

Balanceakt bei klinischen Studien

Die Proteomforschung verspricht uns selektive Biomarker und hochwirksame Antikörper für die molekulare Medizin. Dass vor allem der therapeutische Ansatz riskant für Patienten und Forscher sein kann, zeigte eine klinische Studie im März 2006.

Am Morgen des 13. März ereignete sich am Londoner Northwick Park Hospital ein schwerer Zwischenfall. Der von der deutschen Firma TeGenero aus Würzburg entwickelte Wirkstoff TGN1412 wurde zum ersten Mal am Menschen erprobt und löste bei sechs gesunden jungen Probanden Nebenwirkungen aus, die innerhalb von Minuten eine intensivmedizinische Betreuung notwendig machten: Nach der Verabreichung der Injektion schwellen Kopf und Nacken gespenstisch an, die Männer wanden sich vor Schmerzen und rissen sich die Kleider vom Leib. Was war geschehen?

Im Rahmen einer klinischen Studie wurde den Versuchspersonen der monoklonale Antikörper gegen das Oberflächeneiweiß CD28 von T-Zellen injiziert. Wenn sich eine Antigen-präsentierende Zelle und eine T-Zelle, die dieses Antigen erkennt, treffen und gleichzeitig das CD28-Molekül über kostimulatorische Moleküle gebunden wird, kommt es zur Aktivierung. Die T-Zelle bildet Tausende identischer Kopien, die sich gegen dieses eine Antigen richten.

Prof. Thomas Hünig, Leiter des Instituts für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg, fand mit seiner Arbeitsgruppe heraus, dass T-Zellen auch durch direkte Bindung des CD28-Moleküls an TGN1412 ohne Vermittlung antigen-präsentierender Zellen aktiviert werden können. Diese Entdeckung galt als bahnbrechend, denn so wurde es möglich, eine zelluläre Abwehrreaktion unabhängig von der Spezifität der T-Zellen auszulösen. Ziel der Gruppe war es, mit dem Wirkstoff bösartige Erkrankungen wie die chronisch lymphatische Leukämie oder Autoimmunkrankheiten wie die rheumatoide Arthritis zu bekämpfen.

Die Substanz wurde von einem jungen Startup-Unternehmen TeGenero in Kooperation mit Boehringer Ingelheim produziert und von der US-Firma Parexel getestet. Wie Dr. Ulrich Kalinke, Leiter der Abteilung Immunologie am Paul-Ehrlich-Institut bestätigt, erhielt die Firma

nach Abschluss der Vorstudien – darunter auch mit hohen Dosen an Primaten – die Genehmigung für die klinische Prüfung in Phase 1. „Nichts wies darauf hin, dass die Substanz so katastrophale Folgen haben würde“, sagte Thomas Hünig am Tag nach dem Unfall in Presseinterviews. Und Dr. Thomas Hanke, Chef von TeGenero, schrieb auf der Website des schwer betroffenen Northwick Park Hospitals: „Untersuchungen müssen diese schockierenden Ereignisse so schnell wie möglich aufklären... Unsere Gedanken sind bei den Patienten und ihren Familien.“

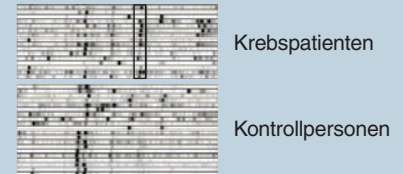
Für die jungen Männer ging die Geschichte glimpflich aus; sie sind inzwischen alle wieder wohlbehalten zuhause. Der jungen Firma TeGenero versetzte TGN1412 aber den Todesstoß. Am 4. Juli gab der Vorstand die Eröffnung des Insolvenzverfahrens bekannt.

Wörtlich heißt es: „Die Ereignisse der TGN1412-HV Phase 1 Studie waren für unsere Gesellschaft... unfassbar. Die Untersuchungsergebnisse der englischen und deutschen Zulassungsbehörden, MHRA und Paul-Ehrlich-Institut, haben bestätigt, dass TeGenero keine Mängel vorgeworfen werden können... Diese Tatsachen stellen die Industrie, die sich mit der Entwicklung von hochwirksamen Medikamenten beschäftigt, vor eine erhebliche Herausforderung. Für TeGenero ist es sehr bedauerlich, dass wir nicht mehr im bisherigen Umfang zur Lösungsfindung beitragen können.“

Die Erforschung und Entwicklung neuer Antikörper gegen Zielmoleküle im Körper von Patienten müsse jedoch unabhängig von solchen Ereignissen voranschreiten, meint Kalinke. Obwohl manche Forscher nun der Meinung seien, dass superagonistische Antikörper wie TGN1412 keine Zukunft mehr haben, werde die Kostimulation eine wichtige Aufgabe der Proteomik bleiben. In einer großen Zeitschrift (Nature Biotechnology 24, 493-6, 2006) publizierte er mit Kollegen des Paul-Ehrlich-Instituts für die Erprobung solcher hochriskanten Wirkstoffe Kriterien, die zur Zeit in Fachkreisen diskutiert werden.

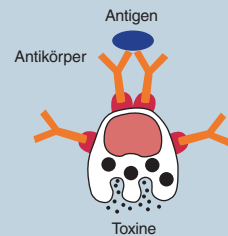
Unter anderem soll künftig eine derartige Substanz nur an einem einzigen Probanden getestet werden, ehe die eigentliche Prüfung beginnt. Die Frage ist, wer dieser eine sein möchte. ■

gh



Mit Hilfe von Proteomik-Techniken kann man in einer Patientenprobe Hunderte bis Tausende von Proteinen nachweisen. Das Bild zeigt Ausschnitte aus Massenspektrogrammen von 16 Krebspatienten (oben) und 20 Kontrollpersonen (unten). Der eingekrehte Bereich markiert ein Protein, das möglicherweise charakteristisch für diesen Krebs ist und als diagnostisches oder therapeutisches Zielmolekül in Frage kommt.

Quelle: www.imo-hoffmann.org



Antikörper sind die wichtigsten therapeutischen Werkzeuge der klinischen Proteomik. Sie binden spezifisch an bestimmte Zielmoleküle (Antigene) und lösen dabei Abwehrreaktionen aus, z.B. die Ausschüttung von Toxinen aus Blutzellen. Dabei liegen erwünschte Wirkungen und schwere Komplikationen oft nahe beieinander.



Am Northwick Park Hospital im Nordwesten Londons wurde eine unerwartete Reaktion von T-Zellen auf einen therapeutischen Antikörper für sechs junge Männer zum Alptraum. Das Medikament der Würzburger Firma TeGenero löste in einer klinischen Studie schwerste Symptome aus. Der Zwischenfall rief der Weltöffentlichkeit das Risiko innovativer Therapien für die Probanden wie auch die Entwickler überdeutlich in Erinnerung.

Diabeteskontrolle

Antikörper beflügeln Blutzuckergedächtnis

Erblindung, Herzinfarkt, Amputation, Nierenversagen: Spätfolgen einer Diabeteserkrankung können schwerwiegend sein. Nur ein relativ stabil eingestellter Blutzuckerspiegel kann davor schützen. Die Momentaufnahmen der täglichen Blutzuckermessung reichen dazu nicht aus. Deshalb hat sich das „Blutzuckergedächtnis“ HbA1c zum Laborwert der Wahl für die Langzeitkontrolle entwickelt – mit kontinuierlich steigender Nachfrage, die zu bewältigen selbst für große Labors eine echte Herausforderung bedeutet.

1969 hatten Forscher im Blut von Diabetikern eine bis dahin unbekannt Hämoglobinvariante entdeckt – eine ver-zuckerte Form des roten Blutfarbstoffs, das den Namen HbA1c erhielt. Wenige Jahre später stand fest, dass die Konzentration dieses glycosylierten Hämoglobins (Hb) im Blut von Diabetikern umso mehr sank, je besser ihr Blutzucker unter Kontrolle kam. Darauf aufbauend hat sich, untermauert durch große klinische Studien der neunziger Jahre (DCCT und UKPDS), die Messung des Anteils von glycosyliertem Hämoglobin als Standard der Diabetologie etabliert, dessen Messung in vierteljährlichem Rhythmus alle Fachgesellschaften empfehlen. In unserem Hauptlabor für Klinische Chemie in München sind die Anforderungen für Bestimmungen des HbA1c-Wertes während der vergangenen Jahre um jeweils mindestens zehn Prozent gestiegen. An jedem Tag bearbeiten wir zwischen 800 und 1000 HbA1c Proben.

Hämoglobin besteht aus zwei α - und zwei β - Proteinketten. Hohe Blutzucker-konzentrationen führen zu einer spontanen, nicht enzymatischen Glucosylierung der Amino-Enden seiner beiden β -Ketten. In einem zweiten Schritt entsteht daraus ein irreversibel glycosyliertes Protein, das HbA1c. Da die Lebensdauer der roten Blutkörperchen rund 120 Tage beträgt, spiegelt der Anteil von glycosyliertem zu nicht-glycosyliertem Hämoglobin die Glucosekonzentration über einen Zeitraum von vier Monaten wider – und gibt damit wertvollen Aufschluss über die Langzeiteinstellung eines Diabetikers. Ein HbA1c-Wert von weniger als 6,5 Prozent dokumentiert nach den Richtlinien der Europäischen Fachgesellschaften eine gute Therapieeinstellung.



Der COBAS INTEGRA® 800 HbA1c Analyzer lässt sich leicht in den Hämatologiearbeitsplatz integrieren.

Die Messung des HbA1c-Wertes erfolgte zunächst vor allem über elektrophoretische und chromatographische Verfahren, in denen die verschiedenen Hämoglobinfraktionen qualitativ aufgetrennt und im nächsten Schritt einer quantitativen Analyse zugänglich gemacht wurden. Die Entwicklung hochleistungsfähiger Chromatographieverfahren (HPLC) rückte diese bald in den Mittelpunkt vieler Proteinanalysen. Für die Bestimmung des glycosylierten Hämoglobins wurden HPLC-Verfahren viele Jahre lang sogar als Goldstandard akzeptiert. Auch wir haben in unserem Münchener Labor bis zu Beginn dieses Jahres die hochleistungsfähigen Chromatographieverfahren zur HbA1c-Bestimmung bevorzugt. Dass wir dies inzwischen nicht mehr tun, hängt vor allem damit zusammen, dass ihre Leistungsfähigkeit der sprunghaft steigenden Nachfrage nach HbA1c-Bestimmungen nicht mehr ausreichend gerecht wird.

Mehr als maximal 50 Proben pro Stunde können selbst die besten HPLC-Geräte nicht durchsetzen. Große Labors müssen somit stets mehrere Geräte parallel betreiben. Das ist an sich schon ein Mehraufwand – wird aber besonders dadurch kompliziert, dass wir beim Betrieb mehrerer Geräte überprüfen und sicherstellen müssen, dass deren Messergebnisse miteinander vergleichbar sind. Genau darin liegt aber ein prinzipielles Problem der HbA1c-Bestimmung mittels HPLC. Je nach dem verwendeten chromatographischen System ergeben sich manchmal verschiedene HbA1c-Werte für die gleiche

Probe, abhängig von der Beschaffenheit der Austauschharze, der Zusammensetzung der Pufferlösungen oder der Auswaschzeiten, die sich nur schwer standardisieren lassen. Ein Vergleich der HbA1c-Ergebnisse in drei großen Diabetesstudien der neunziger Jahre zeigte eine rund 20-prozentige Differenz der ermittelten Werte am Cut-off-Level. Deshalb ist es nicht verwunderlich, dass wir auch in unserem Labor feststellen mussten, dass die Wertelage zwischen den verwendeten HPLC-Systemen zuweilen variiert.

Diese Ungenauigkeit liegt auch daran, dass der Peak im Chromatogramm, den man für den Indikator der HbA1c-Konzentration hält, auch andere Substanzen enthalten kann. Diese sind zwar zeitgleich mit den HbA1c-Fragmenten aus der Chromatographiesäule ausgetreten, aber von ganz anderer Art. Das wurde bei der Ausarbeitung einer international verbindlichen Referenzmethode durch die International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) nachgewiesen – und zwar mit immunologischen Methoden, bei denen mit Antikörpern hochspezifisch geprüft werden kann, ob es sich bei einem Eluat um HbA1c-Fragmente oder um andere Proteinanteile handelt. Sollte man dann nicht besser gleich immunologische Methoden zur hochspezifischen HbA1c-Bestimmung anwenden? Als Roche Diagnostics Anfang dieses Jahres seinen immunologischen HbA1c Test der zweiten Generation für den COBAS INTEGRA® 800 auf den Markt brachte (Tina-quant (a) Hemoglobin A1c Gen.2), entschlossen wir uns zu einer sorgfältiger Prüfung.

Präzision von Tag zu Tag:	
Mittelwert	VK
5,7%	0,5%
10,5%	0,95%

In einer großen Anzahl von Vergleichsmessungen fanden wir bei hoher Testpräzision eine sehr gute Korrelation zur bisher verwendeten HPLC-Methode (siehe Abb. 2), um aus der Frage eine Entscheidung zu machen. Seit zwei Monaten arbeiten wir unsere HbA1c-Anforderungen nun mit dem COBAS INTEGRA® 800 HbA1c Analyzer ab. Der größte Vorteil ist seine Schnelligkeit und Kapazität. Selbst im Routinebetrieb setzen wir mit dem neuen Test auf diesem System 180 Proben pro Stunde durch, im ununterbrochenen Be-

trieb sind theoretisch sogar 200 Proben pro Stunde möglich. Das wird vor allem durch die Twin-Applikation ermöglicht, die Hb und HbA1c in einer Küvette misst. Darüber hinaus kann der Tina-quant HbA1c Gen.2 Vollblut ohne externe Hämolyse verarbeiten. Seine eindeutige Spezifität erreicht der Test durch polyklonale Anti-

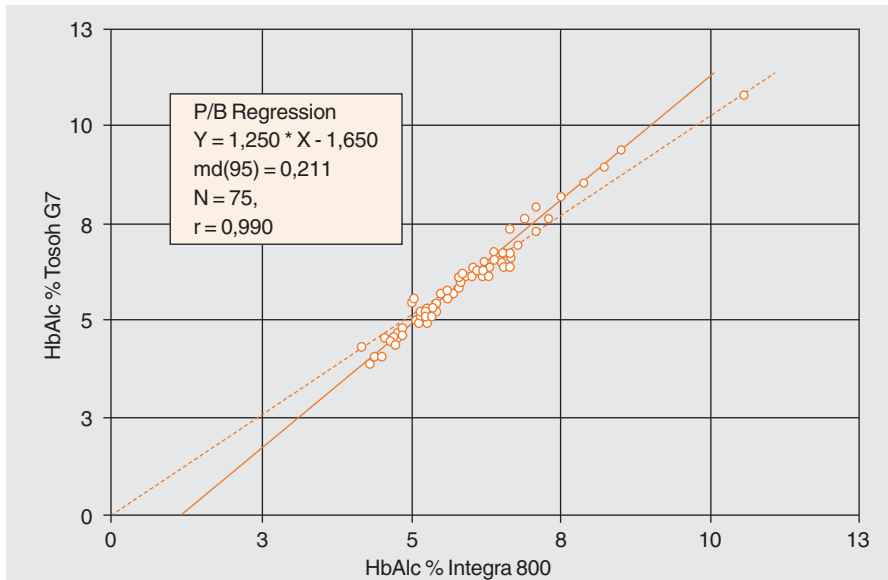
körper, die nur an die β -aminoterminalen Fragmente des HbA1c binden. Deshalb kann er auch die HbA1c-Konzentration von Diabetespatienten korrekt bestimmen, die an Hämoglobinopathien oder einer Urämie leiden. Auch chemisch veränderte Hämoglobine, seien sie acetyliert oder carbamylt, stören die Genauigkeit des Tes-

tes nicht. Der Antigen-Antikörper-Komplex wird im Tina-quant (a) Hemoglobin A1c Gen.2 Test turbidimetrisch bestimmt. Neben der bisher üblichen DCCT/NGSP-Standardisierung ist der Test als einer der wenigen bereits nach IFCC standardisiert. Falls die ADA/EASD/IDF-Arbeitsgruppe die geplante Änderung durchsetzt, können problemlos die Werte gemäß IFCC angegeben werden.

Die Verwendung von Einmalküvetten am COBAS INTEGRA® 800 HbA1c Analyzer schließt eventuelle Probleme durch die Verschleppung von Küvette zu Küvette aus. Zudem ermöglicht das Cap Piercing der verschlossenen Probengefäße eine leichte Integrierbarkeit des Testes in den Hämatologiearbeitsplatz.

Unsere bisherigen Erfahrungen haben unsere Erwartungen an die immunologische Methode zur Bestimmung von HbA1c voll erfüllt. Mit dem COBAS INTEGRA® 800 HbA1c Analyzer haben wir in unserem Labor jetzt ein Gerät stehen, mit dem wir alle Proben bis spätestens 20 Uhr abgearbeitet haben. Früher waren wir mit drei HPLC-Geräten vor 22 Uhr nicht fertig. ■

Thomas Kiessling
Leiter des Hauptlabors im
MVZ Dr. Tiller & Kollegen
in München



Der Methodenvergleich zeigt eine hohe Korrelation zwischen dem neuen immunologischen HbA1c Test und der bisher eingesetzten HPLC-Methode.

DGKL-Preis „Biochemische Analytik“ 2006

Ehrung für einen Pionier der Proteomik-Forschung



Der Preisträger Prof. Dr. Mann

Die Deutsche Vereinte Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin e.V. (DGKL) ist Stifter des Preises „Biochemische Analytik“ - einer der wohl

renommiertesten Wissenschaftspreise in Europa. Sie verleiht ihn für außergewöhnliche Leistungen auf den Gebieten biochemische und molekulare Analytik, Klinische Chemie und molekulare Medizin. Seit seiner erstmaligen Vergabe im Jahr 1970 ging der Preis an 28 Wissenschaftler und Wissenschaftlerinnen, von denen fünf später mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurden – ein Indiz für die Treffsicherheit des DGKL-Gutachtergremiums.

Die Preisvergabe 2006 fand am Sonntag, den 25. Juni auf dem Staudinger Symposium in Kloster Banz statt. Geehrt wurde der deutsche Wissenschaftler Prof. Dr. Matthias Mann für seine Verdienste um Entwicklung und Anwendung der Massenspektrometrie in der Analytik von Proteinen aus komplexen Proben. Professor Mann ist z.Zt. Direktor am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried und leitet die Abteilung für

Proteomik und Signaltransduktion. Er leistete u.a. maßgebliche Beiträge zur Elektrospray-Technologie bei Prof. J.B. Fenn, dem dafür 2002 der Nobelpreis für Chemie verliehen wurde.

Prof. Mann erkannte aber auch die besondere Bedeutung der Bioinformatik und entwickelte wesentliche Algorithmen für die Proteinsequenzierung, die die Basis für Hochdurchsatzidentifizierungen von Proteinen legten. Weitere Leistungen betrafen das „protein correlation profiling“ zur Charakterisierung des Zentrosoms und anderer wichtiger Proteinkomplexe der Zelle. Aus diesen Gründen gilt Professor Mann heute als einer der weltweit führenden Experten in der Proteomanalyse. ■

Prof. Dr. K. Lackner
Universität Mainz
Vizepräsident der DGKL

Ein neues Institut stellt sich vor

Im Jahr 2005 gründete Prof. Torsten Haferlach in Sichtweite seiner vorherigen Wirkungsstätte - des Universitätsklinikums Großhadern - das Münchner Leukämie Labor MLL. Neben der Routinediagnostik ist es maßgeblich an der Entwicklung neuer Methoden auf dem Gebiet der Genexpressions-Arrays beteiligt.

Auf kaum einem anderen Gebiet der Medizin führten die molekularbiologischen Methoden in den vergangenen ein bis zwei Jahrzehnten zu solcher Aufbruchstimmung und bemerkenswerten Erfolgen wie in der Hämatologie und Onkologie. Die Entschlüsselung der zellulären Regelmechanismen auf Gen- und Proteinebene hat das Verständnis der Krebsentstehung und die immer präzisere Unterteilung und Diagnostik von Krankheiten erheblich gefördert.

Besonders deutlich wird dies auf dem Gebiet der Leukämien. Wo früher gerade einmal vier Krankheiten zu unterscheiden waren – ALL, AML, CLL und CML – gibt es heute ein immer umfangreicher werdendes System von Subgruppen, die sich mit modernen Methoden differenzieren lassen. Diese verfeinerte Diagnostik ist nicht „l'art pour l'art“. Vielmehr liefert die Auffächerung der Leukämien wichtige prognostische Informationen und steuert die zunehmend differenziertere und spezifischere Therapie.

Zu den diagnostischen Standard-Verfahren gehören nicht mehr nur Morphologie und Zytogenetik, sondern auch molekularbiologische Methoden wie die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), Phänotypisierung mittels Flowzytometrie, PCR und Real-Time-PCR sowie die DNA-Sequenzierung. Im Münchner Leukämie Labor sind alle diese Verfahren etabliert und werden routinemäßig angewendet.

Bekannte Namen stehen hinter den einzelnen Bereichen: Für die Zytomorphologie zeichnet Torsten Haferlach verantwortlich, für die Immunphänotypisierung Wolfgang Kern, für Molekulargenetik Susanne Schnittger und für Zytogenetik und FISH Claudia Schoch. Diese Fachleute, die international angesehene Forschung betreiben, gewährleisten, dass die verwendeten Methoden auch in der Routinediagnostik immer dem neuesten Stand entsprechen und aus einer

Molekularbiologische Methoden und Fluoreszenztechniken gehören heute zum Rüstzeug jedes Leukämielabors. Selbst in Prof. Haferlachs neuem Büro steht ein Mikroskop auf dem Schreibtisch.



Hand angeboten werden können. Eine leistungsfähige Datenbank stellt sämtliche Befunde zu einem Patienten für die rasche und konsequente Stufendiagnostik in Echtzeit zur Verfügung.

Methoden der Zukunft

Das MLL beteiligt sich auch selbst an der Weiterentwicklung der hämatologisch-diagnostischen Methodik. Es ist gerade dabei, so Haferlach, im Bereich der Leukämien „die Grenze zwischen sehr ausgeklügelter und ineinander greifender Standarddiagnostik und dem Einsatz von Genexpressions-Chips für die Routinediagnostik zu überschreiten“. Mikroarray-basierte Genexpressionsanalysen zählen zu den innovativen Techniken in der Krebsdiagnostik und dürften die Zukunft der onkologisch-hämatologischen Diagnostik wesentlich mitprägen.

Das MLL ist im Rahmen des European Leukemia Networks (ELN) an einer weltweiten Studie beteiligt, in der in Zusammenarbeit mit Roche Molecular Systems bisher etwa 2000 Proben von Leukämiepatienten aus Europa, Asien und den USA mit einem 38.000-Gen-Array und parallel natürlich mit den konventionellen Standardmethoden untersucht wurden. Diese erste Phase ist abgeschlossen; die Ergebnisse stellte Haferlach kürzlich beim ASCO-Kongress in Atlanta vor. In

der nächsten Stufe sollen einige Hundert der in dieser ersten Phase als relevant befundenen Gene für einen Routine-Chip ausgewählt werden, der dann wiederum mit 2000 Proben prospektiv und komplett verblindet validiert wird. Der hohe Stellenwert der Genexpressions-Arrays im Rahmen der facettenreichen Standarddiagnostik bei Leukämien wird laut Haferlach in den nächsten fünf Jahren mehr als offensichtlich werden. ■

jg

Für weitere Informationen:
 Prof. Dr. Dr. Torsten Haferlach
 MLL Münchner Leukämielabor
 Max-Lebsche-Platz 31
 81377 München
 Tel.: 089-990 17 0
www.mll-online.com

Das Institut in Zahlen

Im Münchner Leukämie Labor MLL werden pro Jahr ca. 38.000 Analysen durchgeführt. Zur Zeit arbeiten vier Wissenschaftler und 27 medizinisch-technische Assistentinnen auf einer Gesamtfläche (Büro und Labor) von ca. 1200 Quadratmetern. Das Institut bündelt über 90 Jahre Erfahrung von Wissenschaftlern und 130 Jahre MTA-Erfahrung. Die Einstellung von vier weiteren Mitarbeitern und der Ausbau auf 1700 Quadratmetern stehen kurz bevor.

jg