwerte nach wie vor methodenabhängig. So können mit Tests verschiedener Hersteller im gleichen Serum völlig unterschiedliche Werte gemessen werden, sogar dann, wenn es sich im Prinzip um die gleiche Methode handelt. Aus diesem Grunde muss dem in der

Tumornachsorge tätigen Arzt bekannt sein, mit welchem Test der Tumormarker bestimmt wurde (Angabe des Herstellers und Testsystems zusammen mit der Befundmitteilung). Tumormarkerwerte ohne Kenntnis der verwendeten Methodik in der Verlaufsbeobachtung eines Patienten zu vergleichen, ist derzeit wegen der Methodenabhängigkeit solcher Werte nicht vertretbar. Bei einem Wechsel der Methodik sollte eine Vor-Serumkontrolle des Patienten bzw. eine vorübergehende parallele Bestimmung mit beiden Methoden erfolgen [1-3].

In-vivo-Einflussgrößen Die Konzentration von Tumormarkern ist von ihrer Synthese, der Freisetzung sowie von der Tumormasse, Tumorausbreitung und Blutversorgung des Tumors zum Zeitpunkt der Blutentnahme abhängig. Erhöhte Tumormarkerwerte werden auch bei Störung der Ausscheidung beobachtet, so bei Niereninsuffizienz, Leberinsuffizienz und insbesondere bei Gallenstauung.

Schlussfolgerung Tumormarker stellen bei korrekter Anwendung wichtige Hilfsmittel für die Individualisierung der Diagnostik und Behandlung dar. Sie sind somit für den Patienten von großem Wert und tragen darüber hinaus zur Kostendämpfung bei. Für den vernünftigen Einsatz von Tumormarkeruntersuchungen ist es unverzichtbar, dass die gewonnenen Informationen nicht nur korrekt, sondern auch dazu geeignet sind, aufzuzeigen, ob eine Erkrankung oder Anzeichen für ein Erkrankungsrisiko bei einer augenscheinlich gesunden Person vorliegen. Dies ist bei Tumormarkern zurzeit noch nicht der Fall. Sie eignen sich aber gut zur Steigerung der Zuverlässigkeit der Krankheits- und Therapieüberwachung. So sollten z. B. bei Patienten mit metastasierenden Karzinomen während der Therapie Tumormarkeruntersuchungen und Untersuchungen mit bildgebenden radiologischen Verfahren nicht parallel, sondern stufendiagnostisch eingesetzt werden.

Prof. Dr. Bärbel Porstmann

Neue Diagnostika ermöglichen spezifische Krebsbekämpfung

Die etablierten Tumormarkeruntersuchungen dienen vorwiegend der Verlaufskontrolle während und nach Tumortherapien. In Zukunft sollen neue Biomarker die Frühdiagnostik von soliden Tumoren verbessern und individuell zugeschnittene Therapieentscheidungen ermöglichen. Dies erfordert eine neue Generation von Diagnostika: prädiktive Testverfahren. Durch differenzierte Analyse von Tumoren sowie von vererbten Genveränderungen im Patienten sollte dies möglich sein.



Krebs: eine erworbene Generkrankung

Krebs ist ein Sammelbegriff für hunderte von verschiedenen Erkrankungen, deren Gemeinsamkeit das invasive und unkontrollierte Zellwachstum ist. Krebs ist eine chronische Erkrankung, die durch verschiedene Phasen charakterisiert werden kann: von genetischer Prädisposition über verschiedene Formen der prä-malignen und malignen Entartung der Zelle bis hin zum Fortschreiten der Erkrankung.

Die Ausprägung der einzelnen Stadien sowie die Schnelligkeit des Krankheitsverlaufes sind individuell sehr unterschiedlich. Sie sind im Wesentlichen vom molekularen Profil des entstehenden Tumors abhängig, welches aus den Anhäufungen genetischer Veränderungen in den einst normalen Körperzellen resultiert.

Veränderungen in Genen, die normalerweise eine tumorunterdrückende Wirkung haben (Tumorsuppressorgene) und bereits in Keimbahnzellen (Ei- oder Samenzellen) auftreten, führen dazu, dass ein höheres Risiko für eine Krebsentstehung vererbt wird. Nach gegenwärtigem Wissensstand weisen allerdings nur etwa 10 % aller neu entstehenden Tumoren bereits vererbte Veränderungen in solchen Genen auf. Die meisten Tumoren entwickeln sich durch sporadisch auftretende Mutationen im Genom von normalen Körperzellen. Die genetischen Veränderungen führen zu Dysregulationen des Zellstoffwechsels, vermehrter Proliferation und weiterer genetischer Instabilität in diesen Zellen. Es bilden sich im Laufe der Zeit sog. Zellklone mit unterschiedlichen molekularen Profilen aus, die durch fortlaufende Selektion auswachsen und den Charakter des Tumors definieren und dynamisch verändern. Nach Schätzungen sind mehr als 3000 Gene – das sind ungefähr 10 % des menschlichen Genoms – in allen Tumoren durch Mutationen und Fehlregulationen beeinträchtigt. Die individuell verschiedene Kombination der Genveränderungen definiert die verschiedenen Wachstums- und Metastasierungsmuster von Tumoren (siehe auch Artikel Molekulare Onkologie). Dabei haben auch Eigenschaften des Patienten (z. B. HLA¹- und Immunsystem) einen direkten Einfluss auf die Tumorprogression, welche im Detail noch nicht bekannt sind.

Tumorgewebe bestehen also aus heterogenen Zellgruppen, weshalb eine standardisierte Analyse von Tumoreigenschaften sehr schwierig ist.

1 HLA von engl.: *human leucocyte antigen*

Tumoranalytik: Gegenwart und Zukunft

Der Nachweis von tumorspezifischen Proteinen mit Hilfe von Antikörpern dominiert gegenwärtig die In-vitro-Diagnostik in der Onkologie. Zell- und Tumorantigene werden in Körperflüssigkeiten mittels ELISA (ELISA = *enzyme-linked immunosorbent assay*) oder auf intakten Zellen mittels Immunhistochemie analysiert.

Krebsassoziierte oder krebsspezifische Marker, die zu diagnostischen Zwecken nutzbar sind, finden sich auf allen Ebenen der Zellregulation: auf der Ebene der Erbinformation, der Desoxyribonukleinsäure (DNA) und auf der Ebene der Genprodukte wie Ribonukleinsäure (RNA) und Proteine.

Durch technologische Fortschritte der Nukleinsäureanalytik wie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, von engl.: *polymerase chain reaction*) oder zelluläre Methoden, wie die In-situ-Hybridisierung mit DNA-Sonden für definierte Genabschnitte, finden molekulare Methoden zur DNA- und RNA-Analytik in Tumoren mehr und mehr Anwendung.

Spezifische Markerprofilanalysen werden zunehmend eingesetzt, um Tumoren zu charakterisieren und nach neuen und besseren diagnostischen Markern zu suchen.

Solche Profile werden durch Analyse einer großen Anzahl von Genen generiert. Dabei wird die vom Gen gebildete Boten-RNA (mRNA) bzw. das Methylierungsmuster² der DNA untersucht. Ebenso werden tausende Proteine in Tumoren mit verschiedenen Techniken untersucht.

Bestimmung des Ausmaßes der Genablesung

Expressionsprofile von Boten-RNA

Mit Chips kommerzieller Hersteller wie Affymetrix oder Clontech wurde gezeigt, dass die Expressionsmuster³ von Boten-RNA in Tumoren individuell sehr unterschiedlich sind, jedoch auch Gruppierungen von Tumoren mit gleichen Eigenschaften zulässt, was mit herkömmlichen diagnostischen Methoden nicht gelingt. Die Nutzung solcher Profile für diagnostische Tests ist jedoch derzeit noch nicht denkbar, da Weiterentwicklungen in Bioinformatik und Statistik erforderlich sind, um auch die Interpretation solcher komplexen Informationen zu vereinfachen. Standardisierung und Erhöhung des Probendurchsatzes solcher

2 Zum Begriff der Methylierung siehe S. 9

3 Unter Gen-Expression wird die Umsetzung der Gen-Information in Genproduk-

te (RNA, Proteine) verstanden. Expressionsprofile sind Muster verschiedener Genprodukte.

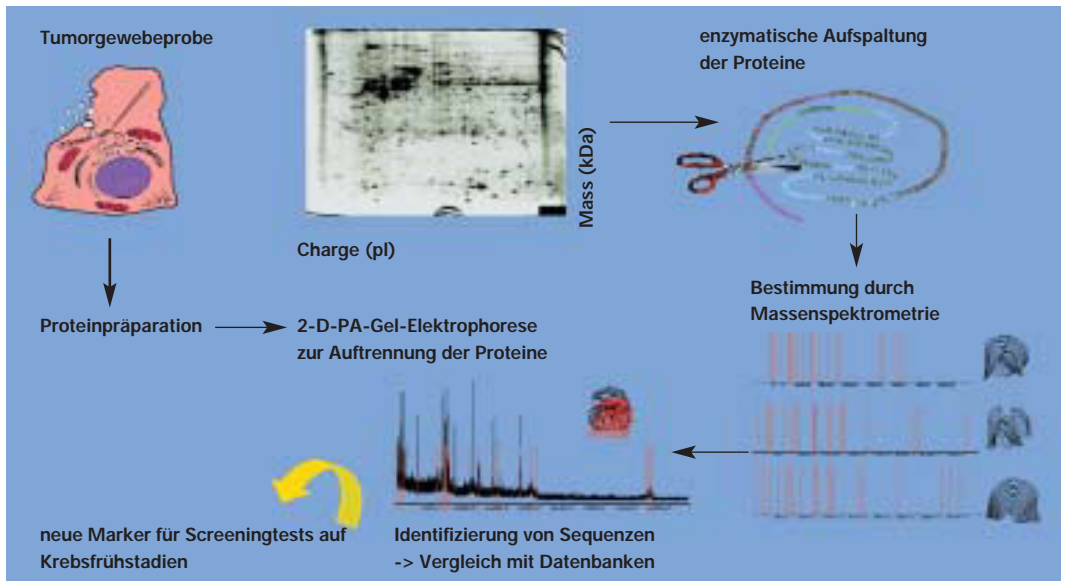


ABBILDUNG 1: Suche nach neuen krebspezifischen Proteinen mit Hilfe der Proteomforschung.

Techniken erfordern ebenfalls noch immense Basisarbeit. Diese Technologien fördern jedoch schon jetzt eine Reihe neuer Marker zutage, die in naher Zukunft auf vorhandenen Instrumenten bestimmt werden können.

Expressionsprofile von Proteinen

Weltweit laufen zahlreiche Initiativen, um neue krebspezifische Proteine in Tumoren und entsprechenden Körperflüssigkeiten zu finden.

Auch Roche hat ein Proteomics-Programm initiiert, um neue Marker zur Frühdiagnostik von Tumoren zu identifizieren. Dabei werden die Proteine aus Tumorproben präpariert und mit Hilfe hochauflösender 2D-Gel-Elektrophorese in einzelne Proteinspots aufgetrennt. Die Proteine in den Spots werden enzymatisch in Proteinfragmente gespalten und mittels Massenspektrometrie analysiert. Die so ermittelten Proteinsequenzen können dann durch einen Datenbankvergleich identifiziert werden (siehe Abb. 1).

Profile von Gen-Methylierungen auf DNA-Ebene

DNA-Methylierung ist ein grundlegender Mechanismus in der

Krebsentstehung, der die Expression vieler Tumorsuppressorgene zu unterdrücken vermag. Neuere Entwicklungen ermöglichen die gleichzeitige Analyse der Methylierung vieler Genabschnitte auf der Basis von Chiptechnologien und damit die schnelle Identifizierung diagnostisch relevanter Sequenzen. Es wird angenommen, dass methylierte DNA-Sequenzen in naher Zukunft neue diagnostische Analyte darstellen können, die, im Gegensatz zur Boten-RNA, den Vorteil hoher Stabilität in gelagerten oder fixierten Zellen z. B. in histologischen Präparaten oder auch in entsprechenden Körperflüssigkeiten aufweisen.

Diagnostische Lücken

Neue, potente Marker werden dazu beitragen, diagnostische Lücken

- in der Klassifizierung von Risikopersonen,
 - in der Krebsfrühd Diagnose,
 - in der Differenzialdiagnose,
 - in der Vorhersage (Prädiktion) von Tumorklassen und Abschätzung des Therapieerfolges sowie
 - in der Therapieverlaufskontrolle
- zu schließen, wobei Tests mit höherer diagnostischer Sensitivität und Spezifität als die im Markt existierenden Tests angestrebt werden.⁴

Die Komplexität von Tumoren lässt erwarten, dass eher Markerprofile als Einzelmarker die nächste Generation der Testplattformen darstellen. Einheitliche Krebs-Phänotypen werden sich in unterschiedliche Genotypen unterscheiden lassen, was neue Möglichkeiten in der Krebsbehandlung eröffnet: z. B. die Vorhersage, welche Tumoren nicht auf Medikamente oder Bestrahlung ansprechen werden, womit die Auswahl einer individuell angepassten Behandlung möglich wird (siehe Abb. 2).

Eine neue diagnostische Initiative

Ziel einer neuen Initiative von Roche ist es, existierende diagnostische Lücken mit neuen und besseren Tests zu füllen. Diese diagnostische Initiative umfasst Programme zur Identifizierung neuer Marker

⁴ Die derzeitigen Screening-Tests verursachen hohe Folgekosten. Das National Cancer Institute der USA schätzt diese in der Größenordnung von 6 Mrd. USD, für

Screeninguntersuchungen auf Gebärmutterhalskrebs, Brustkrebs, kolorektales Karzinom und Prostatakrebs.

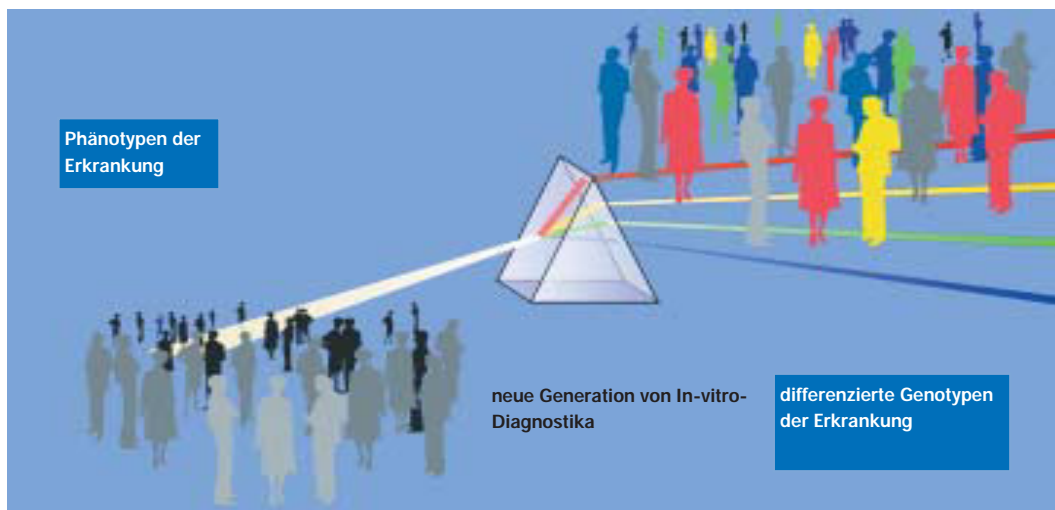


ABBILDUNG 2: Integrierte Krebsbetreuung: Nicht nur die Diagnose des Tumors kann therapieentscheidend sein, sondern auch seine genomische Charakterisierung.

sowie eine Ausrichtung von Testtechnologien in Richtung Multiparameteranalysen, sowohl für die Anwendung in der Forschung als auch später in der Diagnostik. Weitere Tests, die eine Vorhersage der Resistenz auf eine Behandlung ermöglichen, sollen entwickelt werden.

Prädiktive Tumortests zur Vorhersage des Behandlungserfolges

Die Diagnostik der HER-2-Expression ist therapieentscheidend

Ein Beispiel für eine therapieentscheidende Diagnostik und für einen ersten Ansatz zur individuell angepassten Behandlung von Brustkrebspatientinnen ist die Tumoranalytik des HER-2-Rezeptors. Eine Behandlung mit dem gentechnisch hergestellten monoklonalen humanisierten Antikörper Trastuzumab (Herceptin®), der Tumorzellen durch die Bindung an die HER-2-Rezeptoren zum Absterben bringt, ist nur dann erfolgreich, wenn die sowohl Wachstum als auch Metastasierung stimulierenden HER-2-Rezeptoren (siehe Abb. 3) in verstärktem Ausmaß gebildet werden, was aber nur in etwa 25 % der Brusttumoren der Fall ist. Aus diesem Grund ist vor Therapiebeginn ein Test zur Ermittlung des Rezeptorstatus vorgeschrieben. Die Überproduktion von HER-2 lässt sich auf

verschiedene Arten bestimmen. Über den Nachweis:

- der erhöhten Kopienzahl des HER-2-Gens auf DNA-Ebene (die Genamplifizierung ist bei Brustkrebs die Hauptursache für die Überexpression des HER-2-Rezeptors),
- der erhöhten Expression der HER-2-Boten-RNA,
- der Überexpression der HER-2-Rezeptoren auf der Zelloberfläche oder
- der Menge an freigesetzten HER-2-Rezeptoren im peripheren Blut.

Die immunhistochemische Analyse (IHC) der HER-2-Rezeptorexpression auf der Oberfläche von Brustkrebszellen gilt derzeit noch als Goldstandard unter den verschiedenen Techniken. Der Nachweis wird auf Tumorgewebeschnitten durchgeführt. Um die IHC mit ihrer subjektiv beeinflussten mikroskopischen Beurteilung und ihrer immer noch geringen Standardisierung zu umgehen, wurden alternative HER-2-Tests entwickelt. Ein kommerzieller ELISA-Test, der eine quantitative

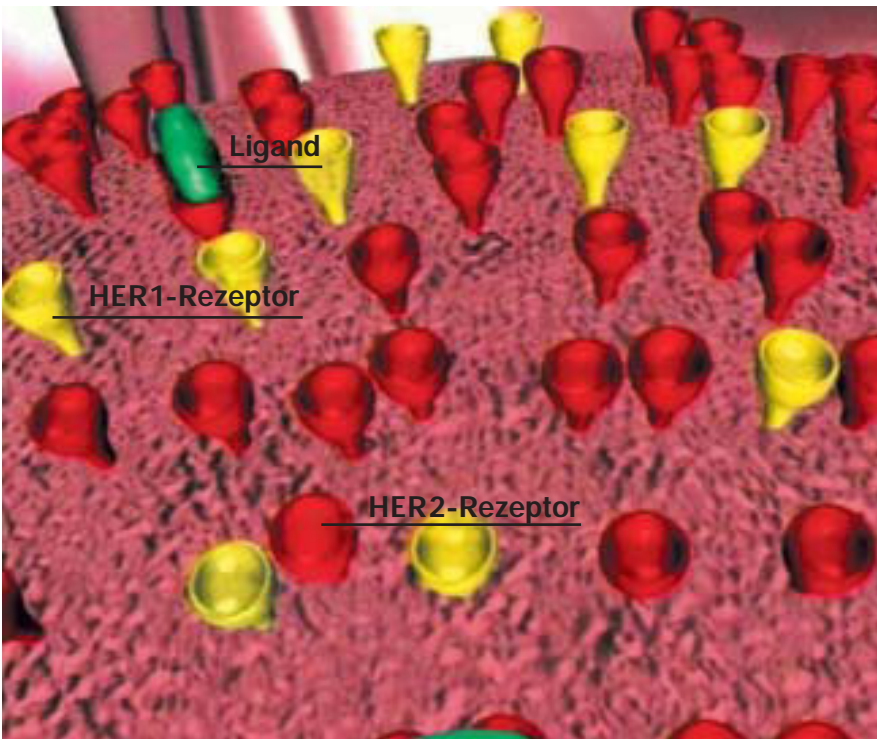


ABBILDUNG 3: Der Wachstumsfaktor HER-2 auf der Oberfläche von Brustkrebszellen ist Ziel von Diagnose und Therapie. In ca. 25 % der Brustkrebsfälle ist er

auf der Oberfläche der Tumorzellen vermehrt vertreten (überexprimiert).

Analyse von HER-2-Rezeptoren in Tumorgewebelysaten oder im peripheren Blut erlaubt, befindet sich im Validierungsstadium.

Ein weiterer viel versprechender Test ist das molekularzytogenetische Verfahren der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), welches den Nachweis von vermehrt auftretender DNA im Zellkern von Tumorgewebeschnitten mittels fluoreszierender Sonden unter dem Fluoreszenzmikroskop erlaubt. Die FISH-Methode liegt wie die IHC-Methode bereits als kommerzieller Test vor und weist eine hohe Zuverlässigkeit in der Beurteilung von Patientinnen mit vermehrten HER-2-Genkopien auf.

Zwei LightCycler-PCR-Tests für in Paraffin eingebettetes Gewebe wurden entwickelt, die wie FISH die Kopienzahl von HER-2-DNA, aber auch der HER-2-mRNA quantitativ ermitteln. Wenn Tumorzellen durch Mikrodissektion⁵ aus Gewebeschnitten angereichert und für die Untersuchung eingesetzt werden, liefert die DNA-PCR Resultate, die zu 100 % mit jenen der FISH-Technologie übereinstimmen. Erste Ergebnisse wurden kürzlich auf dem 18. European Congress of Pathology in Berlin vorgestellt. Vorteile der kostengünstigen PCR sind einerseits objektive, Instrumenten-basierte Daten, andererseits ein hoher Durchsatz. Dank des Verfahrens der Zweifarbandetektion auf dem LightCycler können in weniger als einer Stunde über 30 PCR-Resultate gleichzeitig ermittelt werden.

Prädiktive Biomarker für ein tumorselektives Medikament

Xeloda® ist ein von Roche entwickeltes oral verabreichtes Fluoropyrimidin, das eine inaktive Vorstufe eines Medikamentes darstellt. Es wird im Verdauungstrakt und in der Leber enzymatisch umgewandelt. Die Umwandlung zum aktiven 5-Fluorouracil (5-FU) erfolgt dann im Tumor durch das Enzym Thymidin-Phosphorylase (TP). Dieses Enzym kommt im Tumorgewebe häufiger vor als in gesundem Gewebe. Abgebaut wird 5-FU durch das Enzym Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD). Das Verhältnis der TP- zur DPD-Expression, d. h. das TP/DPD-Verhältnis, welches in den verschiedenen Tumortypen, aber vor allem in gleichen Tumoren verschiedener Pa-

⁵ Unter Mikrodissektion versteht man die selektive Gewinnung (das Ausschneiden) gut charakterisierter Zellen aus einer Probe.

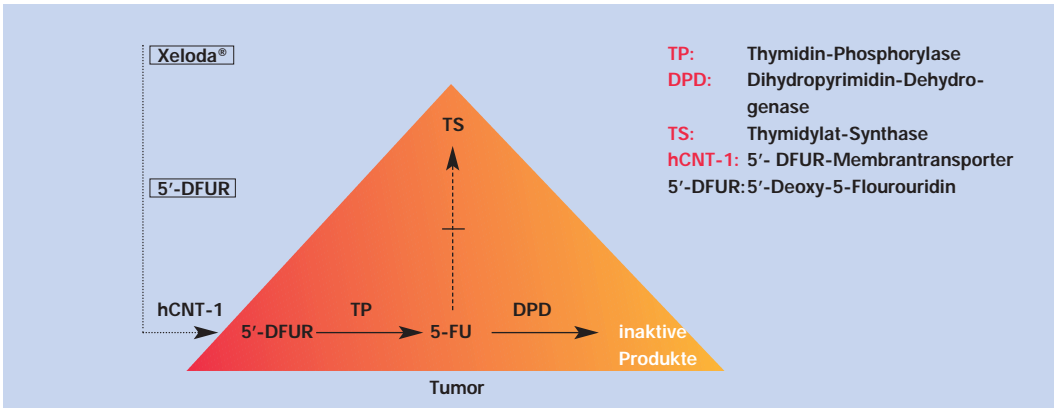


ABBILDUNG 4: Die Enzyme, die im Tumorgewebe mit 5-FU oder seiner aus Xeloda® gebildeten inaktiven Vorstufe 5'-DFUR wechselwirken, können als Biomarker in prädikativen Tests genutzt werden.

tienten stark variiert, bestimmt den Spiegel von 5-FU im Tumor und damit wahrscheinlich die Wirksamkeit von Xeloda® (siehe Abb. 4).

Der Wirkstoff 5-FU hemmt die Thymidylat-Synthase (TS), was eine Verminderung der Zellproliferation und der DNA-Reparatur in Tumorzellen zur Folge hat und somit das Tumorwachstum hemmt.

Eine wichtige Rolle bei der Therapie spielt auch die Bioverfügbarkeit des Medikaments in den Tumorzellen. Kürzlich wurde ein Transportprotein (hCNT-1) beschrieben, welches ein Zwischenprodukt von Xeloda® in die Tumorzellen, nicht aber in die den Tumor umgebenden Stromazellen einschleust.

Die drei Enzyme sowie das Transportprotein im Tumor sind potenzielle diagnostische Kandidaten, um das Ansprechverhalten eines Patienten auf Xeloda® vorherzusagen.

Die drei Enzyme stehen auch im Zentrum der Aufmerksamkeit für die Vorhersage der Wirksamkeit von 5-FU bei einem Patienten, wie in einigen Studien gezeigt werden konnte. Hohe Gen- und Proteinexpression von TP, DPD und TS, die einen definierten Spiegel übersteigt, gilt als Prädiktor für eine Resistenz gegen 5-FU und auch für eine schlechte Überlebensprognose.

Therapieresistenz oder Ansprechen – das ist hier die Frage

Wie diverse präklinische Studien zeigten, hat Xeloda® im Vergleich zu 5-FU ein unterschiedliches Markerprofil, das ein Therapieansprechen vorhersagen lässt. Tumoren mit einem hohen

TP/DPD-Verhältnis sprechen gut auf Xeloda® an, außerdem wahrscheinlich auch solche, mit einer hohen Expression von hCNT-1, welches eine Vorstufe von 5-FU in die Zelle transportiert. Dies scheint unabhängig davon zu sein, ob die TS-Werte im Tumor hoch oder niedrig liegen. Patienten mit 5-FU-Resistenz, die hohe Werte für TP und TS in ihrem Tumorgewebe sowie eine schlechte Prognose aufweisen, sollten daher von Xeloda® immer noch profitieren können.

Roche hat verschiedene Testplattformen zur Analytik der genannten vier Biomarker für die klinische Forschung entwickelt und auf den Markt gebracht. Damit können Informationen über Gen- und Proteinexpression gewonnen werden. Es handelt sich um:

- Enzymimmunoassays (ELISA),
- Antikörper für immunhistochemische Techniken (IHC) und
- PCR-Tests zur Quantifizierung von Boten-RNA.

Gegenwärtig werden die Tests in klinischen Studien auf ihren Wert zur Vorhersage eines Therapieerfolges mit Xeloda® oder anderen Fluoropyrimidinen hin überprüft. Diagnostisches Ziel ist die Validierung von Cut-off-Werten (Grenzwerten) für die Markerexpression, die es erlauben würde, resistente Patienten mit einer hohen Treffsicherheit zu identifizieren. Diese Patienten sollten die Chance erhalten, von alternativen medikamentösen Therapien zu profitieren.

Bestimmung der Genexpression aus Paraffinschnitten

In der klinischen Routine besteht das logistische Problem, an frisches Tumorgewebe für die mRNA-Analyse zu gelangen. Aus Formalin-fixiertem Gewebe konnte bisher nur die Proteinexpression mittels IHC analysiert werden, weshalb dieses Verfahren immer noch als das Standardverfahren in der Pathologie gilt. Aus diesem Grund hat Roche Diagnostics ein neues Testverfahren entwickelt, die PET (*paraffin-embedded tissue*)-PCR, um Boten-RNA reproduzierbar aus in Paraffin eingebettetem Gewebe zu extrahieren und quantitativ zu bestimmen. RNA-Bestimmungen können ein Ersatz für Proteinbestimmungen sein. Man benötigt dazu sehr viel weniger Ausgangsprobenmaterial, weil mittels PCR der Analyt vervielfältigt werden kann. So ist hier z. B. die extrahierte RNA von einem einzigen 5 µm-Schnitt für die Quantifizierung der Genexpression aller drei enzymatischen Biomarker ausreichend.

Gegenwärtig wird an der RNA-Quantifizierung aus definierten Zellpopulationen gearbeitet, die durch Laser-Mikrodissektion aus heterogenem Tumorgewebe isoliert wurden. Dabei wurden bereits Erfolge beim Durchführen einer Multiparameteranalyse von RNA verzeichnet, die aus nur 10^3 Zellen extrahiert wurde. Das Verfahren besitzt das Potenzial, Resultate der Immunhistochemie zu ergänzen und diese in einigen Indikationen sogar zu ersetzen. Es wird gegenwärtig weiter optimiert und automatisiert.

Trends in der Medikamentenentwicklung und Erfordernisse für prädiktive Tests

Für die nahe Zukunft erwarten wir eine Zunahme von Medikamenten, die gezielt auf molekularer Ebene ansetzen. Über 100 verschiedene molekulare Targets⁶ werden derzeit in den weltweiten Pharma-Pipelines untersucht und über 1700 neue Substanzen präklinisch und klinisch getestet. Bei malignen Tumoren existieren rund 400 verwendbare Targets. Man schätzt, dass im Laufe des nächsten Jahrzehnts mehr als 50 tumorspezifische Präparate auf den Markt kommen werden. Daher werden Medikamente auf Grund von molekularen Tumorprofilen und prädiktiven Tests bessere Marktchancen haben, was die Neugestaltungen klinischer Medikamentenstudien erfordern wird. Dieser Trend macht die Zusammenarbeit von pharmazeutischen und diagnostischen Unternehmen mit dem Ziel notwendig, prädiktive Diagnoseverfahren für die einzelnen Therapien zu entwickeln und Medikamente auf der Basis von Testergebnissen zuzulassen, wie dies im Fall von Herceptin® bereits geschehen ist.

Die Geschichte der Chemotherapie bei kolorektalen Karzinomen als Beispiel für Trends in der Tumortherapie

Vor 40 Jahren wurde 5-FU zur Behandlung metastasierender kolorektaler Karzinome eingeführt. Die Überlebensdauer wurde damit im Vergleich zur optimal palliativen Behandlung (*best supportive care*) um vier Monate verbessert.

Seitdem ist nur die Anwendungsform von 5-FU weiter modifiziert worden, so Bolus-Applikation, Infusionssche-

mata mit Folsäure, lokale Verabreichungen bei Lebermetastasen. Eine ständige, jedoch nur kleine Verlängerung der Überlebenszeiten wurde erreicht, die beim metastasierenden Tumor im Schnitt bei 12-16 Monaten liegt. Erst seit Ende der 1990er Jahre sind neue Substanzen verfügbar, die in Kombination mit 5-FU signifikante Verlängerung der Überlebenszeit (4-6 Monate zusätzlich) (Irinotecan®, Oxaliplatin®) oder signifikant verbesserte Verträglichkeit (Xeloda®) brachten. Eine Fülle von weiteren verfügbaren, aber noch zu testenden Substanzen kündigt sich bereits an und lässt weitere Verbesserungen erwarten.

6 siehe S. 22

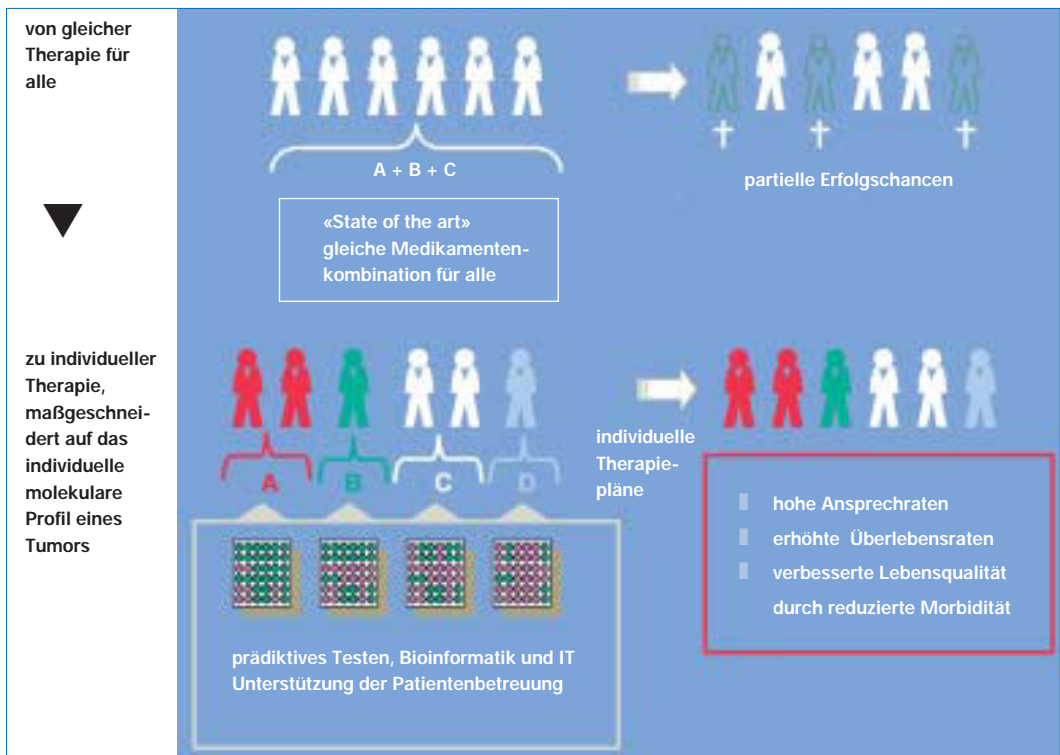


ABBILDUNG 5: Verbesserung der Patientenbehandlung durch prädiktive Diagnostik.

Auch die Gesundheitssysteme und vor allem die Patienten würden davon profitieren. Die heutige Behandlung von Krebspatienten ist gekennzeichnet durch das «Ausprobieren» eines ziemlich einheitlichen Therapieplanes für alle Patienten, was den individuell unterschiedlichen Tumoreigenschaften nicht entspricht. Resistente Tumore wachsen und verbreiten sich bei falscher Therapie schnell weiter und führen zu einem niedrigen durchschnittlichen Überlebensniveau. Viele Patienten verlieren dabei wertvolle Lebenszeit. Eine maßgeschneiderte Therapie basierend auf individuellen molekularen Marker-Expressionsprofilen wird deutlich höhere durchschnittliche Ansprechraten, Überlebensraten sowie eine Verbesserung der Lebensqualität infolge verringerter Morbidität (siehe Abb. 5) bewirken.

Klinische Onkologen benötigen zunehmend Unterstützung durch diagnostische Tests und deren Auswertung mittels Bioinformatik, um das richtige Medikament für den richtigen Patienten auszuwählen.

**Zukunft:
Die integrierte Betreuung
von Krebspatienten**

Je früher ein Tumor erkannt wird, umso besser sind die Chancen eines Patienten, nicht an dem Tumorleiden zu versterben.

Krebsfrühdagnostik durch gezielte Screening-Programme bekannter Risikopopulationen ist daher ein wichtiges Element zur Verminderung des Auftretens von fortgeschrittenen Krebserkrankungen.

Maßgeschneiderte Erst- und Folgebehandlungen, basierend auf diagnostischen Markerprofilen, werden die Wirksamkeit und die Verträglichkeit von Medikamenten deutlich verbessern und sich lebensverlängernd auswirken. In Zukunft werden nicht nur neue spezifische Krebstests zur Verfügung stehen, der behandelnde Arzt wird auch mit Informationspaketen versorgt, die ihn in seinen klinischen Entscheidungen unterstützen, um die Komplexität der Onkologie besser zu bewältigen.

Gute Verlaufskontrollen mit maßgeschneiderten Tests werden die Entwicklung der Resistenz eines Tumors gegen laufende Therapieschemata oder die Neuentwicklung von Tumoren nach scheinbarer Heilung frühzeitig erkennen lassen und die rechtzeitige Auswahl neuer geeigneter Behandlungsverfahren ermöglichen.

Die Verbesserung von Diagnose und Therapie wird zur Heilung von mehr Patienten führen und die Überlebenszeiten verlängern.

**Die Lehrbücher über Krebs werden
neu geschrieben**

Chip-Analysen von Markerprofilen in Tumoren revolutionieren zunehmend unser Verständnis von Krebs.

Eine neue Definition des Begriffes «Krebs» wird erforderlich sein:

- Krebs stellt nach dem Ergebnis von Chip-Analysen eine Sammelbezeichnung für hunderte verschiedener Erkrankungen dar.
- Morphologisch gleich scheinende Tumoren sind auf molekularer Ebene sehr unterschiedlich und bestimmte molekulare Muster korrelieren mit unterschiedlichen Tumoreigenschaften wie Aggressivität oder Therapieresistenz.

- Tumoren gleicher Lokalisation lassen sich danach nicht einheitlich therapieren.

- Die Auswahl individueller Therapieschemata wird künftig von molekularen Tumorprofilen (Markermustern) abhängig sein.

Die Anwendung von Chips zur diagnostischen Markerprofilanalyse im klinischen Alltag ist zwar noch Zukunftsmusik, wird jedoch zwingend notwendig und auch möglich durch bessere und schnellere Verarbeitung der Flut an Markerinformationen und ständige Verbesserungen komplexer diagnostischer Technologien.

Referenten

Roche Media Roundtable

Penzberg

25. September 2001

Prof. Dr. Christoph H. Huber

Johannes Gutenberg-Universität

Direktor der III. Medizinischen Klinik und Poliklinik

Langenbeckstr. 1

D-55101 Mainz

Prof. Dr. Bärbel Porstmann

Integrated Cancer Care Unit (ICCU)

F. Hoffmann-La Roche AG

Diagnostics Division

Bau 52

CH-4070 Basel

Dr. med. Petra Stieber

Leiterin der Forschungsgruppe

«Onkologische Labordiagnostik»

Institut für klinische Chemie

Klinikum der Universität München -Großhadern-

Marchionistr. 15

D-81377 München

Prof. Dr. Dr. Klaus Strein

Leiter Pharmaforschung Penzberg

Roche Diagnostics GmbH

Nonnenwald 2

D-82377 Penzberg

Prof. Dr. Christoph Wagener

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Klinik und Poliklinik für Innere Medizin

Direktor der Abteilung für Klinische Chemie

Martinistr. 52

D-20246 Hamburg