



# **ANSELMUS COLLOQUIUM**

---

REIS DOOR HET LICHAAM

drug targeting

Samenstellers

KH Hoogendoorn en EMG van Bommel

### **Anselmus**

is de eerste apotheker in de Nederlanden wiens naam op schrift gevonden is. Hij kreeg in 1276 een werkruimte aangeboden van de toenmalige elect (een niet-gewijde bisschop) van Utrecht.

Bron: P van der Wielen. Pharm Weekbl 71: 715-718 (1934).

### **De Stichting Organisatie Anselmus Colloquium**

stelt zich tot doel het jaarlijks organiseren van een themadag over een farmaceutisch-technologisch onderwerp en dit te belichten vanuit een therapeutische invalshoek.

### **Het organisatiecomité voor de themadagen bestaat uit:**

dr EMG van Bommel	OctoPlus Development bv
dr G Borchard	Universiteit Leiden
dr EJ van Hoogdalem	RW Johnson Pharmaceutical Research Institute
drs KH Hoogendoorn	OctoPlus Development bv
drs AMI van Paassen	Centocor BV
dr JJ Tukker	

### **Reis door het lichaam**

Drug targeting

Samenstellers: KH Hogendoorn en EMG van Bommel

Houten: Stichting Organisatie Anselmus Colloquium (2003)

Met lit. opg.

ISBN 90-73520-15-0

Niets uit deze uitgave mag worden overgenomen op welke wijze dan ook, zonder voorafgaande toestemming van de auteursrechthouder.

Houten, oktober 2003

Hoewel bij het samenstellen van deze proceedings de uiterste zorgvuldigheid is betracht, kan de Stichting Organisatie Anselmus Colloquium geen aansprakelijkheid aanvaarden voor eventuele schade die zou kunnen voortvloeien uit enige drukfout of andere onjuistheid die in deze uitgave kan voorkomen.

# INHOUDSOPGAVE

DRUG TARGETING: EEN INLEIDING <b>prof. dr G Storm</b>	5
EYE OPENER: TARGETING NAAR HET OOG <b>dr J van Meurs</b>	17
DE HERSENEN ALS DE ULTIEME TARGET <b>dr AG de Boer en dr PJ Gaillard</b>	25
ENDOTHEELCELSPECIFIEKE DRUG TARGETING VOOR DE BEHANDELING VAN CHRONISCHE ONTSTEKINGSZIEKTEN <b>dr G Molema</b>	41
TUMORTARGETING: DROOM OF WERKELIJKHEID <b>dr O Boerman</b>	53
HET EINDDOEL: IN DE CEL <b>dr C d'Oliveira</b>	63



Gert Storm studeerde biologie aan de Universiteit Utrecht (1983). Hij promoveerde in 1987 aan de faculteit Farmacie met het proefschrift: 'Liposomes as delivery system for doxorubicin in cancer therapy'. In datzelfde jaar werd hij aangesteld als onderzoeker bij deze faculteit. Zijn onderzoeksinteresse ligt op het gebied van biofarmacie en drug targeting. Van september 1988 tot juni 1989 was hij wetenschappelijk medewerker bij Liposome Technology Inc. in Menlo Park, USA, en assistant professor aan de School of Pharmacy, Dept. of Pharmaceutics, Univ. of California, San Francisco, USA. Terug in Nederland werd hij senior onderzoeksmedewerker bij Pharma Bio-Research Consultancy B.V. in Zuidlaren. Hier waren zijn werkzaamheden gericht op ontwerp, coördinatie en evaluatie van klinisch-farmacologische studies. In september 1991 werd hij aangesteld aan de faculteit Farmacie te Utrecht als onderzoeksmedewerker. Hij is (co)auteur van meer dan 180 wetenschappelijke publicaties op het gebied van drug delivery/drug targeting (en met name liposomale systemen). Gert Storm is editor van diverse wetenschappelijke boeken en organisator van congressen op het gebied van *advanced drug delivery*. He is lid van de editorial (advisory) board van de *J of Drug Targeting*, *J of Liposome Research*, *Eur J Pharm Sciences*, *S.T.P. Pharma Sciences*, and *Pharm Research*. Daarnaast is hij adviseur voor een aantal farmaceutische bedrijven. In 1999 werd Gert Storm benoemd tot adjunct professor aan de Royal School of Pharmacy, Copenhagen (Department of Pharmaceutics). In 2000 werd hij benoemd tot hoogleraar Drug Targeting aan de Universiteit Utrecht.

contact: [g.storm@pharm.uu.nl](mailto:g.storm@pharm.uu.nl)

## G Storm

Het zal niet lang meer duren of de vorige eeuw, nog maar net verstreken, zal synoniem worden voor 'gedateerd'. Dat geldt met name voor geneesmiddelen. De 20ste eeuw heeft praktisch alle huidige (synthetische) geneesmiddelen voortgebracht. Er is echter, door het in kaart brengen van het menselijke genoom, een ware revolutie in de geneesmiddelenontwikkeling op komst. Analisten spreken van 'gouden kansen' voor de farmaceutische industrie. De verwachtingen binnen de farmaceutische wetenschappen zijn hoog gespannen. Nationaal en internationaal wordt geïnvesteerd in *genomics* en *proteomics* onderzoek, termen die staan voor een scala aan onderzoeksvragen en technieken, die erop gericht zijn de functies van genen en eiwitten te doorgronden. Met de beschikbaar komende kennis is de weg geopend voor het zoeken naar genen die bijdragen aan het ontstaan van ziekten. Tevens kan die kennis benut worden voor het vinden van verbindingen die als basis dienen voor het ontwerpen van nieuwe geneeskrachtige stoffen. Het enthousiasme over deze ontwikkeling van een nieuwe generatie geneesmiddelen is groot, zowel in de medische wereld als daarbuiten.

Toch is bij al dit enthousiasme reden voor bezorgdheid. Het is te verwachten dat veel van de nieuw ontwikkelde moleculen ongunstige eigenschappen zullen bezitten, en dat daardoor verhinderd wordt dat de toegediende moleculen in voldoende mate de juiste plek in het lichaam bereiken. En als die juiste plek in het lichaam, de plek van werking, niet of onvoldoende wordt bereikt, dan komt er uiteraard van het gewenste therapeutische effect niets terecht. Deze sombere inschatting leidt tot het hart van het onderwerp van dit Anselmus Colloquium: drug targeting (DT). Ook hier geldt overigens: 'Maak je geen zorgen om de dag van morgen, want de dag van vandaag heeft genoeg aan zijn eigen kwaad.' Ook heel wat van de momenteel beschikbare farmaca zouden veel baat kunnen vinden bij toediening via een geschikte DT-formulering.

Onder DT wordt verstaan het specifiek afleveren van een geneeskrachtige stof op de juiste tijd en plaats waar het zijn gewenste biologische activiteit moet ontplooiën. Deze inleidende bijdrage wil aangeven hoe het DT-vakgebied kan bijdragen aan de ontwikkeling van geneesmiddelen met superieure therapeutische eigenschappen. Eerst zal in grote lijnen worden geschetst wat DT is en wat de basisprincipes zijn. Daarna vangt de reis aan: een reis door het boeiende landschap van het DT-vakgebied met als doel dat er zich een beeld gevormd kan worden van de stand van zaken. Een goede reis gewenst!

## PLAATSBEPALING

Het hele industriële traject van ontdekking van een farmacon tot het op de markt brengen van het geneesmiddel is zeer tijdrovend (gemiddelde duur 8 – 12 jaar) en tevens zeer kostbaar (kosten gemiddeld zo'n 0.5 miljard €). Een belangrijke fase binnen dit hele ontwikkelingstraject is de *drug delivery* fase: de fase waarin het farmacon wordt verpakt, geformuleerd in een toedieningsvorm, zodanig dat het in de patiënt het gewenste effect geeft. *Drug delivery* reikt verder dan puur het formuleringsproces van een farmacon in een toedieningsvorm. Het resultaat van dit proces, het geneesmiddel, dient tevens een biologisch, een therapeutisch effect te geven. Daartoe moeten de meeste farmaca eerst in het bloed worden opgenomen en daarna gedurende een bepaalde *tijd* op een bepaalde *plaats* in het lichaam aanwezig zijn. Zonder de juiste toedieningsvorm (en -route) zal het vaak gebeuren dat het farmacon te snel wordt afgebroken of het lichaam te vroeg of te laat verlaat. Toedieningsvormen dienen dat te voorkomen en er juist voor te zorgen dat verblijftijd en plaats van aanwezigheid beter worden gerealiseerd.

Tot ongeveer 1968 werd er maar weinig structureel onderzoek naar drug delivery aspecten gedaan. Het weinige onderzoek vond plaats binnen academische groepen en zeer beperkt binnen de gevestigde farmaceutische industrie. De start van het bedrijf Alza in 1968 markeerde een verandering: langzaam komt er meer industriële belangstelling voor *drug delivery*, voor systemen bedoeld voor verbetering van de toediening van farmaca via de mond, via inhalatie, via de huid of per injectie. Inmiddels is bij de farmaceutische industrie het besef doorgedrongen dat de 'easy-to-deliver-drugs' reeds zijn uitgevonden en dat de farmaca van morgen gecompliceerder zullen zijn en meer eisen aan hun toedieningsvorm zullen stellen. Dit besef is bijvoorbeeld zichtbaar in de recente totstandkoming van diverse samenwerkingverbanden tussen farmaceutische bedrijven en universitaire onderzoekscentra, zogeheten strategische allianties, zoals bijvoorbeeld die tussen het farmaceutische concern Yamanouchi en het 8 jaar geleden opgerichte formuleringsbedrijf OctoPlus met de Faculteit Farmacie van de Universiteit Utrecht.

## HET VAKGEBIED *DRUG TARGETING*: BEZORGD OM BEZORGEN

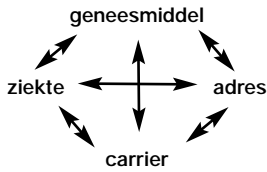
Wat is nu precies *drug targeting* (DT)? Deze vraag heeft alles te maken met het 'adres' van de geneeskrachtige stof, het farmacon, in het lichaam. Dit adres, de plaats van werking (in vaktermen *target site* genoemd), zal zich meestal bevinden op of in de zieke cellen in het orgaan dat om behandeling vraagt. In de *target site* aangekomen, dient het farmacon in ieder geval 'in de postbus' te komen van de zieke cellen. De exacte locatie in de zieke cel, waar de aanlevering van het farmacon plaats moet vinden, kan sterk verschillen: het farmacon werkt wellicht via aangrijpingsstructuren (receptoren) op de celmembraan (bijv. insuline), echter een toenemend aantal farmaca, met name de producten van de nieuwe ('genetische') revolutie, zullen in de cel moeten komen om hun intracellulaire *target site* te bereiken. Maar ook de intracellulaire adressen kunnen sterk verschillen, afhanke-

lijk van wat het farmacon moet doen. Moet het farmacon de activiteit van eiwit-systemen in het cytosol remmen, of moet er transcriptie van DNA in de celkern plaatsvinden, zoals bij de nieuwe genterapeutica? In het eerste geval dient het farmacon in het cytoplasma van de cel te arriveren, in het tweede geval is dat in de celkern. Helaas gaat het bereiken van al die adressen meestal niet vanzelf. Er zijn goede 'postbodes' nodig: DT-toedieningsvormen.

Maar eerst nog even de vraag: waarom is *drug targeting* nodig? Waarom zijn er problemen met de bezorging van het farmacon op het juiste adres? Dat ligt niet alleen aan het farmacon maar in de eerste plaats ook aan de patiënt. Het lichaam is anatomisch gezien niet één groot vat, één groot compartiment, waarin moleculen vrijuit van de ene kant naar de andere kant kunnen bewegen en vice versa, maar het lichaam is juist in hoge mate gecompartmentaliseerd om dat te voorkomen. Deze opbouw van het lichaam in compartimenten dient mede om zoveel mogelijk vreemde indringers - pathogenen, zoals bacteriën, en ook farmaca - buiten te houden of, indien ze toch binnendringen, te elimineren. Tal van anatomische en fysiologische barrières zijn aanwezig om dit te realiseren. Organen zijn bekleed met epitheel, bloedvaten met endotheel, cellen met een plasmamembraan, celorganellen kennen ook afgrenzende membraanstructuren: allemaal cellagen en membranen die passagebarrières zijn voor farmaca op weg naar het juiste doel. Fysiologisch gezien zal het lichaam zijn best doen om toegediende farmaca zo snel mogelijk te elimineren, door ze te inactiveren via metabole processen en uit te scheiden via lever en nieren. Tot zover de problematische patiënt.

Maar nu ook de noodzaak van DT bezien van de kant van het *farmacon*: ook een 'enfant terrible'. Het is helaas vaak zo dat farmaca moleculaire eigenschappen hebben die het bezorgingsproces sterk bemoeilijken zo niet onmogelijk maken. Grofweg kan gesteld worden dat membraanpassage van farmaca lastiger wordt als de grootte, wateroplosbaarheid en het geladen karakter van het farmacon toeneemt. Voor een toenemend aantal farmaca is dat het geval, met name voor nieuwe generaties moleculen als peptiden, eiwitten, en nucleotiden zoals DNA. Dergelijke moleculen zijn moeilijker te bezorgen dan de 'klassieke' moleculen. Toediening per injectie zal vaak de enige optie zijn.

Veel farmaca verspreiden zich na toediening snel over het gehele lichaam en bereiken veel gezonde organen en weefsels, maar concentreren zich nauwelijks op de *target site*. Dit ongunstige gedrag maakt het noodzakelijk dat de dosis omhoog moet om de gewenste therapeutische werking te verkrijgen. Dat is niet alleen een geweldige verspilling, het is met name ook een belangrijke oorzaak van allerlei bijwerkingen, soms zelfs ernstige, levensbedreigende bijwerkingen, zoals bijvoorbeeld als cytostatica gebruikt worden voor de chemotherapeutisch behandeling van kankerpatiënten. De uitdaging is dan ook de lotgevallen van farmaca in het lichaam zodanig te manipuleren dat een verbetering wordt verkregen van de balans tussen werkzaamheid en bijwerkingen, tussen therapeutische en toxische doses. Om dit te bereiken worden DT-toedieningsvormen, DT-systemen, ontwikkeld.

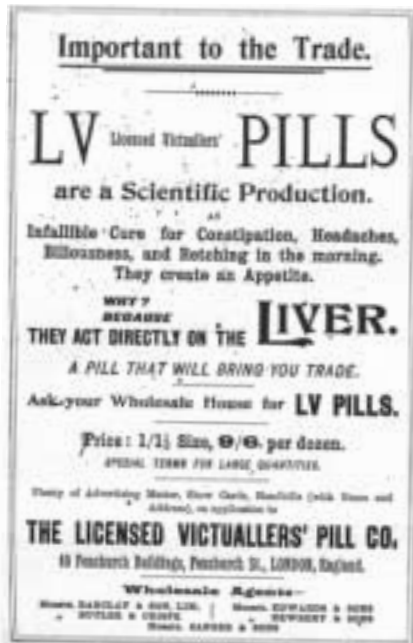


figuur 1. Relatie tussen de verschillende aspecten van *drug delivery*.

Centraal in het DT-veld staat het *carrier*concept: om het farmacon op de plaats van bestemming te krijgen, wordt het aan een dragersysteem, een *carrier*, gekoppeld. Het zo verkregen *drug-carrier* complex dient zodanig uitgerust te zijn, dat het farmacon in het ziektegebied in een effectieve concentratie kan lokaliseren en dat ophoping in andere organen zoveel mogelijk wordt vermeden.

Het zal duidelijk zijn dat het *drug targeting* concept alleen zinvol is voor farmaca die een geringe effectiviteit vertonen, omdat ze van nature slecht hun *target site* bereiken of sterke bijwerkingen veroorzaken. Daarom is DT het hardst nodig bij farmaca die ingezet worden bij de behandeling van levensbedreigende ziekten, zoals kanker en bepaalde infectieziekten (bijv. AIDS en malaria), en bij chronische, belastende ziekten zoals auto-immuunziekten (bijv. reuma en multiple sclerose).

Een laatste essentiële component in het drug-carrierconcept is het *adres*, de plaats van werking. Vaak zal dat direct het orgaan zijn dat door de ziekte is aange-tast (bijv. de long bij een longontsteking of een longtumor), of in geval van vaccins indirect de cellen van het immuunsysteem betrokken bij de afweer tegen infectie-ziekten en kanker.



figuur 2. Advertentie uit *Pharmaceutical Formulas* (1898).

## HISTORIE

Het idee om carriers te gebruiken om farmaca te targetten is niet nieuw. Reeds in de 19e eeuw werd over DT-systemen nagedacht.

In figuur 2 is een advertentie uit 1898 weergegeven over 'pills which act directly on the liver', dus die direct op de lever, en kennelijk nergens anders, inwerken. 'A pill important to the trade': men had ook toen aldoor dat DT-systemen geld in het laatje kunnen brengen. Deze advertentie stond in het boek getiteld 'Pharmaceutical Formulas', gepubliceerd in Londen in 1898. In diezelfde tijd leefde de Duitse wetenschapper Paul Ehrlich, Nobelprijswinnaar in 1908. Hij kwam toen al met zijn befaamde idee van de



‘magic bullet’: een farmacon zou slechts op de gewenste plek in het lichaam geactiveerd moeten worden en alleen daar het gewenste therapeutische effect ten toon spreiden. Tot op de dag van vandaag worstelen de ontwerpers van geneesmiddelen nog steeds met het in praktijk brengen van dit denkbeeld van een geleid geneesmiddelprojectiel.

## STAND VAN ZAKEN

Wereldwijd zijn er de afgelopen 3 decennia heel wat *drug-carrier* systemen onderzocht (tabel 1).

**tabel 1.** Voorbeelden van de verschillende *drug-carriers* systemen.

macromoleculair	colloïdaal	cellulair
antilichamen	liposomen	erythrocyten
polymeren	nano-/microsferen	leucocyten
plasma-eiwitten	micellen	bacteriën
koolhydraten	lipoproteïnen	
	virale vectoren	

Deze *drug-carriers* systemen zijn ruwweg onder te verdelen in:

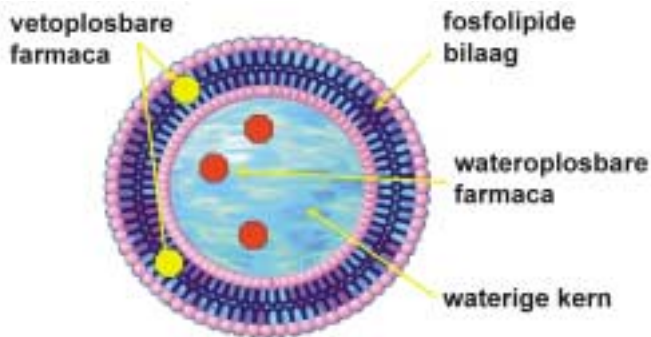
- *macromoleculen* (grote, oplosbare moleculen, bijv. eiwitten zoals, antilichamen en albumine);
- *colloïdale systemen* (niet-oplosbare systemen met een deeltjeskarakter zoals, bijv. liposomen opgebouwd uit fosfolipiden, en microsferen opgebouwd uit polymeren), *cellulaire systemen* (zoals, bijv. rode en witte bloedcellen).

Van links naar rechts neemt de afmeting van het carriersysteem toe, van nano- tot micrometerniveau. Verreweg de meeste aandacht is besteed aan de bestudering van de macromoleculaire en colloïdale systemen.

Wat is er van al dat onderzoek terecht gekomen? Het zal duidelijk zijn dat het onmogelijk is een compleet overzicht van de stand van zaken te schetsen in deze inleidende bijdrage. Om toch een indruk te geven, zullen enkele concepten worden geïllustreerd aan de hand van de groep van de colloïdale systemen.

In figuur 3 is een voorbeeld van zo'n colloïdaal systeem gegeven, in dit geval een liposoom.

Liposomen zijn minuscule, kleine vetbolletjes ( $\approx 10$  nm) die van binnen hol zijn. In die binnenste holte zit water. In deze vetbolletjes kunnen farmaca worden ingesloten. Het inbouwen van farmaca in een colloïdaal DT-systeem beschermt het farmacon tegen een snelle eliminatie uit en afbraak in het bloed. Dit heeft als grote voordeel dat het farmacon veel meer tijd krijgt om het doelgebied te bereiken.

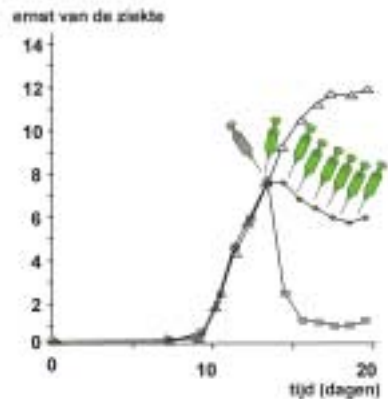


figuur 3. Schematische weergave van een liposoom.

Echter lange circulatie in de bloedbaan garandeert zeker niet dat het systeem de bloedbaan uit kan en zich kan lokaliseren in het zieke orgaan. De bloedvaten hebben immers een wand, bestaande uit een aaneengesloten laag van endotheelcellen. Deze wand is ondoordringbaar voor deeltjes, dus ook voor onze colloïdale carriers. Echter, door verbeterde pathofysiologische inzichten is recentelijk duidelijk geworden dat de bloedvaten die aanwezig zijn op pathologische plekken in het lichaam 'anders' zijn. Veelal hebben bloedvaten op plaatsen waar ziekteprocessen zich voordoen, een wand die veel meer permeabel is dan die van normale bloedvaten. Deze verhoogde doorlaatbaarheid is een gevolg van het ziekteproces zelf.

Onderzoek door een groep uit Boston (Jain, 1994), heeft aangetoond dat colloïdale deeltjes, in dit geval liposomen, inderdaad uit de bloedbaan kunnen treden en tumorweefsel ingaan. De liposomen waren gemerkt met een fluorescerende stof, vervolgens ingespoten in tumordragende muizen, en met behulp van een speciale microscopietechniek werd extravasatie zichtbaar gemaakt. Dit resultaat is een gevolg van het feit dat veel bloedvaten in de tumor meer permeabel zijn: ze zijn als het ware lek. Het zal duidelijk zijn dat deze extravasatie-mogelijkheid in tumoren therapeutische voordelen kan bieden. Extravasatie en daarmee lokalisatie van langcirculerende DT-systemen is niet voorbehouden aan tumoren, maar is een veel breder fenomeen. Het gaat ook op voor tal van infectiehaarden (bacterie- en schimmelinfecties) en ontstekingen. De reden is wederom: de lokale bloedvaten zijn meer permeabel. Eenmaal in de *target site* aangeland komt het er op aan daar therapeutisch voordeel uit te halen. En de onderzoekers zijn succesvol geweest, in die zin dat commerciële producten verkrijgbaar zijn gebaseerd op colloïdale systemen die het cytostaticum doxorubicine of daunorubicine of het schimmeldodende middel amphotericine B bevatten. Momenteel loopt er een project bij de faculteit Farmacie in Utrecht waarbij corticosteroiden worden ingebouwd in langcirculerende liposomen met als doel ontstekingsprocessen in reumatische gewrichten te behandelen. Als preklinisch evaluatiemodel worden ratten gebruikt, waarin reuma-achtige ontstekingen zijn geïnduceerd.

figuur 4. Antireumatisch effect van corticosteroiden toegediend in liposomen: de driehoekjes geven de controleratten weer, de diamantjes de ratten met vrij corticosteroid (7 opeenvolgende injecties) en de vierkantjes de ratten die één enkele liposomale corticosteroidinjectie ontvingen. Voor verdere verklaring, zie de tekst.



Enkele punten die kunnen worden geconcludeerd, zijn:

- duidelijk is dat bij de controleratten de ziekte opkomt;
- één enkele injectie van de lang circulerende liposomen met daarin corticosteroiden geeft een krachtig antireumatisch effect, en blijkt voldoende te zijn om alle ontstekingshaarden symptomvrij te maken voor een lange periode;
- als de ratten behandeld worden met de conventionele corticosteroiden, niet verpakt in liposomen, blijkt één injectie totaal niet werkzaam, en zelfs een meervoudig injectieschema (met in totaal 7 achtereenvolgende injecties) blijkt praktisch niet effectief.

Het targeting mechanisme is wederom extravasatie: uittreding van de liposomen ter plekke van de reuma-ontstekingen.

In de klinische praktijk komt het nogal eens voor dat reumapatiënten met een opvlammende ziekte worden behandeld met meervoudige hoge doseringen corticosteroid, een zogeheten intraveneuze stootkuur. Het zou dus prachtig zijn als deze patiënten behandeld zouden kunnen worden met slechts één enkele injectie corticosteroidliposomen met een langdurig antireumatisch effect. Niet alleen wordt dan het targeting effect benut voor een sterk verbeterd therapeutisch effect, een dergelijke éénmalige injectie is ook patiëntvriendelijker en vergt minder inzet van de medische infrastructuur. Dit voorbeeld illustreert een belangrijk voordeel van een DT-systeem: het is wellicht duurder dan het conventionele middel, toch kan het terugbrengen van het aantal toedieningen een netto kostenbesparend effect hebben op de gezondheidszorg.

Dit voorbeeld van een succesvolle toepassing van een colloïdaal DT-systeem leert ons een duidelijke les: een DT-onderzoeker doet er goed aan om handig gebruik te maken van mogelijkheden die het ziekteproces zelf biedt, in dit geval deeltjesuittreding door verhoogde permeabiliteit van bloedvaten op de plaats van de ziekte.

Het is belangrijk zich te realiseren dat lokalisatie in de ziekteplek niet automatisch betekent dat het doel volledig bereikt is. Dit punt kan worden geïllustreerd met een voorbeeld van een minder succesvolle situatie.



figuur 5.  
Liposomen gebonden aan een tumorcel.

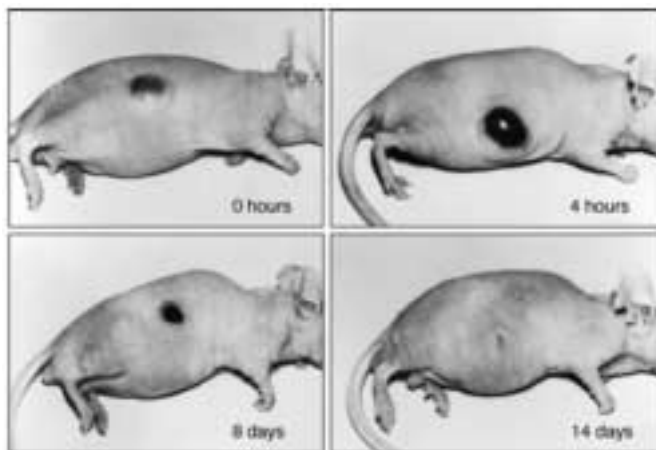
Figuur 5 geeft een menselijke ovariumkanker cel weer, overgebracht in een muis. De kern en celmembranen zijn zichtbaar, en ook de colloïdale deeltjes, die zeer goed in staat blijken te zijn om te binden aan het buitenoppervlak van de kankercellen. Het targeten van de colloïdale deeltjes bleek dus succesvol. Bijna alle deeltjes toegediend aan de muis bleken te binden aan de tumorcellen. Dit was te danken aan antilichamen specifiek gericht tegen ovariumkankercellen, die gekoppeld waren aan de buitenkant van de liposomen. Echter, toen sterk werkende chemotherapeutica zoals doxorubicine ingebouwd werden in deze zogeheten immunoliposomen, was de teleurstelling groot: de tumorcellen gingen niet dood, omdat de ingesloten toxische stoffen rustig in deze targetcel-gebonden liposomen bleven zitten. De liposomen en daarmee de ingesloten farmaca gingen niet de cel in, en bereikten daarom hun intracellulaire adressen niet.

Dit is dus de situatie: specifieke celbinding, maar geen cellulaire opname. De laatste jaren is veel research verricht om deze situatie te veranderen, om de intracellulaire aflevering van farmaca te verbeteren. Een vorm van nanotechnologie: het construeren van delivery systemen op nanometer niveau ( $10^{-9}$  m) met alle gewenste elementen.

1. een van de geteste benaderingen richt zich op binding aan speciale structuren op de cel (receptoren) die, na binding van het DT-systeem via moleculaire herkenning, ervoor zorgen dat het geheel de cel in wordt gesluisd (iets wat receptorgemedieerde endocytose wordt genoemd).
2. een andere strategie is het inbouwen van virale eiwitten in het liposoom systeem met het doel na target-cel binding fusie, versmelting met de celmembranen, te verkrijgen. Virussen kunnen dat als geen ander. Waarom zou moeder natuur niet geïmiteerd kunnen worden?
3. recent zijn pogingen gedaan om het gehele complex intact over de celmembranen te loodsen door nieuw geïdentificeerde eiwitstructuren aan het oppervlak van de deeltjes te koppelen.

Tot slot nog kort een heel nieuwe ontwikkeling in het DT-onderzoek bij kanker. Hierboven is beschreven hoe geprobeerd wordt DT-systemen te targeten naar

tumorcellen. Echter, een nieuwe behandelwijze heeft zich aangekondigd: richt je naast targeting naar de tumorcellen ook op targeting naar de endotheelwand van de bloedvaten in de tumor. Getracht wordt de tumorbloedvaten zodanig te beschadigen dat de voedsel- en zuurstofvoorziening van de tumor wordt platgelegd. Dan 'knijp' je als het ware de tumor af, waardoor deze afsterft door een sterke afname van het aantal functionele tumorbloedvaten. Een project van het Koningin Wilhelmina Fonds dat in de onderzoeksgroep aan de faculteit Farmacie in Utrecht wordt uitgevoerd in nauwe samenwerking met de Universiteit van Groningen probeert deze benadering experimenteel gestalte te geven. Wederom is de filosofie om gebruik te maken van karakteristieken van het ziekteproces, in dit geval van specifieke receptoren die op de wandcellen van nieuwgevormde (angiogene) bloedvaten in de tumor tot expressie worden gebracht.



figuur 6. Lokale bloedstolling in tumorbloedvaten geeft regressie.

Dat dit concept realiteitsgehalte heeft, moge blijken uit figuur 6. Deze muizen-tumor gaat in regressie nadat er specifiek in de tumorbloedvaten een stollingsproces op gang is gebracht via binding van een DT- systeem aan de vaatwanden.

Dit hoofdstuk kan niet afgesloten worden zonder het noemen van één van de van de meest succesvolle voorbeelden van DT: toepassing bij de behandeling van leishmaniasis, een ernstige infectieziekte waaraan wereldwijd vele mensen overlijden. Het gebruik van colloïdale DT-systemen levert een gigantische verbetering van het therapeutische effect op en kan daarom in principe een doorbraak in de behandeling van deze ziekte realiseren. Toch zijn deze systemen nooit verder ontwikkeld tot een commercieel product. De reden is simpel en wrang tegelijk: deze ziekte komt praktisch alleen voor in derde-wereld landen. Dus de industrie zal hier niet snel instappen. Ligt hier niet een schone taak voor de wereldgezondheidsorganisatie?

## VISIE OP DE TOEKOMST

Vooruitgang in moleculaire biologie, genomics, proteomics, *high throughput screening*, *combinatorial chemistry*, biotechnologie: het zijn allemaal terreinen die aangeven dat de farmaca van de toekomst anders zullen zijn dan die van vandaag. Nieuwe, indrukwekkende methoden zullen selecteren van 'lead' verbindingen mogelijk maken. Echter of deze methoden zullen leiden tot moleculen die het in het zieke lichaam goed doen, is onzeker. Het molecuul dat het beste resultaat geeft in *in vitro* screenings-testen maar *in vivo* niet de targetsite kan bereiken, is wellicht niet het molecuul dat verder ontwikkeld moet worden. Dus: high throughput screening op basis van structuuraffiniteits- en structuuractiviteitsrelaties is belangrijk, maar niet alles. Belangrijk is ook implementatie van structuurdelivery-relaties in een vroege fase van het geneesmiddelontwikkelingsproces. In ieder geval dient de stem van drug delivery experts mee te klinken bij de besluitvorming over het in ontwikkeling nemen van kandidaatverbindingen. Dit vergt wellicht een zekere cultuuromslag, maar vroege aandacht voor de drug delivery problematiek verdient zich dubbel en dwars terug.

In de nabije toekomst worden we niet alleen uitgedaagd door een spectrum van nieuwe, synthetische moleculen, maar ook door biomoleculen afkomstig uit biotechnologisch en genterapeutisch onderzoek: eiwitten zoals groeifactoren en cytokines, en nucleotiden zoals DNA-moleculen. Al deze complexe moleculen 'schreeuwen' om een geschikte toedieningsvorm, en een DT-systeem zal vaak nodig zijn om ten volle van hun geneeskrachtige potentie te kunnen profiteren. Kortom: de verdere ontwikkeling van het DT-onderzoeksterrein zal in de toekomst, meer (nog) dan vroeger, een belangrijke succesfactor blijken te zijn bij de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen.

Hier komt nog iets bij: wereldwijd worstelt de farmaceutische industrie met een zogeheten *innovation gap*, een 'vernieuwingsgat'. Hiermee wordt bedoeld dat er op dit moment een gebrek is aan nieuwe, veelbelovende moleculen, die in ontwikkeling genomen kunnen worden. De in gang gezette genetische revolutie zal de pijplijn weer gaan vullen, maar momenteel is de aanvoer van kandidaatfarmaca, de *new chemical entities* (NCE's), een punt van zorg. Dit negatieve gegeven zal positief inwerken op de interesse van de industrie voor *advanced drug delivery* systemen: deze systemen leveren immers toegevoegde waarde aan reeds bestaande farmaca.

Het DT-vakgebied zal in toenemende mate van betekenis worden voor de farmaceutische professie. Op dit moment is het al zo dat met name de ziekenhuisapothekers geconfronteerd worden ondermeer in klinisch onderzoek met het gebruik van DT-toedieningsvormen, zoals bijvoorbeeld liposomale cytostatica ter behandeling van verschillende kankervormen. Echter, de opmars van de geavanceerde toedieningsvormen, en daarmee worden niet alleen de DT-systemen bedoeld, zal zich verder voortzetten. Zij hebben de patiënt veel te bieden wat betreft therapeutisch effect, gebruiksgemak, therapietrouw, en kunnen ook economisch profijt opleveren.

## CONCLUSIE

Samenvattend kan gesteld worden dat de vooruitgang op het DT-gebied nog beperkt is. Er zijn nog maar weinig DT-systemen beschikbaar die ingezet kunnen worden om ernstige ziekten te bestrijden. En daar gaat het toch om: het helpen van de ernstig zieke patiënt en het verbeteren van de *quality of life*.

Het DT-vakgebied maakt zich 'bezorgd om bezorgen'. Dit klinkt wellicht wat zorgelijk en pessimistisch. Dit is echter geenszins de bedoeling. Maar: de mooiste appels hangen altijd het hoogst in de boom. Er is veel werk aan de winkel. We staan aan de vooravond van een stormachtige ontwikkeling binnen de farmaceutische wetenschappen mede als gevolg van de doorbraken in de vorige eeuw: de ontdekking van de structuur van het DNA en de ontrafeling van de structuur van het menselijk genoom. De ontwikkeling van DT-systemen zal een wezenlijke rol moeten spelen willen we de mooiste appels kunnen pakken en optimaal van de nieuwe farmaca kunnen profiteren. Een sleutelwoord hierbij is 'interdisciplinair': er zal intensief over de grenzen van veel vakgebieden heen moeten worden samengewerkt. Indien interdisciplinair DT-onderzoek goed handen en voeten wordt gegeven, is een optimistische toekomstvisie zeker op zijn plaats. Van de eerder geciteerde Paul Ehrlich is de uitspraak dat het bij geneesmiddelontwikkeling gaat om 4 G's: Geduld, Geschick, Glück en ....Geld. Geduld: dat is er, Geschick, vaardigheden moeten we opbouwen, Glück, ach waarom niet? Maar dan nu het zorgkindje: de 4e G: Geld. Dat is er altijd te weinig. Toch zal er veel moeten komen, want het ontwikkelen van nieuwe, betere geneesmiddelen is duur. De betaalbaarheid is een zaak van prioriteit, en daarmee in handen van de maatschappij en de politiek. Maar een ding is duidelijk: aan de farmaceutische deliverywetenschappers zal het niet liggen!

## REFERENTIES

- Crommelin DJA, Hennink WE en Storm G. *Drug targeting systems: fundamentals and applications to parenteral drug delivery*. In: *Drug Delivery and Targeting for Pharmacists and Pharmaceutical Scientists*. Ed. AM Hillery, AW Lloyd, and J Swarbrick, Taylor & Francis, New York, pp. 117-144, 2001.
- Huang X, Molema G, King S, Watkins L, Edgington TS en Thorpe PE. *Tumor infarction in mice by anti body-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature*. *Science* 275, 547-550, 1997.
- Jain RK. *Barriers to drug delivery in solid tumors*. *Scientific American*, July 1994.
- MacEwan P. *Pharmaceutical formulas. A book of useful recipes for the drug trade*. *Offices of the Chemist and Druggist*, London, 1898.
- Martin F en Boulikas T. *The challenge of liposomes in gene therapy*. In: *Gene Therapy and Molecular Biology*. Vol. 1, Ed. T Boulikas, Gene Therapy Press, Palo Alto, p. 190, 1998.
- Peters-Volleberg GWM, Kinzel J en Tukker JJ. *Geneesmiddeltoedieningsvormen en -systemen: ontwikkelingen en toekomstverwachtingen*. RIVM rapport 605910 005, september 2000.
- Storm G en Crommelin DJA. *Liposomes: quo vadis? Pharm Sci Technol Today* 1, 19-31, 1998.



Jan van Meurs (1954) studeerde medicijnen in Leiden. Zijn opleiding tot oogarts volgde hij in Nijmegen (prof. Deutman). Na zijn diensplicht als bataljonsarts in Libanon verzamelde hij als gouvernementsoogarts op Curaçao het materiaal voor zijn proefschrift over sikkelcelretinopathie. In 1989 werkte hij een jaar als research fellow op het Doheny Eye Institute in Los Angeles. Sindsdien is hij als vitreoretinaal chirurg verbonden aan het Oogziekenhuis Rotterdam,

waar hij plaatsvervangend opleider is. Hij is voorzitter van de werkgroep vitreoretinale chirurgie Nederland.

Zijn onderzoeksbelangstelling richt zich op geneesmiddelenonderzoek, endophthalmitis en retinaal pigmentbladepitheelonderzoek als onderdeel van pigmentbladtransplantatie bij patiënten met leeftijds-gebonden maculadegeneratie.



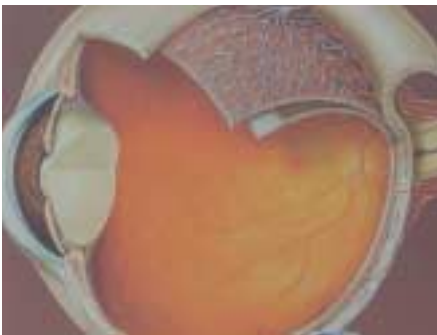
**DE VRAAGSTELLING**

Bij de farmacotherapeutische benadering van ziekten in het oog is het essentieel dat werkzame geneesmiddelconcentraties worden bereikt in het aangedane weefsel. Welke toedieningsvormen worden er in de oogheelkunde toegepast om te bewerkstelligen dat een medicament een adequate spiegel in het oogvocht bereikt en, beter nog, een adequate concentratie in het oogweefsel? Wat is er bekend over de route en relatieve effectiviteit van deze toedieningsvormen?

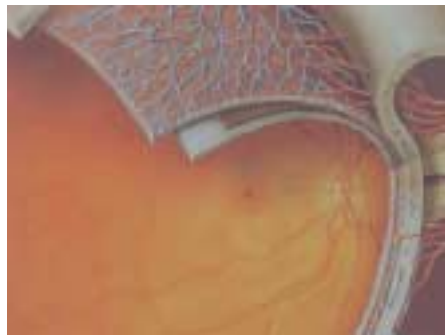
Na bespreking van enige aspecten van het oog en van diverse geneesmiddelen zullen aan de hand van een aantal klinische onderzoeken de mogelijke transportroutes voor oogheelkundig toegepaste geneesmiddelen behandeld worden. Hun effectiviteit zal worden besproken in farmacokinetische termen, en een relatie zal worden gelegd tussen de effectiviteit en de verschillende klinisch gebruikte toedieningsvormen.

**ANATOMIE**

De wand van de oogbol bestaat uit drie lagen: de harde oogrok (*sclera*), het vaatvlies (*uvea*) en netvlies (*retina*). De uvea vormt in het voorste deel van het oog de iris en het *corpus ciliare*, in het achterste deel de *chorioidea*.



figuur 1. Overzicht van het oog.



figuur 2. Overzicht van de oog-achterpoolplaat.

Men kan in de oogbol drie ruimtes onderscheiden: de voorste oogkamer (0.2 ml), begrensd door het doorzichtige hoornvlies (*cornea*), iris en lens; de achterste oogkamer (0.1 ml) omsloten door achterkant van de lens, het corpus ciliare en de voorste glasvochtbegrenzing en de glasvochtruimte (4 ml), begrensd door de retina.

## FYSIOLOGIE

### OOGDRUK

De oogdruk wordt bepaald door het evenwicht tussen de continue productie van kamerwater, een ultrafiltraat geproduceerd in het corpus ciliare in de achterste oogkamer, en de afvloed van het kamerwater. Deze afvloed geschiedt via de pupil door het kanaal van Schlemm in de kamerhoek, dat draineert in de venen van de orbita. Ook is enige afvloed van kamerwater in de achterste oogkamer (uveosclerale afvloed), welke 10% van de totale afvloed vertegenwoordigt.

### BLOEDVOORZIENING

Het hele oog wordt door de *arteria ophthalmica* van bloed voorzien, maar verschillende aftakkingen ervan verzorgen afzonderlijke gedeelten. De meest proximale aftakkingen lopen langs de oogspieren naar voren, perforeren de sclera en voorzien het corpus ciliare van aanvoer. Tevens voorzien twee lange ciliaire arterieën het corpus ciliare van bloed. De achterpool wordt voorzien door diverse korte ciliaire arterieën. Beide systemen verzorgen het metabolisme van *choriocapillaris*, het pigmentepitheel van de retina (retinaal pigmentblad epitheel - RPE) en de fotoreceptorlaag van de retina. Eindstandig is de overblijvende *arteria centralis retinae*, die de binnenste lagen van de retina verzorgt. De afvoer loopt via de veneuse plexus naar de 4 vortexvenen in de choroidea en via de *vena centralis retinae* naar de *vena ophthalmica*.

### BARRIÈRES / TOEGANG VOOR GENEESMIDDELEN

In het oog wordt de diffusie van met name wateroplosbare moleculen tussen de cellen door gehinderd door een vlechtwerk van tight junctions dat die cellen onderling verbindt.

#### 1. bij topicale toediening als oogdruppels:

cornea: de barrière is een veellagig lipofiel epitheel, met verder een hydrofiel stroma en endotheel; conjunctiva: de barrière is een meerlagig lipofiel epitheel;

#### 2. voor geneesmiddelen die via de circulatie het oog moeten bereiken:

de bloed-kamerwaterbarrière wordt gevormd door het niet-gepigmenteerde epitheel van het corpus ciliare; de bloed-retinabarrière wordt gevormd door het retinaal pigmentbladedpitheel en het vaatendotheel.

### ELIMINATIE VAN GENEESMIDDELEN

Alle geneesmiddelen verlaten het oog passief via de kamerhoek met het kamerwater mee. Het kamerwater wordt met een snelheid van 2  $\mu$ l per minuut ververs, zodat bij een glasvochtruimte van 4 ml na 23 uur ongeveer de helft van het oogvocht met de daarin opgeloste geneesmiddelen is vervangen. Van sommige antibiotica is bekend dat zij bovendien met een door probenicid rembare organische anionpomp actief via de retina worden verwijderd (Minder, 1998).

## FYSICOCHEMISCHE EIGENSCHAPPEN VAN HET GENEESMIDDEL

Om de barrières in het oog te passeren is lipofiliteit (bijvoorbeeld uit te drukken als octanol/waterpartitie) van een geneesmiddel van veel grotere invloed dan molecuulgrootte. Bovendien is uiteindelijk een hydrofiële vorm vereist om in het waterige oogmilieu te kunnen diffunderen: het concept van *differential solubility*. De meeste geneesmiddelen zijn dan ook zwakke basen of zuren. Sommige permanent geïoniseerde stoffen kennen echter een hogere penetratie dan niet-geïoniseerde stoffen (Minder, 1998). Mogelijk is bij dit type stoffen sprake van actief transport.

## STUDIES BIJ PATIËNTEN OP HET OOGZIEKENHUIS ROTTERDAM

Tussen 1996 en 1999 zijn vier farmacokinetische studies uitgevoerd met de volgende opzet: patiënten die een eerste vitrectomie of conventionele ablatiechirurgie zouden ondergaan, kregen tussen de 1 en 12 uur preoperatief dexamethason toegediend. Bij aanvang van de operatie werd bij elke patiënt een monster van één of twee oculaire vloeistoffen afgenomen (afhankelijk van de studie: kamerwater, glasvocht, of subretinaal vocht). Tevens werden bij een deel van de patiënten op meerdere tijdstippen serummonsters afgenomen. De dexamethasonconcentraties in serum en oculaire vloeistoffen werden bepaald in een radioimmunoassay.

- studie 1. dexamethason werd als dinatriumfosfaat toegediend door middel van een peribulbaire injectie;
- studie 2. dexamethason werd p.o. als alcohol toegediend;
- studie 3. dexamethason dinatriumfosfaat als subconjunctivale injectie;
- studie 4. dexamethason dinatriumfosfaat lokaal in druppelvorm. Het betrof hier herhaalde toediening tot *steady state*.

In de tabel zijn de resultaten van alle studies gecombineerd. De  $C_{\max}$  is de gemiddelde dexamethason piekconcentratie en  $t_{\max}$  is het tijdstip na toediening waarop  $C_{\max}$  bereikt werd. In de studies met druppeltoediening, subconjunctivale injectie en peribulbaire injectie werd dexamethason dinatriumfosfaat gebruikt, terwijl de orale dosis uit dexamethason (alcohol) bestond. Om de resultaten beter te kunnen vergelijken, is bij de toedieningsroute de dosis weergegeven. De studie waarin druppels toegediend werden had een andere opzet: druppels werden

**tabel 1.** Hoogte en tijdstippen van piekconcentraties van dexamethason na verschillende toedieningsroutes. FS = eerste monster; nb = niet bepaald of niet te bepalen.

route	kamerwater		glasvocht		subretinaal		serum	
	$C_{\max}$ ng/ml	$t_{\max}$ uur	$C_{\max}$ ng/ml	$t_{\max}$ uur	$C_{\max}$ ng/ml	$t_{\max}$ uur	$C_{\max}$ ng/ml	$t_{\max}$ uur
peribulbair (5 mg)	nb	nb	22.1	6.7	82.2	3.0	60	FS
oraal (7.5 mg)	nb	nb	5.71	6.7	12.3	5.0	90	FS
subconj (2.5 mg)	858	2.6	72.5	3.0	359	2.5	32.4	0.5
druppels (0.38 mg)	30.5	nb	1.1	0.7	nb	nb	0.7	nb

herhaald toegediend, met als doel een steady state te bereiken. In de tabel staat daarom niet een piek-concentratie, maar de gemiddelde dexamethason concentratie in (naar wordt aangenomen) steady state na toediening van 10 druppels met intervallen van 1.5 uur [Weijtens *et al*, 1997; 1998; 1999; 2000; 2002].

## ROUTES WAARLANGS DEXAMETHASON HET OOG IN KOMT

In de eerste studie, waarin de dexamethasonconcentraties in het glasvocht en het serum gemeten werden na peribulbaire injectie van 5 mg dexamethason dinatriumfosfaat, vonden wij aanzienlijke dexamethasonconcentraties in het serum. Dit bracht ons op de gedachte dat systemische absorptie vanuit het geïnjecteerde depot, gevolgd door afgifte via het bloed in het oog, wel eens de voornaamste route zou kunnen zijn waarlangs dexamethason in het glasvocht terecht kwam.

Om deze hypothese te testen hebben wij vervolgens een studie uitgevoerd, waarin dexamethason oraal toegediend werd. De orale dosis was zodanig gekozen, dat verwacht werd dat de dexamethasonconcentraties in het serum vergelijkbaar waren met de concentraties in het serum na de peribulbaire injectie van 5 mg dexamethason dinatriumfosfaat. Inderdaad werden in deze studie vergelijkbare concentraties in het serum gemeten. De piekconcentratie van dexamethason in het glasvocht was echter slechts ongeveer een vierde van de piekconcentratie na de peribulbaire injectie. Dit wijst erop dat na een peribulbaire injectie weliswaar een deel van de dosis het glasvocht bereikt via haematogene verspreiding, maar dat een groter deel het glasvocht in komt door transsclerale diffusie.

In de derde studie, waarin 2.5 mg dexamethason dinatriumfosfaat subconjunctivaal geïnjecteerd werd, vonden wij een dexamethason piekconcentratie in het glasvocht die veel hoger was dan na peribulbaire injectie of orale toediening. Aanzienlijke dexamethasonconcentraties in het serum maken aannemelijk dat na een subconjunctivale injectie een deel van de dosis het glasvocht via haematogene verspreiding bereikt. Bij subconjunctivale injectie komt een deel van het geïnjecteerde depot gedeeltelijk achter de *pars plana* terecht. De *pars plana* is een klein deel van de oogbol dat net achter het corpus ciliaire gelegen is, maar nog voor de structuur die met de retina bekleed is. Door de afwezigheid van retina is het mogelijk een absorptieroute voor een subconjunctivaal geïnjecteerd farmacon, en zo kan een deel van de dosis waarschijnlijk door de sclera heen het glasvocht in diffunderen. De hogere concentraties in het glasvocht - vergeleken met de andere toedieningsvormen - en de hoge dexamethasonconcentraties in het kamerwater wijzen op een mogelijke derde route waarlangs dexamethason het glasvocht bereikt na subconjunctivale injectie: diffusie vanuit het kamerwater naar het glasvocht. Lekkage vanuit het conjunctivale prik gat, gevolgd door passage door de cornea wordt geacht een belangrijke bijdrage te leveren aan de hoge concentraties in het kamerwater, en dus indirect in het glasvocht.

De dexamethasonconcentraties in het subretinale vocht bij *ablatio retinae* waren hoger dan die in het glasvocht, ongeacht de toedieningsvorm.

Dit kan verklaard worden door de nabijheid van de subretinale vloeistof tot het geïnjecteerde depot na subconjunctivale of peribulbaire injectie en tot de choroïdea, van waaruit dexamethason nadat het in de systemische circulatie is opgenomen in het oog afgegeven wordt. Diffusie vanuit de subretinale ruimte (een virtuele ruimte in een oog onder de aanliggende retina) naar het centrum van het glasvocht zal waarschijnlijk gedeeltelijk worden tegengegaan door de retina en de glasvochtstructuur.

#### SYSTEMISCHE OPNAME

De hierboven beschreven relatie tussen dexamethason piekconcentraties in het serum en toedieningsroute toont aan dat de aanname dat peribulbaire en subconjunctivale injecties zuiver lokale behandelingen zijn, met weinig systemische verspreiding van het geneesmiddel, onjuist is. Het is zelfs zo, dat de biologische beschikbaarheid van dexamethason in serum na beide vormen van injectie groter is dan na orale toediening.

Toediening van corticosteroïddruppels leidt in de dagelijkse praktijk zelden tot systemische bijwerkingen, ook al is een toename van de plasmacortisolspiegel wel beschreven.

#### KLINISCHE IMPLICATIES

Wanneer gedurende korte tijd een hoge corticosteroïdspiegel in het voorste oogsegment (voorste en achterste oogkamer) gewenst is, is een subconjunctivale injectie met het kortwerkende dexamethason dinatriumfosfaat geschikt, en effectiever wat betreft opname dan frequent druppelen. Een subconjunctivale injectie is bovendien effectiever dan een peribulbaire injectie om dexamethason in het achtersegment (glasvochtruimte en retina) van het oog te brengen.

#### NOG DIRECTERE ROUTES VOOR DE GLASVOCHTRUIMTE

Hoewel de bovenstaande studies aantonen dat een directe route om een geneesmiddel het oog in te krijgen, echt bestaat, wordt er vooral sinds 1996 veel gebruik gemaakt van een nog directere route: intravitreale injectie, met name voor antibiotica en voor steroïden bij de behandeling van bacteriële endophthalmitis (Anonymus, 1995; Visser, 2001; Gan *et al*, 2001). Hiermee worden alle barrières in het oog omzeild, echter wel met het risico van een glasvochtbloeding of infectie. In de zeer nabije toekomst zal een nog directere route verder ontwikkeld worden, namelijk de subretinale injectie. Deze toedieningsroute bewerkstelligt hoge concentraties bij de retina, terwijl slechts zeer lage doses gegeven worden.

#### WERKINGSDUUR

De werkingsduur van een farmacon is afhankelijk:

- van de farmacokinetiek: hoe hoog is de concentratie en hoe lang blijft deze

aanwezig in het doelcompartiment? Dit is afhankelijk van de absorptie en van de eliminatie van het farmacon;

- en van de farmacodynamiek: hoe lang houdt een biologisch effect aan als de receptor bezet is. Dit is o.m. afhankelijk van het soort effect en hoe snel de receptor-ligand wordt afgebroken.

Bij veel oog-aandoeningen is een chronisch effect gewenst. Methodes om een langere werking te bewerkstelligen zijn:

- verhoging van de dosis, waardoor een verlenging van de werkingsduur wordt bereikt. Dit is slechts beperkt toepasbaar doordat de meeste farmaca geëlimineerd worden volgens eerste-ordekinetiek: verdubbeling van de dosis leidt tot een verlenging van de werkingsduur van slechts één halfwaardetijd;
- herhaling van de toediening. Bij topicale en orale toediening is dit goed uitvoerbaar en ook de regel. Bij toediening per injectie is dit evenwel niet aantrekkelijk wegens het ongemak en de kansen op complicaties;
- het gebruik van een depotpreparaat, dat door een langdurige afgifte van het farmacon een langdurig een concentratie in het doelcompartiment verzorgt zolang de absorptie hoger blijft dan de eliminatie;
- modificatie van het farmacon zodat de receptor langer bezet blijft;
- combinatie van de laatste twee methoden.

## CONCLUSIE

Verschillende toedieningswijzen staan de oogarts ter beschikking om geneesmiddelen op verschillende plaatsen in het oog toe te dienen, waarbij de toedieningswijze het opnameprofiel bepaalt.

De meest gebruikte toedieningsvorm is de oogdruppel. Modificaties van deze toedieningsvorm maken het mogelijk om de werkingsduur en de concentratie te optimaliseren. Adequate geneesmiddelconcentraties kunnen worden bereikt in de voorste oogkamer. Er is enige systemische absorptie.

Peribulbaire, maar vooral subconjunctivale, injectie geeft farmacologische concentraties in kamerwater, glasvocht en subretinale ruimte. Wel is er een aanmerkelijke systemische absorptie. Voor een langere werking zou een depotpreparaat nodig zijn, maar van de concentraties bereikt door depotpreparaten is weinig bekend.

Intravitreale injectie en subretinale injectie geven de hoogste en meest reproduceerbare geneesmiddelconcentraties bij de retina, zonder dat systemische concentraties bereikt worden. Er is echter een risico op complicaties.

## REFERENTIES

- Anonymus. *Results of the endophthalmitis vitrectomy study. Endophthalmitis Vitrectomy Study Group. Arch Ophthalmol* 1995; 113: 1479-1496.
- Gan IM, van Dissel JT, Beekhuis WH, Swart W, van Meurs JC. *Intravitreal vancomycin and gentamicin concentrations in patients with postoperative endophthalmitis. Br J Ophthalmol* 2001; 85: 1289-1293.
- Mindel JS. *Pharmacokinetics, in Tasman W, Jaeger EA eds, Duane's Foundations of Ophthalmology, vol 3, Philadelphia, Lippincot, Williams&Wilkins, 1998, chap 23.*
- Roters S, Aspacher F, Diestelhorst M. *The influence of dexamethasone 0.1% eye drops on plasma cortisol and ACTH concentrations after cataract surgery. Ophthalmologica* 1996; 210: 211-4.
- Weijtens O, van der Sluijs FA, Schoemaker RC, et al. *Peribulbar corticosteroid injection: vitreal and serum concentrations after dexamethasone disodiumphosphate injection. Am J Ophthalmol* 1997; 123: 358-63.
- Weijtens O, Schoemaker RC, Cohen AF, et al. *Dexamethasone concentration in vitreous and serum after oral administration. Am J Ophthalmol* 1998; 125: 673-9.
- Weijtens O, Feron EJ, Schoemaker RC, et al. *High concentration of dexamethasone in aqueous and vitreous following subconjunctival injection. Am J Ophthalmol* 1999; 128: 192-7.
- Weijtens O, Schoemaker RC, Lentjes EG, et al. *Dexamethasone concentration in the subretinal fluid after a subconjunctival injection, a peribulbar injection, or an oral dose. Ophthalmology* 2000; 107: 1932-8.
- Weijtens O, Schoemaker RC, Romijn FP, Cohen AF, Lentjes EG, Van Meurs JC. *Intraocular penetration and systemic absorption after topical application of dexamethasone disodium phosphate. Ophthalmology* 2002; 109: 1887-1891.



Bert de Boer studeerde farmacie in Groningen (met farmacologie als specialisme), waar hij in 1974 zijn apothekersdiploma behaalde. Hij promoveerde in 1979 bij prof. dr DD Breimer aan de Universiteit Leiden. In Leiden werkte hij vervolgens 5 jaar bij de afdeling Farmaceutische Technologie aan het onderzoek naar de gecontroleerde afgifte van geneesmiddelen uit polymere- en osmotische geneesmiddelafleveringssystemen. In 1984 startte hij zijn onderzoek bij de Sectie Farmacologie van het LACDR, in Leiden.

Zijn onderzoeksinteresses liggen op het gebied van drug transport en targetting naar de hersenen en de functionaliteit van de bloed-hersenbarrière (BBB), met name onder ziekte-omstandigheden. In het bijzonder gaat zijn interesse uit naar het bepalen van multi-drug resistentie en de modulatie van de BBB. Hiertoe worden zowel in vitro als in vivo experimenten uitgevoerd (met rattenmodellen voor o.a. multiple sclerose). Hij heeft samenwerkingsprojecten met farmaceutische industriën en diverse universitaire groepen.

Recent hebben Dr PJ Gaillard, VenGen, de Universiteit Leiden en Bert de Boer een bedrijf opgericht, dat specialiseerd is in het targeten van geneesmiddelen naar de BBB en de hersenen.



## AG de Boer en PJ Gaillard

### INTRODUCTIE

De bloed-hersenbarrière (BBB) is de 'interface' tussen het bloed en de hersenen en verhindert dat allerlei stoffen zomaar vanuit het bloed in de hersenen kunnen komen en omgekeerd. Ehrlich (1885) was de eerste die liet zien dat sommige kleurstoffen vanuit de bloedbaan wèl in andere weefsels maar niet in de hersenen konden doordringen. Zijn opvolger Goldmann (1913) heeft laten zien dat kleurstoffen die werden toegediend in de hersenen alleen de hersenen kleurden en niet andere weefsels. Brightman en Reese (1969) hebben uiteindelijk met behulp van electronmicroscopie laten zien dat de barrière wordt gevormd door het capillaire endotheel in de hersenen. Farmaca voor ziekten in de hersenen, zoals depressie, schizofrenie, multiple sclerose, neurodegeneratieve aandoeningen zoals de ziekte van Parkinson en de ziekte van Alzheimer, moeten in de hersenen doordringen willen ze effect hebben. Echter de bloed-hersenbarrière speelt een belangrijke limiterende rol bij het transport van geneesmiddelen vanuit het bloed naar de hersenen. Ook kunnen ziekten in de hersenen een grote invloed hebben op het functioneren van de BBB.

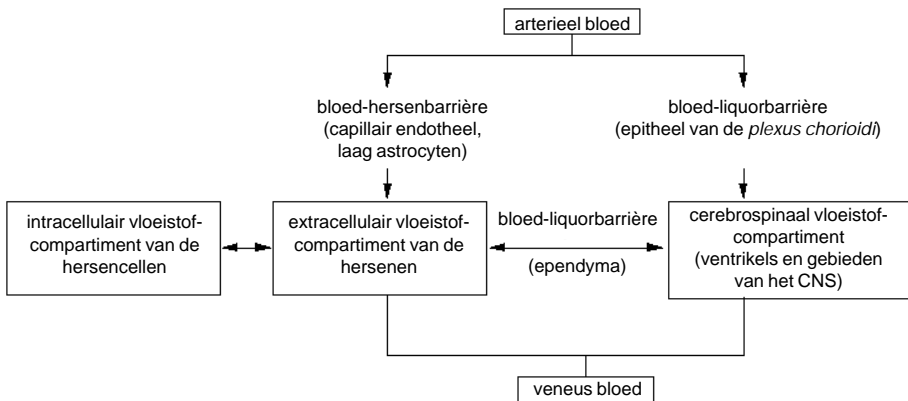
Dit artikel beoogt enig inzicht te geven in de functies van de bloed-hersenbarrière, en hoe geneesmiddelen in de hersenen kunnen doordringen (*brain-targeting*). Daarnaast wordt een celkweekstelsel beschreven waarmee deze processen op het niveau van de bloed-hersenbarrière kunnen worden bestudeerd.

### BARRIÈRES IN DE HERSENEN

Het transport van geneesmiddelen vanuit het bloed naar de hersenen wordt beperkt door een tweetal barrières: de bloed-hersenbarrière en de bloed-liquorbarrière. De bloed-hersenbarrière wordt gevormd door het capillaire endotheel in de hersenen en de bloed-liquorbarrière bevindt zich in de vaatkluwens (*plexi chorioidei*) in de wand van de hersenventrikels waar ook liquor (hersenvloeistof) geproduceerd wordt. Daarnaast bestaat er nog een derde barrière in de hersenen die wordt gevormd door het ependyma (een epitheelcellaag) dat het hersenweefsel in ventrikels bekleedt en een barrière vormt voor transport van stoffen vanuit de hersenvloeistof naar het hersenweefsel en omgekeerd. Het capillaire netwerk van de bloed-hersenbarrière is ongeveer 600 km lang waarbij de afstand tussen de capillairen ongeveer 40  $\mu\text{m}$  is. Dat betekent dat ongeveer elk neuron z'n eigen capillair heeft. Het oppervlak van de bloed-hersenbarrière is ongeveer 20 m<sup>2</sup> (Partridge, 2002). Omdat dit oppervlak ongeveer 1000 maal groter is dan het oppervlak in de

plexi chorioïdii, kan de bloed-hersenbarrière beschouwd worden als de belangrijkste barrière voor geneesmiddeltransport vanuit het bloed naar de hersenen.

De bloed-hersenbarrière kan worden gezien als een orgaan met fysische, metaboleen/of immunologische barrière-eigenschappen, welke betrekking hebben op respektievelijk permeabiliteit voor farmaca, afbraak van farmaca en toegankelijkheid voor bloedcellen en antilichamen. Deze eigenschappen worden beïnvloed door fysiologische processen en ziekten (figuur 1). Zowel het transport van geneesmiddelen langs de endotheelcellen (paracellulair) als door de endotheelcel heen (transcellulair) naar de hersenen, kan hierdoor beïnvloed worden. Binnen onze onderzoeksgroep wordt de farmacokinetiek en de farmacodynamiek van geneesmiddelen op het niveau van de BBB bestudeerd. Het onderzoek houdt zich in het bijzonder bezig met het transport en *targeting* van geneesmiddelen, en de invloed van ziekte hierop. Daarbij hebben cytostatica en anti-HIV geneesmiddelen onze speciale aandacht.

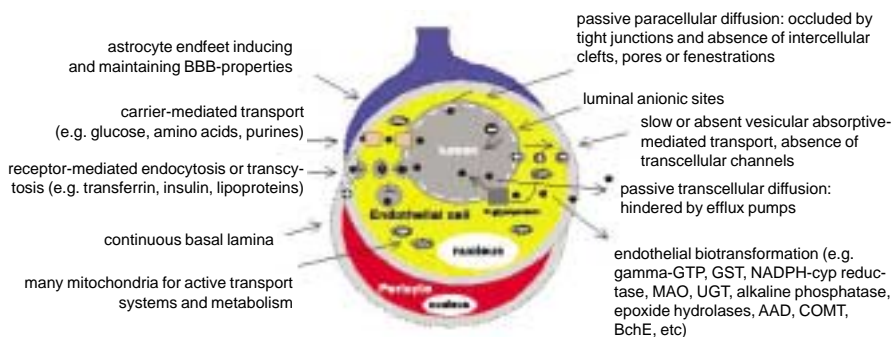


figuur 1. Een overzicht van de verschillende barrières in de hersenen. Stoffen kunnen de hersenen binnendringen via de BBB en de bloed-liquor barrière. Het ependyma bedekt het hersenweefsel en vormt daardoor een barrière voor het transport tussen het hersenweefsel en de liquor.

## EIGENSCHAPPEN VAN DE BBB

Het capillaire endotheel van de hersenen onderscheidt zich van endotheel in de rest van het lichaam. Het belangrijkste verschil is dat de openingen (*tight junctions*) tussen de cellen erg nauw zijn, er geen intercellulaire openingen (*fenestrae*) zijn, er vrijwel geen endocytose is, en dat de basaalmembraan continu is. De endotheelcellen hebben een negatief geladen oppervlak, waardoor de meeste plasma-eiwitten afgestoten worden. Ook bevatten ze veel enzymen die schadelijke stoffen kunnen afbreken. Daarnaast zitten er vele selectieve transportsystemen op het endotheel die essentiële stoffen naar de hersenen transporteren (zie figuur 2). Allemaal eigenschappen die bijdragen aan controle over het transport van stoffen vanuit het bloed naar de hersenen en *vice versa*. De endotheelcellen hebben veel mitochondria, het-

geen duidt op een grote energiebehoefte, want selectieve transportprocessen en afbraak (metabolisme) van stoffen, kosten energie. Daarnaast heeft de BBB een hoge elektrische weerstand (1500 - 2000 Ohm.cm<sup>2</sup>; Butt *et al*, 1990), hetgeen wordt veroorzaakt doordat de *tight junctions* van de endotheelcellen erg nauw zijn en het transport van stoffen (ook ionen) daardoor erg beperkt is. Dit geldt echter niet voor al het capillaire endotheel in de hersenen. In het bijzonder heeft het capillaire endotheel in de organen rondom de ventrikels (circumventriculaire organen), zoals de *area postrema* of de *mediale eminence* (Gross *et al*, 1986), intracellulaire openingen en is daardoor doorlaatbaar voor veel stoffen uit het bloed (Wilting en Christ, 1989). Door deze relatief kleine 'poorten' in de barrière communiceren de hersenen met de rest van het lichaam.



figuur 2. De verschillende eigenschappen en mogelijkheden voor transport van geneesmiddelen over de BBB, alsmede de lokalisatie van het P-glycoproteïne (Pgp)-effluxsysteem. Men kan hier onderscheiden: passief hydrofiel transport door de *tight junctions*, passief lipofiel transport door de endotheelcel, en adsorptie-, carrier-, en receptorgemedieerde transcytose (door de cel heen). Verder vindt enzymatische afbraak plaats in de cel en efflux van geneesmiddelen door het P-glycoproteïne. De astrocyten beïnvloeden eigenschappen van de BBB. Gamma-GTP = gamma-glutamyltranspeptidase, GST = glutathion S-transferase, NADPH-cyp reductase = NADPH-cytochroom P450 reductase, MAO = monoamine oxidases type A en B, UGT = UDP-glucuronosyltransferase, AAD = L-aminozuur decarboxylase, COMT = catechol-O-methyl transferase, BChE = butyryl-cholinesterase (Gaillard, 2000).

Het capillaire endotheel functioneert dus in feite als *interface* tussen het bloedcompartiment en het hersenweefsel en het wordt gekenmerkt door een groot aanpassingsvermogen (Augustin *et al*, 1994). Onderzoek heeft aangetoond dat capillaire hersendotheelcellen die samen met astrocyten in perifere weefsels worden getransplanteerd, BBB-karakteristieken krijgen (Janzer en Raff, 1987) en zonder astrocyten niet. Inmiddels is vast komen te staan dat astrocyten veel meer eigenschappen in het capillaire endotheel van de hersenen induceren dan alleen de vorming van nauwe *tight junctions* (Gaillard *et al*, 2000).

De huidige inzichten in de anatomische basis van de bloed-hersenbarrière zijn dat, in tegenstelling tot wat lang algemeen werd geaccepteerd, er geen sprake is van een statische homogene ondoorlaatbare barrière. De doorlaatbaarheid wordt dynamisch gereguleerd onder andere door perifere hormonen (bijv. cortisol, adre-

naline) en lokale factoren (bijv. cytokines, chemokines) hetgeen ondermeer tot uitdrukking komt in de doorlaatbaarheid van *tight junctions*. Bovendien zijn er verschillende cellen die het functioneren van de bloed-hersenbarrière kunnen beïnvloeden zoals gliacellen, pericyten, neuronen, en ook cellen van het immuunsysteem. Daarnaast speelt het endotheel ook een rol bij veel andere processen zoals het ontstaan en het weer oplossen van bloedstolsels, de controle van de vasotonus, het presenteren van antigenen voor immunologische reacties en bij de opbouw en het onderhoud van de basale membraan onder invloed van bijvoorbeeld groeifactoren (Fajardo, 1989; Pearson, 1991). Ook in pathologische condities zoals ontsteking, angiogenese (o.a. in tumoren), ischemie, Parkinson, Alzheimer, diabetes, AIDS-gerelateerde dementie en wondheling speelt het geactiveerde endotheel een belangrijke rol (Augustin *et al*, 1994). Het voorgaande illustreert, naast z'n transportfunctie, de verwevenheid van de bloed-hersenbarrière met de immunologische afweer en herstelprocessen.

Samenvattend kan worden gezegd dat het endotheel in samenhang met verschillende andere cellen en stoffen (o.a. hormonen) die in de capillairen aanwezig zijn, de fysiologische basis vormt voor de functionaliteit van de bloed-hersenbarrière als orgaan. Inzicht in de dynamiek van deze systemen en kennis van de fysisch-chemische eigenschappen, de farmacokinetiek en de farmacodynamie van geneesmiddelen, geeft de mogelijkheid om het transport van deze stoffen naar de hersenen te kunnen begrijpen en wellicht te verbeteren.

## GENEESMIDDELTRANSPORT OVER DE BBB EN NAAR DE HERSENEN

In tegenstelling tot het beperkte passieve transport van wateroplosbare stoffen vanuit het bloed via de *tight junctions* door de bloed-hersenbarrière, kunnen vetoplosbare stoffen gemakkelijk passief door de endotheelcellen van de BBB in de hersenen komen. Daarnaast zijn er verschillende andere mogelijkheden voor transport van stoffen door de bloed-hersenbarrière (zie figuur 2), zoals *fluid phase*-, adsorptie-, receptor- en carrier-gemedieerd transport. Bij *fluid phase* transport speelt de concentratie van het geneesmiddel ter plekke een rol, bij adsorptie de lading van het molecuul, terwijl bij receptor- en carrier-gemedieerd transport de stof op de receptor of carrier moet passen. Arginine, lysine en glucose worden bijvoorbeeld via membraangebonden carriers in de cel opgenomen en weer uitgescheiden, terwijl transferrine en insuline via een receptor worden opgenomen.

De ontdekking van de aanwezigheid van het P-glycoproteïne op het capillaire endotheel in de bloed-hersenbarrière (Cordon-Cardo *et al*, 1989; Hegman *et al*, 1992; Thiebaut *et al*, 1987; Zaman *et al*, 1996) heeft veel opgehelderd over de beperkingen van geneesmiddel transport naar de hersenen. Dit P(ermeability)-glycoproteïne (Pgp) is een 170 kDa glycoproteïne en behoort tot de superfamilie van de ATP-Binding-Casette (ABC) transporters en heeft dus ATP nodig om te kunnen functioneren (Higgins, 1986). Pgp wordt geëncodeerd door het MDR1-gen

en is op de bloed-hersenbarrière gelokaliseerd aan de luminale (bloed-) zijde van het endotheel. Het beperkt het transport van vele geneesmiddelen naar de hersenen. Het is een effluxpomp die een grote verscheidenheid aan vooral vetoplosbare geneesmiddelen, vaak met een positieve lading, en vele andere stoffen uit het endotheel-compartiment terugpompt in het bloed en daardoor de cel en het erachter liggende weefsel beschermt tegen te hoge concentraties van schadelijke stoffen. Het is medeverantwoordelijk voor het ontstaan van het fenomeen van multi-drug-resistentie (MDR) bij tumoren (Schinkel *et al*, 1994; Borst *et al*, 1993) waardoor steeds hogere doses cytostatica nodig zijn om een tumor adequaat te kunnen bestrijden. Ook non-cytostatica zoals anti-HIV geneesmiddelen en antidepressiva, worden effectief door het Pgp uitgescheiden (Schinkel *et al*, 1995; van der Sandt *et al*, 2001a). De werking van het Pgp kan worden geremd door stoffen, de zogenaamde *reversal agents*, zoals verapamil (vooral R-verapamil), cyclosporine A, SDZ PCS 833 en ook door verschillende peptiden (Gottesman, 1993; Ford, 1996).

Verder bestaat er ook multidrug resistentie zonder tussenkomst van het Pgp. Eén daarvan is het *multi-drug-resistance related protein* (MRP), een (190 kDa) molecuul (Barrand *et al*, 1994; Wijnholds *et al*, 2000; Borst *et al*, 1999, 2000). De MRP's pompen vooral lipofiele stoffen, vaak met een negatieve lading, naar buiten. Op het ogenblik zijn er van deze MRP's tenminste negen verschillende geïdentificeerd.

Samenvattend kan men zeggen dat het transport van stoffen/geneesmiddelen naar de hersenen wordt bepaald door de eigenschappen van deze stoffen/geneesmiddelen en door de aanwezigheid van influx- en efflux-transportsystemen op de bloed-hersenbarrière.

## DE INVLOED VAN ZIEKTEN (PATHOLOGIE) EN STOFFEN (FARMACODYNAMIEK) OP HET TRANSPORT (FARMACOKINETIEK) VAN GENEESMIDDELEN NAAR DE HERSENEN

De bloed-hersenbarrière kan meer permeabel worden voor stoffen uit het bloed onder invloed van verschillende ziekteprocessen zoals multiple sclerose (Williams en Hickey, 1994), Alzheimer (Mattila *et al*, 1994), AIDS-related dementia (Poland *et al*, 1995), inflammatie (Dray en Bevan, 1993), encephalitis en meningitis (Tunkel en Scheld, 1993), hoge bloeddruk, epileptische aanvallen en bij psychische afwijkingen (Black, 1994; Müller, 1995).

Eveneens kunnen cellen van het immuunsysteem, en cytokines, chemokines en andere hormonen het functioneren van de bloed-hersenbarrière zowel in positieve als in negatieve zin beïnvloeden. Met name stoffen zoals excitatoire aminozuren, radicaal-zuurstofverbindingen en radicaal-stikstofverbindingen, en pro-inflammatoire cytokines kunnen de bloed-hersenbarrière beschadigen. Verder zijn endotoxinen (bijv. lipopolysacchariden) betrokken bij ontstekingsprocessen die de doorlaatbaarheid van de bloed-hersenbarrière bij bacteriële infecties zoals meningitis, encephalitis en sepsis (bacteriën in het bloed) kunnen beïnvloeden (Boje, 1995). Op

cellulair niveau kunnen lipopolysacchariden de doorlaatbaarheid van de BBB veranderen via verschillende intra-cellulaire signaaltransductiewegen, waarbij vooral de vorming van overmaat *radical oxygen species* en stikstofmonoxide schadelijk is (Gaillard *et al*, 2003).

*In vivo* is aangetoond dat in ratten met experimentele allergische encephalomyelitis, een model voor multiple sclerose, het transport van een hydrofiele marker (fluoresceïne) naar de hersenen is toegenomen, terwijl na een intraveneuze toediening van lipopolysacchariden geen BBB-gerelateerde toename van dit transport wordt gemeten (de Vries *et al*, 1995). Hieruit zou de conclusie kunnen worden getrokken dat een via het bloed toegediende ontstekingsprikkel de doorlaatbaarheid van de bloed-hersenbarrière niet verandert, terwijl een ontstekingsproces op het niveau van de BBB zelf dat wel tot gevolg heeft.

#### TARGETING VAN GENEESMIDDELEN NAAR DE HERSENEN

De huidige geneesmiddelen die in de hersenen doordringen en hun werking daar uitoefenen, zijn relatief goed vetoplosbaar en klein (*small molecules*). Wateroplosbare en grote geneesmiddelen (bijv. eiwitten) kunnen slecht in de hersenen doordringen. Veel potentiële geneesmiddelen behoren tot deze categorie van stoffen. Ondanks het feit dat ze zeer effectief zijn, kunnen ze niet worden gebruikt omdat hun penetratie in de hersenen door de BBB wordt verhinderd. Er bestaan evenwel verschillende mogelijkheden om geneesmiddelen toch in de hersenen te krijgen. Dit kan door directe toediening in de hersenen, via de vertrikels of intrathecaal, zoals toegepast voor de toediening van cytostatica en pijnbestijding. Een andere manier is om door middel van osmotische disruptie met behulp van hoge concentraties mannitol (2 mol/l) de BBB te openen (Neuwelt en Rapoport, 1984). Door gelijktijdig geneesmiddelen intra-arterieel toe te dienen kunnen deze dan in de hersenen komen. Deze procedure is zeer belastend voor de patiënt en wordt daarom onder narcose uitgevoerd, voornamelijk bij de behandeling van maligne hersentumoren. Veel minder belastend is de toepassing *BBB drug targeting* met behulp van van niet-invasieve/endogene transportsystemen. Onder *drug targeting* wordt verstaan de selectieve en specifieke internalisatie van geneesmiddelen door een transportsysteem in een orgaan of weefsel. Op deze manier kunnen stoffen/geneesmiddelen selectief en specifiek naar de BBB/hersenen worden *getarget*. Meestal maakt men hierbij gebruik van carriers of receptoren (de Boer *et al*, 2003). Carriers zijn membraangebonden transporters die meestal relatief kleine moleculen kunnen transporteren (aminozuren, glucose en *look-alikes*). Receptoren kunnen grotere (eiwit)moleculen internaliseren en zijn dus aantrekkelijker voor het transport van grote peptiden en eiwitten maar ook voor antisense en genen (*biologicals*). Dergelijke receptoren zijn bijvoorbeeld de transferrine- en de insuline-receptor. Geneesmiddelen en andere stoffen kunnen aan transferrine of insuline gekoppeld worden, of aan antilichamen voor hun receptoren. Ook kunnen aan deze antilichamen liposomen worden gekoppeld waarin het geneesmiddel is

opgenomen. Op deze manier kunnen geneesmiddelen naar de BBB worden *getarget* om zo vervolgens naar het hersenweefsel te worden getransporteerd. De selectiviteit en specificiteit van *targeting* hangt af van aanwezigheid (expressie) van de receptoren. Zo komen de receptoren voor insuline en transferrine ook op andere plaatsen in het lichaam voor. Desalniettemin kunnen via deze transporters wateroplosbare en grote (eiwit) geneesmiddelen door de BBB worden geïnternaliseerd om vervolgens verder naar het hersenweefsel te worden getransporteerd, hetgeen voorheen niet mogelijk was. Een van de pioniers op het gebied van *drug targeting* naar de hersenen is Pardridge (2002). Hij heeft laten zien dat geneesmiddelen gekoppeld aan een antilichaam voor de transferrinereceptor (OX26) door het BBB-endotheel werden geïnternaliseerd. Effecten van ischemie kunnen in ratten sterk worden reduceerd door voorbehandeling met *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) gekoppeld aan OX26. Ook antisense- en *gentargeting* is op deze manier mogelijk gebleken, door oligonucleotiden 'verpakt' in een liposoom met behulp van een antilichaam voor de humane insuline-receptor naar de hersenen te *targeten* (Pardridge, 2002). *Gen-targeting*, waarvan de ethische aspecten en de veiligheid op het ogenblik ter discussie staan, biedt de mogelijkheid om 'defecte' genen te vervangen. Echter de functionaliteit en regulatie van deze genconstructen zal moeten worden verbeterd om gentherapie veilig toe te kunnen passen.

*Targeting* kan eveneens worden gebruikt voor diagnostische doeleinden (bijv. *brain-imaging*). Door radioactief amyloïd- $\beta$ 1-40 te koppelen aan het antilichaam voor de transferrinereceptor, kunnen Alzheimerplaques in de hersenen worden gevisualiseerd (Pardridge, 2002). Dit zou mogelijk (met andere liganden) ook voor andere hersenziekten kunnen worden toegepast.

De selectiviteit van *targeting* kan worden verbeterd door gebruik te maken van internaliserende receptoren die selectief en specifiek bij ziekteprocessen zoals inflammatie en in tumoren verhoogd tot expressie komen. Door toepassing van genomics and proteomics kunnen deze transportsystemen worden ontdekt. In dit verband hebben we een *spin-off* bedrijf ('to-BBB') opgericht met als missie om technologie te ontwikkelen en toe te passen om geneesmiddelen selectief en specifiek naar de hersenen te *targeten* waardoor de balans tussen werkzaamheid en veiligheid van de therapie zal kunnen worden verbeterd.

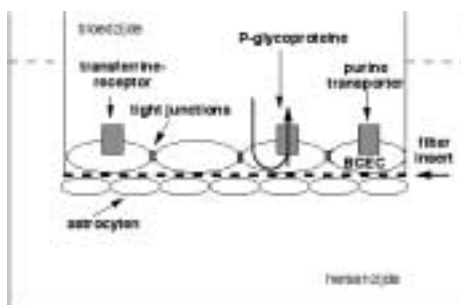
## BBB-ONDERZOEK

### DE ONTWIKKELING VAN EEN *IN VITRO* CELKWEKMODEL VOOR DE BBB

*In vitro* modellen voor de bloed-hersenbarrière bestaan uit kweken van endotheel dat geïsoleerd wordt uit bloedvaten uit de hersenen van bijvoorbeeld runderen of ratten. Dit capillaire endotheel wordt gebruikt om geneesmiddeltransport over de BBB te bestuderen, onafhankelijk van feedback of indirecte systemen die *in vivo* operationeel zijn. Verschillende BBB-systemen zijn in de loop der jaren ontwikkeld. Recent is een aantal van deze modellen in detail beschreven naar aanlei-

ding van een Concerted Action die was gefinancierd door de EEG (de Boer en Sutanto, 1997).

In ons laboratorium is een *in vitro* BBB-model ontwikkeld bestaande uit capillair endotheel geïsoleerd uit runderhersenen en astrocyten uit de hersenen van rattenpups (Gaillard *et al*, 2001; zie figuur 3). Vanwege de combinatie van celtypen wordt dit een 'co-kweek' model genoemd. Het co-kweekstelsel heeft een hoge elektrische weerstand van 300 - 600 Ohm.cm<sup>2</sup> en een geringe paracellulaire doorlaatbaarheid, hetgeen wil zeggen dat de *tight junctions* erg nauw zijn. Op grond hiervan wordt aangenomen dat dit een goed model is voor de BBB *in vivo*.



figuur 3. Een schematische weergave van het BBB co-kweekstelsel inclusief de lokalisatie van het P-glycoproteïne (Pgp) en andere transporters. Bovenop het filter groeit het capillaire endotheel en onderop de astrocyten; BCEC = capillaire endotheelcellen uit hersenen (naar Gaillard, 2000).

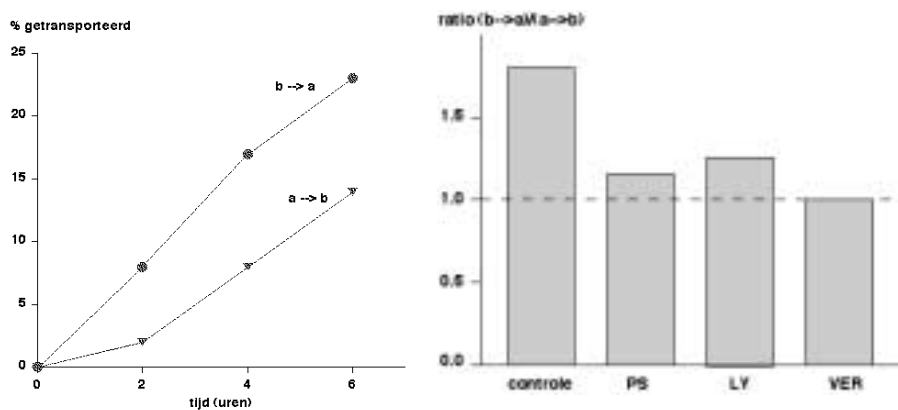
#### IN VITRO BBB-FARMACOKINETIEK: P-GLYCOPROTEÏNE EN GENEESMIDDELTRANSPORT OVER DE BBB

Het BBB-co-kweekstelsel brengt het eerder genoemde Pgp, dat allerlei farmaca de cel uit kan pompen, tot expressie (Gaillard *et al*, 2000). Dit is aangetoond door middel van Western blotting met het monoclonale antilichaam C219 en met transportstudies waarbij substraten voor Pgp inderdaad werden teruggepompt naar de bloedzijde. Figuur 4 laat zien dat amprenavir meer naar de bloedkant (apicaal, a) dan naar de hersenkant (basolateraal, b) wordt getransporteerd. Men noemt dit verschijnsel polariteit in transport. Pre-incubatie met Pgp-inhibitors (PSC-833; LY335979 en verapamil), doet de polariteit vrijwel verdwijnen, hetgeen tot resultaat heeft dat de concentratie van amprenavir in beide compartimenten nagenoeg gelijk wordt (van der Sandt *et al*, 2001a). Overeenkomstige resultaten werden gevonden na toediening van andere Pgp-substraten. In het bijzonder geldt voor HIV-protease-inhibitors, zoals amprenavir, ritonavir en indinavir, dat zij de BBB moeten passeren om effectief de replicatie van het HIV in de hersenen te kunnen remmen (Sawchuk en Yang, 1999). Adequate penetratie van HIV-protease-inhibitors in de hersenen is van groot belang bij de therapie met deze geneesmiddelen, omdat ook de infectie in de hersenen bestreden moet worden om reïnfectie vanuit het hersencompartiment te voorkomen. Bovendien is aangetoond dat bij AIDS-patiënten met een hoge virale belasting in de hersenen sneller neurologische afwijkingen optreden die uiteindelijk kunnen leiden tot AIDS-gerelateerde dementie



(DiStefano *et al*, 1998; Hurwitz *et al*, 1994). Bij deze patiënten is het dus gewenst om bij toediening van amprenavir tegelijkertijd het transport door de BBB te bevorderen. De *in vitro* experimenten geven aan dat dit misschien mogelijk is door gelijktijdige toediening van Pgp-inhibitoren.

Experimenten met muizen hebben laten zien dat de toegang van glucocorticoiden tot speciale hersengebieden zoals de hippocampus, afhankelijk is van Pgp-activiteit. Experimenten met *mdr1a*-Pgp-knock-out muizen toonden aan dat dexamethason en cortisol wél doordrongen in de hippocampus van *knock-out* muizen, maar niet in die van *wild-type* muizen (Meijer *et al*, 1998; Karssen *et al*, 2001, 2002). Dit suggereert dat de hippocampus wordt beschermd tegen penetratie van glucocorticoiden door Pgp, hetgeen een belangrijke regulatie zou kunnen betekenen met betrekking tot gedrag dat gestuurd wordt vanuit het hippocampusgebied.

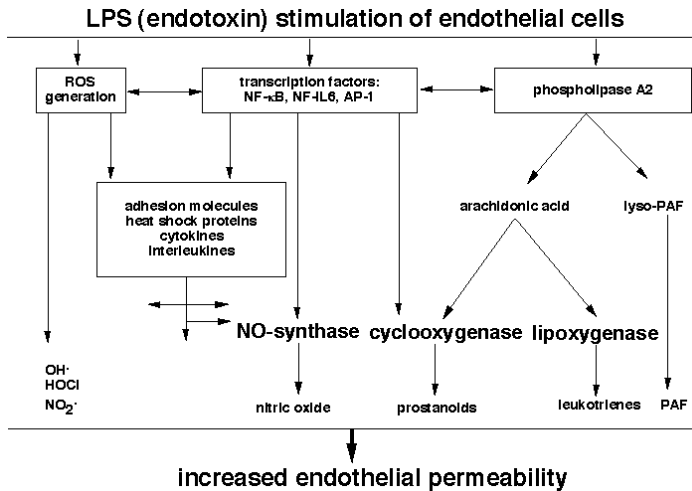


figuur 4. De polariteit van het BBB-transport van de HIV-protease-inhibitor amprenavir in het BBB co-kweekstelsel (links) en het afnemen (rechts) van de polariteit na voorbehandeling met de Pgp-inhibitoren SDZ PSC 833 (PSC), LY 335979 (LY) en verapamil (VER). a) is de bloedkant of apicaal, b) is de hersenkant of basolateraal (van der Sandt *et al*, 2001a).

## IN VITRO FARMACODYNAMIEK: DE BBB EN ZIEKTE

We hebben in het *in vitro* BBB co-kweekmodel de signaaltransductieroutes bestudeerd die betrokken zijn bij de permeabiliteitsverandering van de BBB na inflammatie zoals na stimulatie met LPS (lipopolysaccharide; Gaillard *et al*, 2003). Deze verschillende routes zijn aangegeven in figuur 5 en werden afzonderlijk of in verschillende combinaties geïnhibeerd. Concentratie-afhankelijke bescherming na LPS behandeling werd gevonden wanneer er werd voorbehandeld met glucocorticoiden. Deze stoffen remmen onder andere het fosfolipase-A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) en remmen expressie van genen, maar activeren ook genen die betrokken zijn bij cellulaire

bescherming en herstel. Monolagen van capillair hersendotheel waren veel minder bestand tegen zo'n LPS-prikkel dan co-kweken en herstelden minder goed. Dit kan geheel worden toegeschreven aan de afwezigheid van astrocyten in de modellen met monolagen. Inhibitie van cyclo-oxygenase en lipoxygenase gaf geen bescherming tegen een LPS-prikkel. Hieruit mag worden geconcludeerd dat andere signaaltransductieroutes dan die via cyclo-oxygenase en lipoxygenase een rol spelen bij het ontstaan van celschade.



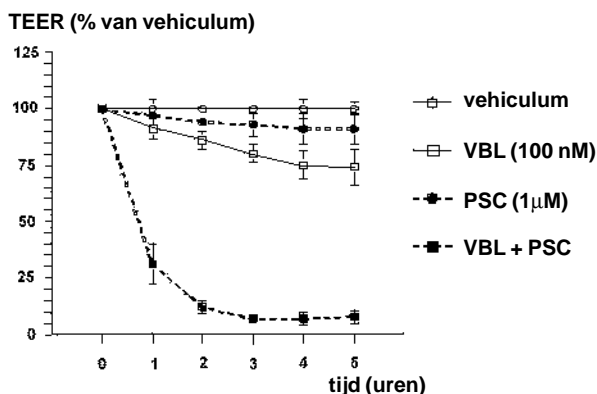
figuur 5. De verschillende signaaltransductie- routes in het endotheel en de intracellulaire intermediairen die betrokken zijn bij de verandering van de permeabiliteit van het endotheel na stimulatie door lipopolysaccharide (LPS). LPS = lipopolysaccharide, ROS = radicaal zuurstof verbindingen, NF-κB = nuclear factor-kappa-B, NF-IL6 = nuclear factor-interleukine-6, AP-1 = activatie-factor-1, PAF = bloedplaatjes-activeringsfactor (Gaillard, 2000).

Na een LPS-stimulus worden stikstofmonoxide (NO) en superoxide-anion ( $O_2^-$ ) gevormd door het BBB-endotheel. Deze producten kunnen allebei de (paracellulaire) BBB-permeabiliteit doen toenemen. Experimenten met behulp van 'enkelvoudige' scavengers als deferroxamine (dat bindt  $Fe^{3+}$  dat nodig is voor de omzetting van  $H_2O_2$  in OH-radicalen, de zgn. Fenton-reactie), urinezuur (bindt peroxydriet) en monomethyl-L-arginine acetaat (NMMA; inhibeert NO-synthase), gaven geen bescherming te zien tegen een LPS-prikkel. Voorbehandeling met N-acetyl-cysteïne (NAC; bindt zowel NO als  $O_2^-$ ) beschermde echter volledig tegen een LPS-prikkel (Gaillard *et al*, 2003) Dit geeft de mogelijkheid om BBB-schade te voorkomen tijdens inflammatie terwijl dit eveneens bij radicaal-gemedieerde schade in andere organen zou kunnen helpen.

## IN VITRO BBB FARMACODYNAMIEK: PGP EN VINBLASTINE-ACCUMULATIE IN DE BBB

Een speciale toepassing van het BBB-co-kweekmodel is de mogelijkheid om vast te stellen of een stof een Pgp-substraat is zonder gebruik te maken van een chemische analysemethode (Gaillard *et al*, 2000). Deze zogeheten vinblastine-exclusie-test maakt gebruik van de farmacodynamische eigenschappen van vinblastine, in het bijzonder de eigenschap om microtubuli af te breken. Dit gebeurt vooral wanneer de efflux door Pgp is geïnhibeerd door een inhibitor (bijv. PSC 833) of door competitie met een andere stof die wordt uitgescheiden. Onder dergelijke omstandigheden neemt de concentratie van vinblastine in de cel toe waardoor de integriteit van het cytoskelet van de cel afneemt. Dit is waarneembaar door een verandering in de elektrische weerstand over het co-kweekstelsel door opening van de tight junctions (zie figuur 6). Zo zijn bijvoorbeeld  $IC_{50}$ -waarden te bepalen voor de interactie van onbekende stoffen met Pgp. Inmiddels is ook *in vivo* bij ratten vastgesteld dat na gelijktijdige toediening van de Pgp-inhibitor PSC 833 en vinblastine de doorlaatbaarheid van de BBB toeneemt (van der Sandt *et al*, 2001b).

figuur 6. De afname in de transendotheliale elektrische weerstand (TEER) van het BBB co-kweekstelsel is een maat voor de paracellulaire doorlaatbaarheid van de BBB. Vinblastine (VBL) of PSC 833 (PSC; een Pgp-inhibitor) alleen 'opent' de BBB slechts weinig. Echter na gecombineerde toediening van VBL en PSC 833 wordt de BBB afgebroken en 'lek' (Gaillard *et al*, 2000).



## IN VITRO DRUG TARGETING NAAR DE BBB/HERSENEN

Recent hebben wij het transferrine (Tf)-transportsysteem gekarakteriseerd in het *in vitro* BBB-model (Visser *et al*, 2003). De expressie kon worden opgeregeerd door voorbehandeling met deferoxamine, en deze opregulatie werd niet beïnvloed door inflammatoire condities. Dit betekent dat deze receptor constant beschikbaar is voor het *targeten* van geneesmiddelen onder inflammatoire condities.

Vervolgexperimenten hebben laten zien dat *horseradish peroxidase* (HRP; mol gewicht  $\approx$  40 kDa) gekoppeld aan Tf door de *in vitro* BBB selectief werd geïnternaliseerd, waarbij een overmaat ongebonden Tf in staat was om de opname tot controlewaarden terug te brengen. Deze experimenten tonen aan dat op deze manier

geneesmiddelen als Tf-conjugaat naar de BBB kunnen worden *getarget* om vervolgens te worden geïnternaliseerd. Samen met prof. DJA Crommelin (Univ. Utrecht) worden op dit moment liposomale systemen ontwikkeld die geschikt zijn om geneesmiddelen naar de BBB/hersenen te *targeten*. Deze technologie kan worden gebruikt om veel potentiële CNS-geneesmiddelen, die niet in de hersenen kunnen doordringen, toch daar te krijgen.

## TOT SLOT

De term bloed-hersenbarrière geeft een functie aan van een orgaan, waarin allerlei mechanismen en systemen een rol spelen die zowel lokaal als in de tijd operationeel zijn: zo kunnen gespecialiseerde transportprocessen geremd of gestimuleerd worden door lokale processen zoals inflammatie. Dit maakt het erg moeilijk om te voorspellen voor individuele farmaca of deze wèl of niet de bloed-hersenbarrière kunnen passeren onder pathologische condities. In een nieuw ontwikkeld celkweekmodel is het mogelijk om de farmacokinetische en farmacodynamische aspecten van het transport van geneesmiddelen door de BBB te bestuderen, ook onder condities zoals inflammatie. Gebruikmakend van dit model kon bijvoorbeeld worden vastgesteld dat bescherming tegen een lipopolysaccharideprikkel kon worden verkregen door behandeling met glucocorticoïden en N-acetylcysteïne.

Specifieke testen kunnen aantonen of een stof door Pgp over de bloed-hersenbarrière wordt teruggetransporteerd naar het bloed, een lot dat verschillende HIV-proteaseremmers maar ook andere geneesmiddelen beschoren is. Dit Pgp voorkomt dat hoge concentraties van toxische verbindingen via het BBB-endotheel in de hersenen komen en het voorkomt daarmee schade in neuronen. Ook MRP's zorgen voor een soortgelijke bescherming van neuronen in de hersenen tegen schadelijke stoffen. Niet overal in de hersenen zullen precies dezelfde transporters met een dergelijke functie aanwezig zijn. Bovendien zullen deze verschillende transporters niet allemaal dezelfde (schadelijke) stoffen buiten de deur houden. Deze transporters vormen maar een klein deel van een groot aantal mechanismen waarmee het transport van stoffen van bloed naar de hersenen wordt geregeld.

Met behulp van het hier beschreven celkweekmodel kan van iedere stof worden voorspeld hoe gemakkelijk het de bloed-hersenbarrière onder bepaalde omstandigheden kan passeren.

Het BBB-co-kweekmodel maakt het mogelijk methoden te ontwikkelen om geneesmiddelen toch langs deze barrière te sluizen. In het bijzonder kan men receptorgemedieerde geneesmiddel-*targeting* via de BBB naar de hersenen bestuderen. Het liefst zou men dan gebruik willen maken van receptoren die alleen tijdens een ziekteproces op de bloed-hersenbarrière aanwezig zijn zodat geneesmiddelen selectief naar de hersenen kunnen worden getransporteerd en minder naar andere organen en weefsels.

## REFERENTIES

- Augustin HG, Kozian DH en Johnson RC. Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *BioEssays* 1994; 16: 901-906.
- Barrand MA, Heppell-Parton AC, Wright KA, Rabbitts PH en Twentyman PR. A 190-kilodalton protein overexpressed in non-P-glycoprotein-containing multidrug-resistant cells and its relationship to the MRP gene. *J Natl Cancer Inst.* 1994; 86: 110-117.
- Black PH/ Central nervous system-immune systems interactions: psychoneuroendocrinology of stress and its immune consequences. *Antimicrob Agents Chemotherap* 1994; 3: 1-6.
- Boje KM, Cerebrovascular permeability changes during experimental meningitis in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 274: 1199-1203.
- Borst P, Schinkel AH, Smit JM, Wagenaar E, van Deemter L, Smith AJ, Eijdemans EWHM, Baas F en Zaman GJR. Classical and novel forms of MDR, and the physiological functions of P-glycoproteins in mammals. *Pharmacol Ther* 1993; 60: 289-299.
- Borst P, Evers R, Kool M en Wijnholds J. The multidrug resistance protein family. *BBA* 1999; 1461: 347-357
- Borst P, Evers R, Kool M en Wijnholds J. A family of drug transporters: the multidrug resistance associated protein. *J Natl Canc Inst* 2000; 92: 1295-1302.
- Brightman MW en Reese TS. Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol* 1969; 40: 648-677.
- Butt AM, Jones HC en Abbott NJ. Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *J Physiol* 1990; 429: 47-62.
- Cordon-Cardo C, O'Brien JPO, Casals D, Rittman-Grauer L, Biedler JL, Melamed MR en Bertino JR. Multidrug resistance gene, (P-glycoprotein), is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 695-698.
- de Boer AG, van der Sandt ICJ en Gaillard PJ. The role of drug transporters at the BBB. *Ann Rev Pharmacol Tox* 2003; 43: 629-656.
- de Boer AG en Sutanto W (eds). *Drug Transport across the Blood-Brain Barrier: new experimental strategies*. Harwood Scientific Publisher, Amsterdam, 1997.
- de Vries HE, Eppens EF, Prins M, Kuiper J, van Berkel ThJC, de Boer AG en Breimer DD. Blood-brain barrier permeability during experimental allergic encephalomyelitis and acute septic shock. *Pharm Res* 1995; 12: 1932-1936.
- DiStefano M, Monno L, Fiore JR, Buccoliero G, Appice A, Perulli LM, Pastore G en Angarano G. Neurological disorders during HIV1 infection correlate with viral load in cerebrospinal fluid but not with virus phenotype. *AIDS* 1998; 12: 737-743.
- Dray A en Bevan S. Inflammation and hyperalgesia: highlighting the team effort. *TIPS* 1993; 14: 287-290.
- Ehrlich P. *Das Sauerstoffbeduerfnis des Organismus; eine farbenanalytische Studie*. Hirschwald, Berlin, 1885.
- Fajardo LF. The complexity of endothelial cells. *Am J Clin Pathol* 1989; 92: 241-250.
- Ford JM. Experimental reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by pharmacological chemosensitizers. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 991-1001.
- Gaillard PJ. Characteristics of the Blood-Brain Barrier in vitro: interplay between its physiology, pharmacology and pathophysiology. Ph.D-thesis, University of Leiden, The Netherlands, 2000.
- Gaillard PJ, van der Sandt ICJ, Voorwinden LH, Vu D, Nielsen JL, de Boer AG en Breimer DD. Astrocytes increase the functional expression of P-glycoprotein in an in vitro model of the blood-brain barrier. *Pharm Res* 2000; 17: 1198-1205.
- Gaillard PJ, Voorwinden LH, Nielsen JL, Ivanov A, Atsumi R, Engman H, Ringbom C, de Boer AG en Breimer DD. Establishment and functional characterization of an in vitro model of the blood-brain barrier, comprising a co-culture of brain capillary endothelial cells and astrocytes. *Eur J Pharm Sci* 2001; 12: 215-222.
- Gaillard PJ, De Boer AG en Breimer DD. Pharmacological investigations on lipopolysaccharide-induced permeability changes in the blood-brain barrier in vitro. *Microvasc Res* 2003; 65:24-31.
- Goldmann EE. Vitalfarbung am Zentralnervensystem. *Abh Preuss Akad Wiss, Phys-Math Kl* 1913; I: 1 - 60.
- Gottesman MM. How cancer cells evade chemotherapy: sixteenth Richard and Hindo Rosenthal Foundation Award Lecture. *Cancer Res* 1993; 53: 747-754.

- Gross PM, Sposito NM, Pettersen SE en Fenstermacher JD. Differences in function and structure of the capillary endothelium in grey matter, white matter and a circumventricular organ of rat brain. *Blood Vessels* 1986; 23: 261-270.
- Hegmann EJ, Bauer HC en Kerbel S. Expression and functional activity of P-glycoprotein in cultured cerebral capillary endothelial cells. *Cancer Res* 1992; 52: 6969-6975.
- Higgins CF, Hiles ID, Salmonel GPC, Gill DR, Downie JA, Evans II, Holland IB, Gray L, Buckel SD, Bell AW en Hermodson MA. A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature (Lond.)* 1986; 323: 448-450.
- Hurwitz AA, Berman JW en Lyman WD. The role of the blood-brain barrier in HIV infection of the central nervous system. *Adv Neuroimmunol* 1994; 4: 249-256.
- Janzer RC en Raff MC. Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* 1987; 325: 253-257.
- Karszen AM, Meijer OC, van der Sandt ICJ, Lucassen PJ, de Lange ECM, de Boer AG en de Kloet ER. Multidrug resistance P-glycoprotein hampers the access of cortisol but not of corticosterone to mouse and human brain. *Endocrinology* 2001; 142(6): 2686-2694.
- Karszen AM, Meijer OC, van der Sandt ICJ, de Lange ECM, de Boer AG en de Kloet ER. The role of the efflux transporter P-glycoprotein in brain penetration of prednisolone. *Endocrinology* 2002; 175: 251-260.
- Mattila KM, Pirtilä T, Blennow K, Wallin A, Vitanen M en Frey H. Altered blood-brain barrier function in Alzheimer's disease? *Acta Neurol Scand* 1994; 89: 192-198.
- Meijer OC, de Lange ECM, Breimer DD, de Boer AG en de Kloet ER. Penetration of dexamethasone into brain glucocorticoid targets is enhanced in *mdr1a*-P-glycoprotein knock out mice. *Endocrinology* 1998; 139: 1789-1793.
- Müller N. Psychoneuroimmunology: implications for the drug treatment of psychiatric disorders. *CNS Drugs* 1995; 4: 125-140.
- Neuwelt EA and Rapoport SI. Modifications of the blood-brain barrier in the chemotherapy of malignant brain tumors. *Fed Proc* 1984; 43: 214-19.
- Pardridge WM. Drug and gene targeting to the brain with molecular trojan horses. *Nat Rev Drug Disc* 2002; 11: 131-139.
- Pearson JD. Endothelial cell biology. *Radiology* 1991; 179: 9-14.
- Poland SD, Rice GPA, en Dekaban GA. HIV-1 Infection of human brain-derived microvascular endothelial cells in vitro. *J Acq Immune Def Syndr Human Retrovir* 1995; 8: 437-445.
- Sawchuk RJ en Yang Z. Investigation of distribution, transport and uptake of anti-HIV drugs to the central nervous system. *Adv Drug Deliv Rev* 1999; 39, 5-31.
- Schinkel AH, Smit JIM, van Tellingen O, Beijnen JH, Wagenaar E, Van Deemter L, Mol CAAM, van der Valk MA, Robanus-Maandag EC, te Riele HPI, Berns AJM en Borst P. Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 1994; 77: 491-502.
- Schinkel AH, Wagenaar E, Mol CAAM en van Deemter L. P-glycoprotein in the blood-brain barrier controls the brain penetration and thus the clinical use of many drugs. *J Clin Invest* 1995; 96: 1698-1705.
- Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I en Willingham MC. Cellular localization of the multidrug resistance gene product in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 7735-7738.
- Tunkel A en Scheld WM. Pathogenesis and pathophysiology of bacterial meningitis. *Ann Rev Med* 1993; 44: 103-120.
- van der Sandt ICJ, Vos CMP, Nablusi L, Blom-Roosemalen MCM, Voorwinden LH, de Boer AG en Breimer DD. Assessment of active transport of HIV protease inhibitors in various cell lines and in the in vitro blood-brain barrier. *AIDS* 2001a; 15:483-491.
- van der Sandt IC, Gaillard PJ, Voorwinden LH, de Boer AG en Breimer DD. P-glycoprotein inhibition leads to enhanced disruptive effects by anti-microtubule cytotostatics at the in vitro blood-brain barrier. *Pharm Res* 2001b; 18:587-92.
- Visser CC, Voorwinden LH, Danhof M en de Boer, AG. NDRF-research programme: NDRF-research programme, registration number: 014-80-003, comprising the "Targeting of corticotrophin releasing hormone receptor anti-sense probes to and in the central nervous system: application in psychiatry (Prof. D. Hoekstra, Univ. Groningen; Solvay Pharmaceuticals B.V. and collaboration with Prof. D.J.A. Crommelin, University of Utrecht), 2003.
- Wijnholds J, de Lange ECM, Scheffer GL, van den Berg D-J, Mol CAAM, van der Valk M, Schinkel AH,

- Scheper RJ, Breimer DD en Borst P. Multidrug resistance protein 1 protects the choroid plexus epithelium and contributes to the blood-cerebrospinal fluid barrier. J Clin Invest 2000; 105: 279-285.*
- Williams KC en Hickey WF. Immunology of multiple sclerosis. Clin Neurosci 1994; 2: 229-245.*
- Wilting J en Christ B. An experimental and ultrastructural study on the development of the avian choroid plexus. Cell Tissue Res 1989; 255: 487-494.*
- Zaman GJ, Cnubben NH, van Bladeren PJ, Evers R en Borst P. Transport of the glutathione conjugate of ethacrynic acid by the human multidrug resistance protein MRP. FEBS-Lett 1996; 391: 126-30.*



Ingrid (G.) Molema (1964) studeerde Farmacie aan de Rijksuniversiteit Groningen (RuG). Na haar promotie in 1992 binnen de werkgroep Farmacokinetiek en Drug Delivery, werkte ze gedurende 2 jaar in het Cancer Immunobiology Center van de UT Southwestern Medical Center in Dallas TX, USA. Aldaar maakte ze kennis met tumorbloedvat-gerichte drug targeting strategieën. Vanaf 1995 was ze bij de RuG werkzaam als fellow van de Koninklijke Nederlandse Akademie voor Wetenschappen (KNAW) en heeft ze de Endotheel-onderzoekslijn opgezet. Sinds 2000 is zij universitair hoofddocent in de werkgroepen Farmacokinetiek en Drug Delivery (tot 2002) en de sectie Medische Biologie van de Faculteit Medische Wetenschappen.

Speerpunt van het wetenschappelijk onderzoek is het ontwikkelen van endotheel-gerichte drug targeting strategieën en het beter in kaart brengen van het gedrag van endotheelcellen in het lichaam. Niet alleen endotheel-gedrag gedurende ziekte-ontwikkeling, maar ook reactie op therapeutische interventie wordt onderzocht. Middels dit onderzoek zullen in de toekomst onder andere nieuwe moleculaire doelwitten voor therapie kunnen worden geïdentificeerd.

Als docent heeft Molema geparticipeerd in diverse cursussen voor studenten farmacie, bij/nascholingscursussen voor apothekers en medisch specialisten. Tevens is ze sinds 2001 als curriculumcommissielid en docent medeverantwoordelijk voor de vormgeving en kwaliteit van het onderwijs in de nieuwe bacheloropleiding Life Science & Technology van de RuG.



## G Molema

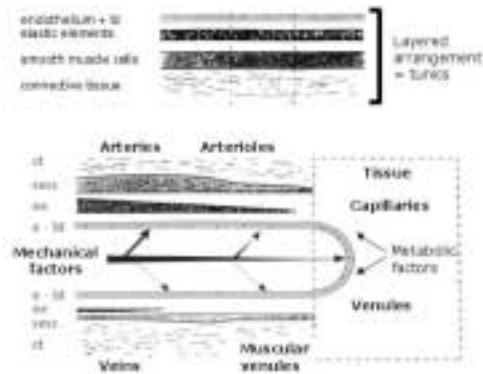
Vasculaire endotheelcellen bekleden de binnenkant van de bloedvaten. Hun actieve rol bij de start en continuering van ontstekingsreacties, en hun goede bereikbaarheid voor geneesmiddelen via het bloed maken endotheelcellen ideale doelwitcellen voor de therapie van chronische ontstekingsziekten. Naast het ontwikkelen van nieuwe geneesmiddelen die selectief ingrijpen op processen in endotheelcellen tijdens ontstekingsreacties, wordt intensief gewerkt aan het ontwikkelen van zogenaamde *drug-targeting*constructen. Deze constructen kunnen geneesmiddelen, en meer algemeen, farmacologisch actieve verbindingen, specifiek afleveren in de endotheelcellen in de ontstekingshaard. Hierdoor worden bijwerkingen elders in het lichaam voorkomen. Daarnaast kan actieve aflevering van geneesmiddelen in de cel leiden tot een groter farmacologisch effect omdat de concentratie van het geneesmiddel die bereikt kan worden op de plaats van werking hoger is dan bij gift van het vrije geneesmiddel. In onderstaand overzicht zal aandacht worden besteed aan de rol van endotheelcellen in fysiologische processen en in ontstekingsziekten, de tot nu toe ontwikkelde endotheelcelspecifieke drug targeting constructen, en nieuwe uitdagingen in dit onderzoek.

### FUNCTIES VAN ENDOTHEELCELLEN

Bloedvaten zijn opgebouwd uit diverse celtypes en verschillende soorten collageen en andere extracellulaire matrix (glyco)proteïnen. Afhankelijk van hun ligging in het lichaam, en hun functie, varieert de samenstelling van het bloedvat aanzienlijk, zoals is weergegeven in figuur 1. Lange tijd werden bloedvaten beschouwd als transportbuizen met als enige functie het vervoeren van bloed door het lichaam. In de laatste decennia is echter duidelijk geworden dat de cellen die tesamen een bloedvat vormen, dit wil zeggen endotheelcellen, pericyten, gladde spiercellen en fibroblasten, belangrijke fysiologische functies vervullen en betrokken zijn bij een groot aantal pathofysiologische processen.

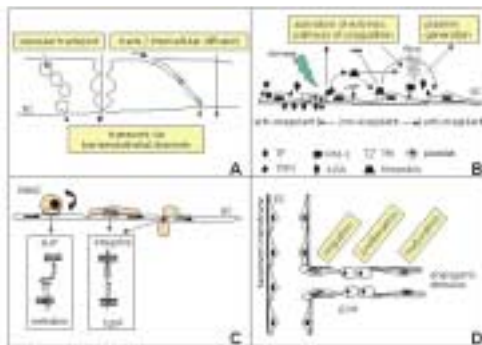
Endotheelcellen zijn cellen die de binnenkant van de bloedvaten bekleden en in direct contact staan met het bloed. Zij zijn actief betrokken bij transport van eiwitten en andere moleculen vanuit het bloed naar de onderliggende weefsels (figuur 2A), zij reguleren de lokale bloedstolling (figuur 2B), en zij spelen een belangrijke rol tijdens ontstekingen bij het aantrekken van immuuncellen of leukocyten vanuit het bloed naar de weefsels (figuur 2C).

<sup>1</sup> dit hoofdstuk is in gewijzigde vorm eerder gepubliceerd als: Molema G, Asgeirsdottir SA en Kok RJ. Conceptuur 2003; maart 2003: 9-11.



figuur 1. Schematische weergave van de opbouw van bloedvaten. In het algemeen zijn bloedvaten opgebouwd uit verschillende lagen, de tunicae. Direct in contact met het bloed staan de endotheelcellen, met direct daaronder de basale lamina (bl). Hieronder bevinden zich elastische elementen (ee) en daaronder gladde spiercellen (smc) en bindweefsel (ct). Afhankelijk van de plaats in het lichaam en de plaats in het orgaan kan de opbouw van de bloedvaten en de functie van de verschillende cellypen hierin variëren.

Daarnaast zijn endotheelcellen onder andere in wondgenezing en ontstekingen actief betrokken bij nieuwvorming van bloedvaten, of *angiogenese* (figuur 2D), waarmee ze voldoen aan de continue vraag naar voedingsstoffen en afvoer van afvalstoffen. Afhankelijk van hun plaats in het lichaam, en de plaats binnen het orgaan, komen bepaalde functies van de endotheelcellen meer of minder tot uitdrukking.



figuur 2. De vier belangrijkste functies van endotheelcellen in normale fysiologische en pathofysiologische processen in het lichaam. A) transport van diverse stoffen vanuit het bloed naar onderliggende weefsels; B) regulatie van anti-coagulant / pro-coagulant balansen; C) recruterings van leukocyten naar onderliggende weefsels door expressie van adhesiemoleculen, cytokines, chemokines en enzymatische activiteit; D) nieuwvorming van bloedvaten uit bestaande door middel van angiogene 'sprouting' (Griffioen en Molema, 2000).

## ENDOTHEELCELACTIVATIE TIJDENS ONTSTEKINGEN

Tijdens ontstekingen, die onder andere geïnduceerd kunnen worden door virale en bacteriële infecties, komt het endotheel in de kleinere bloedvaten ter plekke van de ontsteking onder invloed te staan van cytokines, chemokines en groeifactoren. Deze factoren binden aan receptoren in de membraan van de endotheelcel, als gevolg waarvan een breed scala aan genen qua expressie positief dan wel negatief beïnvloed wordt. Deze regulatie van genexpressie vindt plaats door middel van complexe eiwitssystemen, die tezamen de intracellulaire signaaltransductieroutes vormen. Signaaltransductieroutes beginnen meestal bij de celmembraan en eindigen met de activatie van transcriptiefactoren die in de celkern de transcriptie van

genen controleren. De genproducten zorgen er vervolgens voor dat de cellen op het juiste moment de gewenste functies kunnen uitvoeren.

Bekende inflammatiegerelateerde signaaltransducerende eiwitten en transcriptiefactoren zijn *p38 mitogen activated protein kinase* (p38 MAPK), *nuclear factor k B* (NFkB), en *activating protein-1* (AP-1). Activatie van deze factoren leidt in endotheelcellen onder andere tot transmembraanexpressie van de celadhesiemoleculen E-selectine, *vascular cell adhesion molecule* (VCAM)-1 en *intercellular adhesion molecule* (ICAM)-1, en de productie van cytokines zoals interleukine (IL)-6, IL-8 en *monocyte chemotactic protein* (MCP)-1. Het zijn adhesiemoleculen en cytokines die de cellen van het immuunsysteem uit het bloed naar de onderliggende weefsels geleiden (zie ook figuur 2C). Het afwezig zijn van, of remming van de functie van dit soort eiwitten in zogenaamde 'knock-out' en transgene muizen heeft laten zien dat ze essentieel zijn voor een efficiënte rekrutering van leukocyten naar de plaats van ontsteking. Vergelijkbaar met adhesiemolecuul-'knock-out' muizen is de situatie in patiënten met zogenaamde *leukocyte adhesion deficiency* (LAD) type I-deficiëntie. Zij missen een integrine op de membraan van hun leukocyten, waardoor deze minder goed aan het ICAM-1 op het endotheel kunnen binden. Tijdens een ontsteking vindt dientengevolge een minder efficiënte leukocyten-rekrutering plaats, waardoor deze patiënten vaker last hebben van bacteriële infecties. Al deze observaties bevestigen dat de gecoördineerde expressie van adhesiemoleculen, cytokines en chemokines en hun tegenstructuren op zowel endotheelcellen als cellen van het immuunsysteem essentieel is voor een goede afweerreactie.

Nadat de ontstekingsinducerende prikkel (bijv. een virus of bacterie) is opgeruimd door de cellen van het immuunsysteem, neemt de lokale productie van cytokines en chemokines af. De nog aanwezige leukocyten worden door middel van geprogrammeerde celdood (*apoptose*) geëlimineerd en het endotheel raakt gedeactiveerd. In het geval van chronische ontstekingsziekten zoals reumatoïde artritis, chronische darmziekten (*inflammatory bowel disease*) en atherosclerose, blijven de prikkels tot activatie echter bestaan. Er worden continu cytokines gemaakt en het endotheel blijft adhesiemoleculen, cytokines en chemokines maken en daarmee leukocyten aantrekken. Onderzoek naar de oorzaken van de continue activatie zal de basis vormen voor toekomstige therapieën die kunnen voorkomen dat de ziekte ontstaat. Op dit moment echter is de enige mogelijkheid voor therapie het ingrijpen in de activatieprocessen die 'downstream' van de oorzaak van de ziekte liggen. Therapeutisch ingrijpen gebeurt op het niveau van:

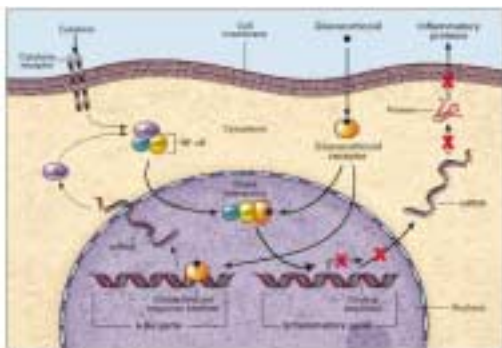
1. celactivatie in het algemeen (bijv. door remming van TNF $\alpha$  door middel van infliximab en etanercept);
2. leukocytenactivatie en -proliferatie (door bijv. cyclosporine A en methotrexaat);
3. de interactie tussen leukocyten en endotheelcellen (door bijv. antilichamen gericht tegen de adhesiemoleculen op één van beide of beide celtypen);
4. endotheelcelactivatie.

Omdat de endotheelcellen belangrijk zijn in de patho(fysio)logie van chronische ontstekingsziekten vormen ze een aantrekkelijk doelwit voor therapeutische interventie (Griffioen en Molema, 2000). Het direct in contact staan met het bloed maakt ze tevens uitermate goed bereikbaar voor systemisch toegediende geneesmiddelen.

## GENEESMIDDELEN DIE ENDOTHEELACTIVATIE KUNNEN REMMEN

Inzicht in hun functioneren én dysfunctioneren in ontstekingsziekten heeft de afgelopen jaren geleid tot intensivering van onderzoek naar de ontwikkeling van geneesmiddelen die endotheelcelactivatie kunnen remmen. Diverse nieuwe geneesmiddelen zijn ontwikkeld die ingrijpen op de hierboven beschreven signaaltransductieroutes. Omdat deze routes aanleiding geven tot de productie van meerdere eiwitten (adhesiemoleculen en cytokines en chemokines), leidt farmacologische interventie in dergelijke routes tot remming van de productie van een combinatie van ziektebepalende eiwitten. Hiermee wordt het mogelijk complexe redundante systemen die actief zijn tijdens ziekteprocessen in hun geheel te blokkeren.

Van de reeds lang in gebruik zijnde geneesmiddelen weten we sinds enkele jaren dat de corticosteroïden sterke remmers van de NFκB-sigtaaltransductie zijn. Niet alleen verstoren ze de NFκB-translocatie naar de kern, ze blokkeren in de kern ook transcriptiecomplexen die zorgdragen voor de productie van pro-inflammatoire genproducten. Daarnaast induceren ze transcriptie van IκB, de *inhibitor* van NFκB. IκB complexeert met NFκB-eiwitten en blokkeert daarmee de NFκB-gemedieerde gentranscriptie (figuur 3). Recent hebben we aangetoond dat in endotheelcellen de genexpressie-niveaus van een groot aantal door *tumor necrosis factor* (TNF)α opgereguleerde genen met het corticosteroid dexamethason werden geremd (Asgeirsdottir *et al*, 2003). Ook in patiënten met *inflammatory bowel disease* bleek behandeling met corticoïden te leiden tot remming van NFκB-activiteit en expressie van pro-inflammatoire cytokines in de aangedane weefsels (Ardite *et al*, 1998; Thiele *et al*, 1999).



figuur 3. Corticosteroiden kunnen via diverse moleculaire interacties de NFκB-gemedieerde signaaltransductie in endotheelcellen remmen. Na binding aan de glucocorticoidreceptor kan het p50/p65 NFκB eiwit worden gecompliceerd, als gevolg waarvan binding van p50/p65 NFκB aan DNA elementen wordt voorkomen. Ook kan transcriptie-activatie door andere transcriptiefactoren worden geblokkeerd. Deze blokkades leiden tot verminderde productie van pro-inflammatoire eiwitten. Corticosteroiden kunnen echter ook direct de transcriptie van anti-inflammatoire genen induceren, door directe binding van het corticosteroidreceptor complex aan specifieke elementen in het DNA van deze anti-inflammatoire genen. Op deze manier

induceren corticosteroiden de productie van IκB, de endogene inhibitor van NFκB (naar Barnes and Karin, 1997, aangepast figuur).

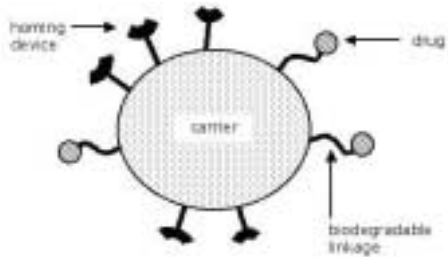
Een andere groep van signaaltransductieremmers voor therapie van ontstekingen waar klinische ervaring mee is zijn de pyridinylimidazolonen. Deze geneesmiddelen vertonen een sterke selectiviteit voor het p38 MAPK-enzym dat onder andere geactiveerd is in endotheelcellen in de laesies van reumatoïde-artritispatiënten (Schett *et al*, 2000). Bekende modelstoffen in deze klasse zijn SB203580 en RWJ67657, stoffen die binden in de ATP-binding-pocket van het p38 MAPK enzym en daarmee de enzymatische activiteit van p38 MAPK blokkeren (Davies *et al*, 2000). Nieuwere afgeleiden van deze klasse van verbindingen hebben verbeterde celbiologische, en fysisch-chemische, en/of farmacokinetische en farmaceutische eigenschappen (English en Cobb, 2000).

Naast bovengenoemde stoffen zijn er diverse andere klassen van geneesmiddelen die specifiek kunnen ingrijpen op de activatie van cellen in het lichaam, en meer specifiek, van endotheelcellen ter plekke van een ontsteking. Deze klassen omvatten onder andere de niet-steroïde anti-inflammatoire geneesmiddelen (NSAIDs), waaronder de cyclooxygenase (COX)-2 remmers. Het voert echter te ver om deze hier uitgebreid te bespreken. Voor verdere informatie omtrent de ontwikkeling van deze verbindingen als remmers van endotheelfunctie in ziekte wordt verwezen naar recente literatuur (Flower, 2002; Iniguez *et al*, 2003).

## DRUG TARGETING NAAR ONTSTEKINGSENDOTHEEL

Remmers van signaaltransductieroutes hebben vaak als intrinsiek probleem dat ze toxisch zijn voor gezonde cellen. Om deze toxiciteit te omzeilen zijn in ons laboratorium drug-targetingconstructen ontwikkeld die remmers van signaaltransductie selectief afleveren in geactiveerde endotheelcellen in ontstoken weefsels. Veertig jaar ervaring in drug-targetingonderzoek heeft geleerd dat het afleveren van geneesmiddelen in weefsels sterk wordt belemmerd door de beperkte doorlaatbaarheid van de bloedvatwand voor macromoleculaire drug-targetingconstructen (Molema en Meijer, 2001). Door het endotheel als doelwit te kiezen wordt niet alleen een voor inflammatoire ziekten cruciaal celtype selectief farmacologisch beïnvloed, maar vervalt ook één van de belangrijkste barrières voor op drug targeting gebaseerde therapieën. Theoretisch kan de selectieve aflevering tevens leiden tot hogere intracellulaire concentraties van het geneesmiddel in de doelwitcel en daarmee aanleiding geven tot een sterker farmacologisch effect.

Drug-targetingconstructen bestaan uit een aantal componenten: een drager of *carrier* waaraan de andere componenten kunnen worden vastgezet, een *homing ligand* dat selectiviteit geeft aan de constructen, en een geneesmiddel, de *drug* (figuur 4) (Kok *et al*, 2001).



figuur 4. Een construct voor drug targeting bestaat uit een dragermolecuul (*carrier*), een *homing ligand* die selectief is voor het doelwitmolecuul op de targetcel, en een geneesmiddel/farmacologisch actief onderdeel. In een aantal gevallen, bijvoorbeeld bij een antilichaam, bestaat de carrier uit een molecuul met selectiviteit voor de targetcel en mogelijkheden tot koppeling van geneesmiddelen. Een extra *homing ligand* voor specificiteit is dan niet nodig. (Kok *et al*, 2001)

Belangrijk in het ontwikkelen van een drug-targetingpreparaat voor het afleveren van geneesmiddelen in de endotheelcellen in ontstoken weefsels zijn de volgende kenmerken:

- selectiviteit voor de geactiveerde endotheelcel;
- gunstige geneesmiddelbeladingsgraad zodat voldoende farmacologisch actieve stof wordt afgeleverd;
- chemische stabiliteit gedurende de verblijftijd in het bloed;
- gunstige farmacokinetische eigenschappen, zoals een zodanige biobeschikbaarheid en halfwaardetijd dat een effectieve concentratie voldoende lang op de plaats van werking gehandhaafd kan worden;
- afwezigheid van immunogeniciteit bij meervoudige toediening.

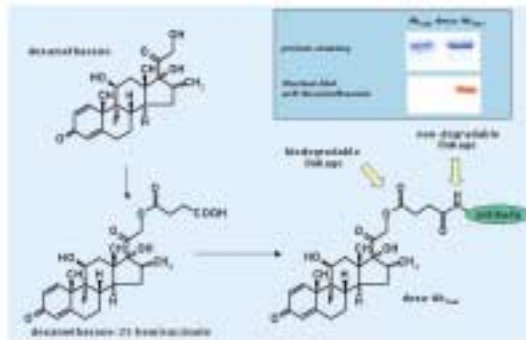
Selectiviteit is gebaseerd op de keuze van de *target* of het doelwitmolecuul op de endotheelcel. Kennis omtrent het gedrag van endotheel in gezond en ziek weefsel vormt een basis voor deze keuze. In inflammatoir weefsel is het endotheel geactiveerd, als gevolg waarvan het endotheel adhesiemoleculen zoals E-selectine, VCAM-1 en ICAM-1 tot expressie brengt. Tevens is het endotheel actief bezig met de vorming van nieuwe bloedvaten, waarbij het endotheel verhoogd integrine  $\alpha\beta 3$  aanmaakt. Deze markers van endotheelactivatie zijn alle zogenaamde transmembraaneiwitten, wat inhoudt dat een onderdeel van de moleculen zich aan de buitenkant van de cel bevindt. Als zodanig kunnen ze dienen als doelwit-molecuul voor drug targeting. Om geneesmiddelen in de cel af te leveren moet het doelwitmolecuul ook voldoen aan de eis dat het na binding van het drug-targetingconstruct wordt geïnternaliseerd. E-selectine en integrine  $\alpha\beta 3$  voldoen aan die eis. Onderzoek naar vasculaire drug targeting gericht op endotheliaal  $\alpha\beta 3$  hebben we in ons laboratorium voornamelijk onderzocht in het kader van tumorbloedvat-targeting (Kok *et al*, 2002; Schraa *et al*, 2002a en b), en wordt hier niet verder besproken.

## ANTI – E – SELECTINE – ANTILICHAAM – DEXAMETHASON DRUG TARGETING CONJUGATEN

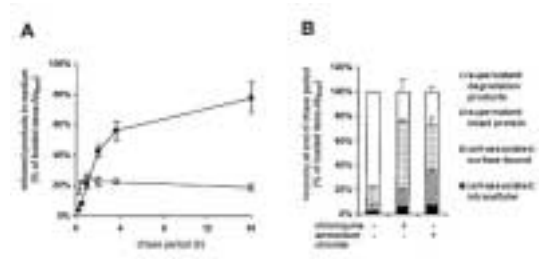
Van E-selectine is bekend dat het eiwitdomeinen in zijn structuur heeft die er voor zorgen dat het eiwit internaliseert tijdens of na het uitvoeren van zijn norma-

le functies in leukocytenrecruterend. Tevens is bekend dat geactiveerde endotheelcellen reageren op blootstelling aan corticosteroiden met remming van genexpressie. Voor 'proof of principle' studies betreffende het selectief afleveren van remmers van signaaltransductie in geactiveerd endotheel hebben we daarom het corticosteroid dexamethason chemisch geconjugeerd aan een antilichaam dat E-selectine herkent, resulterend in een zogenaamd dexa-Ab<sub>Esel</sub>-conjugaat (figuur 5). Gebruik makend van cultures van humane navelstrengendotheelcellen (HUVEC), al dan niet geactiveerd met het pro-inflammatoire cytokine TNF $\alpha$ , hebben we laten zien dat het conjugaat selectief bindt aan E-selectine op de geactiveerde endotheelcel. Na binding werd het conjugaat opgenomen in de geactiveerde endotheelcel en naar vesiculaire structuren in de cel getransporteerd (Everts *et al*, 2002). De opname betreft een actief transportproces en na opname wordt het conjugaat afgebroken in de lysosomen (figuur 6; Kok *et al*, 2002b). Wij hebben aangetoond dat het op deze manier afgeleverde dexamethason farmacologisch actief is (Asgeirsdotter *et al*, 2003; Everts *et al*, 2002).

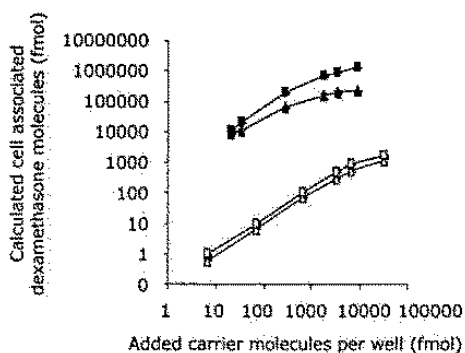
**figuur 5.** Schematische weergave van de synthese van het dexa- Ab<sub>Esel</sub>-conjugaat dat door zijn specificiteit voor het adhesiemolecuul E-selectine het geneesmiddel slechts in endotheelcellen in ontstoken weefsels aflevert. Door gebruik te maken van het hemisuccinaat-derivaat van dexamethason ontstaat er een conjugaat met een in de lysosomen biodegradeerbare linker (zie ook figuur 7). Inzet: door middel van Western blot analyse waarbij aan eiwit geconjugeerd dexamethason kan worden gedetecteerd met een polyclonaal konijnenserum, wordt aangetoond dat het geneesmiddel covalent aan het anti-E-selectine-antilichaam vastzit (Everts *et al*, 2002).



**figuur 6.** Dexa- Ab<sub>Esel</sub>-conjugaat wordt na opname in geactiveerde endotheelcellen afgebroken in de lysosomen. Dit is aangetoond door HUVEC na activatie met TNF $\alpha$  gedurende 6 uur op te laden met <sup>125</sup>I-dexa-Ab<sub>Esel</sub> en na wassen, afbraakproducten van het <sup>125</sup>I-gelabelde eiwit (gesloten symbolen) en intact <sup>125</sup>I-gelabeld eiwit (open symbolen) in de tijd gedurende 16 uur in het bovenstaande medium te meten (fig. a). Aan het eind van de 16 uur werd naast het meten van afbraakproduct versus intact eiwit in bovenstaand medium ook bepaald hoeveel <sup>125</sup>I-dexa-Ab<sub>Esel</sub>-conjugaat er in de cellen en hoeveel er op de buitenmembraan aanwezig was. Door het experiment uit te voeren in aanwezigheid van chloroquine en ammoniumchloride, twee remmers van de lysosomale route, kon worden vastgesteld dat de opname/afbraakroute een lysosomale route betrof: het percentage gedegradiseerd <sup>125</sup>I-dexa-Ab<sub>Esel</sub> was in aanwezigheid van deze remmers met 70% gedaald (fig. b). (Kok *et al*, 2002b).



Antilichamen als drager-molecuul voor drug-targetingconstructen hebben als intrinsiek nadeel dat er relatief weinig geneesmiddel aan kan worden gekoppeld. In bovenstaande d<sub>6</sub>-Ab<sub>E<sub>selectine</sub></sub>-conjugaat bijvoorbeeld konden slechts 2-3 dexamethason moleculen per antilichaammolecuul worden geïncorporeerd. Bij een grotere belading ontstaat er verlies van antigeenherkende functie en veranderen de fysico-chemische eigenschappen zodanig dat ze de farmacokinetiek van het resulterende conjugaat benadelen. Liposomen als dragermolecuul hebben dit nadeel niet, omdat er relatief veel geneesmiddel kan worden geïncorporeerd in de vetfase of in de water fase, zonder dat het liposoom van gedrag verandert. In samenwerking met prof. dr Gert Storm en dr Gerben Koning van de faculteit Farmacie van de Universiteit Utrecht, hebben we daarom de aflevercapaciteit van antilichaamconjugaten vergeleken met die van immunoliposomen. Hiertoe waren de liposomen chemisch gemodificeerd met het anti-E-selectine-antilichaam, en tevens gePEGyleerd om ze een verbeterd farmacokinetisch profiel te geven. Beide drug-targetingconstructen hadden een vergelijkbare specificiteit voor binding aan geactiveerde endotheelcellen, en ook *in vivo* in muizen met een huidontsteking bonden beide selectief aan de endotheelcellen in het ontstoken weefsel. *In vitro* studies lieten echter zien dat de capaciteit van de immunoliposomen om het geneesmiddel af te leveren een factor 1000 hoger was dan die van het eiwit-conjugaat (figuur 7). Deze observaties vormen de aanleiding tot nieuw onderzoek waarin de farmacologische effectiviteit van beide constructen zal worden vergeleken.



figuur 7. Een anti-E-selectine (Ab<sub>E<sub>selectine</sub></sub>)-immunoliposoom heeft een grotere geneesmiddellaflevercapaciteit dan het d<sub>6</sub>-Ab<sub>E<sub>selectine</sub></sub>-conjugaat. HUVEC werden geactiveerd met TNF $\alpha$  en vervolgens geïncubeerd met 3[H]-Ab<sub>E<sub>selectine</sub></sub>-immunoliposoom of 125I-d<sub>6</sub>-Ab<sub>E<sub>selectine</sub></sub>-conjugaat. De binding (vierkantjes) en internalisatie (driehoekjes) van Ab<sub>E<sub>selectine</sub></sub>-immunoliposoom (gesloten symbolen) en d<sub>6</sub>-Ab<sub>E<sub>selectine</sub></sub>-conjugaat (open symbolen) werden aan het eind van het experiment bepaald. Als in een immunoliposoom 50  $\mu$ g dexamethason per mmol lipide kan worden ingesloten, zullen er per liposoom 8000 dexamethasonmoleculen aanwezig zijn. In het d<sub>6</sub>-Ab<sub>E<sub>selectine</sub></sub>-conjugaat kunnen 2-3 dexamethason moleculen per antilichaam

molecuul worden geïncorporeerd. Uit bovenstaande gegevens en de bindings- en opname data kon de hierbij weergegeven grafiek betreffende aflevercapaciteit van Ab<sub>E<sub>selectine</sub></sub>-immunoliposomen en d<sub>6</sub>-Ab<sub>E<sub>selectine</sub></sub>-conjugaat worden samengesteld (Everts *et al*, 2003).

## ANTI-E-SELECTINE – ANTILICHAAM – ADENOVIRUS-CONSTRUCTEN VOOR GENTHERAPIE

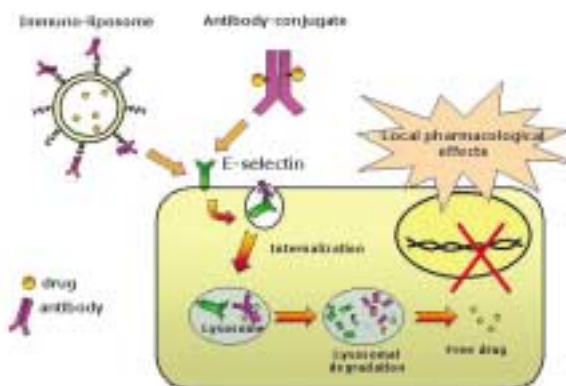
De goede toegankelijkheid van endotheelcellen in ontstoken weefsels maakt dat ze ook voor gentherapeutische strategieën een interessant doelwit vormen. In samenwerking met prof. dr Hidde J Haisma en dr Marianne Rots, van de afdeling



Therapeutische Gen Modulatie van het Universitair Centrum voor Farmacie in Groningen, en *visiting scientist* Dr. Ken Ichi Ogawara van Okayama University in Japan, hebben we adenovirussen gemodificeerd met het anti-E-selectine-antilichaam. Zowel uit *in vitro* als *in vivo* experimenten is gebleken dat ook adenovirussen op deze manier selectiviteit verkregen voor geactiveerde endotheelcellen. We hebben laten zien dat na intraveneuze injectie van Ab<sub>Esel</sub>-adenovirus alleen in de ontstoken huid genexpressie plaats vond (Ogawara *et al*, 2003).

Vervolgonderzoek met therapeutische genen zal de toegevoegde waarde voor de behandeling van chronische ontstekingsziekten moeten aantonen. Uit bovenstaand beschreven studies kan worden geconcludeerd dat diverse therapeutische modaliteiten selectief kunnen worden afgeleverd in endotheelcellen in ontstoken weefsels door middel van drug targeting. Hiervoor kunnen antilichamen gericht tegen E-selectine zowel als *carrier* worden gebruikt als als *homing ligand* voor onder andere liposomen en virussen (figuur 8).

figuur 8. Schematische voorstelling van de route die dextra-Ab<sub>Esel</sub>-conjugaat en Ab<sub>Esel</sub>-immunoliposoom volgen in geactiveerde endotheelcellen. De drug-targetingconstructen binden selectief aan E-selectine op de geactiveerde endotheelcel, waarna het complex van conjugaat / liposoom en adhesiemolecuul via endocytose in de lysosomen terecht komt. In de lysosomen wordt het conjugaat / liposoom gedegradeerd onder invloed van enzymen en lage pH. Het geneesmiddel komt vrij en kan vervolgens zijn remmende werking op transcriptie en translatie van pro-inflammatoire genen uitoefenen.



De volgende stap is het bestuderen van de effecten van deze constructen in proefdiermodellen van chronische ontstekingsziekte. In samenwerking met diverse onderzoeksgroepen wordt op dit moment in diverse muizenmodellen het expressieprofiel in de tijd van de targetmoleculen E-selectine en  $\alpha\beta3$  integrine bestudeerd. Zowel selectiviteit van de conjugaten als de farmacologische effecten van het selectief afleveren van het geneesmiddel zullen worden bestudeerd door middel van het bepalen van (orgaan- en endotheelspecifieke) expressieniveaus van ontstekingsgerelateerde genen in doelwit weefsel en niet-doelwitweefsel, en de leukocyteninfiltratie en weefselchade ter plekke van de ontsteking. Daarnaast worden nieuwe chemische conjugatiestrategieën ontwikkeld om andere geneesmiddelen waaronder p38 MAPK-remmers en nieuwe NF $\kappa$ B-remmers aan dragermoleculen te koppelen of in te sluiten in immunoliposomen. Belangrijke aandachtspunten hier zijn de verhoging van de geneesmiddelbeladingsgraad met behoud van bindingscapaciteit en -selectiviteit en langdurige circulatietijd van de conjugaten *in vivo*.

## TARGET FINDING

Voor bovenstaand onderzoek zijn we uitgegaan van het bekende gegeven dat endotheelcellen tijdens een ontsteking E-selectine tot expressie brengen en dat ze reageren op behandeling met remmers van signaaltransductie. Veel van de kennis over het gedrag van endotheelcellen is gegenereerd in weefselkweekomstandigheden. *In vivo*, in het proefdier en de mens, gedraagt het endotheel zich echter anders dan in het laboratorium. Het is vrijwel onmogelijk om de omgevingsfactoren die het endotheel *in vivo* ervaart (specifieke extracellulaire matrixcomponenten, *shear stress* als gevolg van interacties met de bloedstroom, directe interacties met leukocyten) *in vitro* na te bootsen. Deze omgevingsfactoren zijn echter essentieel voor responsen van endotheelcellen op ziektegeassocieerde prikkels en therapeutisch ingrijpen. Doel van nieuw gestart onderzoek is inzicht te krijgen in basale endotheel-genexpressie patronen *in vivo*. Hiermee kunnen we de effecten van ziekteprogressie op deze patronen bestuderen en genen/genfamilies identificeren die kunnen dienen als aangrijpingspunt voor de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen. Ook kunnen we zo de effecten van (selectief in het endotheel afgeleverde) geneesmiddelen analyseren.

Veel van de genen die door endotheelcellen tot expressie worden gebracht zijn echter niet endotheelspecifiek. Dit maakt dat endotheelgeassocieerde responsen op ziekte en therapie niet gemeten kunnen worden in RNA dat geïsoleerd wordt uit een volledig orgaan. Om het endotheelgedrag in kaart te kunnen brengen hebben we daarom de techniek van lasergeassisteerde microdissectie toegepast om endotheelcellen uit 5 mm cryostaatweefselsecties te isoleren (Asgeirsdottir *et al*, 2002). Uit het endotheel wordt vervolgens mRNA geïsoleerd, waarna genexpressie niveaus van met ziekte geassocieerde genen worden geanalyseerd. Op dit moment wordt hard gewerkt aan het ontwikkelen van protocollen om met het zo verkregen endotheliale mRNA de genexpressie te profileren (figuur 9). Naast het analyseren van endotheelgedrag in muizenmodellen van ziekte opent deze techniek de mogelijkheid om endotheelgedrag tijdens ziekte in patiënten te bestuderen. Daarnaast bevatten de diverse weefselbanken van patiëntenmateriaal een schat aan informatie voor wat betreft de gevolgen van therapie op endotheelgedrag.



figuur 9. Voor het specifiek analyseren van het gedrag van endotheelcellen onder invloed van orgaan- of ziektespecifieke prikkels of therapeutische interventie wordt gebruik gemaakt van RNA dat met laserdissectiemicroscopie (LDM) is geïsoleerd uit een orgaanbiopt. In combinatie met (real time) RT-PCR of microarray analyse kunnen genexpressieprofielen worden verkregen die nieuwe inzichten geven in *in vivo* endotheelgedrag. De zo gegenereerde kennis vormt de basis voor de identificatie van nieuwe moleculaire targets voor therapie van chronische ontstekingsziekten.

De combinatie van vasculaire drug targeting en het profileren van genexpressie in endotheel *in vivo* vormt een unieke combinatie van expertise en technieken in een pre-klinische en klinische setting. Niet alleen zullen op basis van de gegeneerde kennis selectievere farmacologische interventiestrategieën voor de behandeling van chronische ontstekingsziekten kunnen worden ontwikkeld, ook zullen de onderliggende moleculaire mechanismen van succes of falen van nieuwe therapeutica worden blootgelegd.

## REFERENTIES

- Ardite E, Panes J, Miranda M, Salas A, Elizalde JI, Sans M, Arce Y, Bordas JM, Fernandez-Checa JC, en Pique JM. Effects of steroid treatment on activation of nuclear factor kappaB in patients with inflammatory bowel disease. *Br J Pharmacol* 1998; 124: 431-433.
- Asgeirsdottir SA, Werner N, Harms G, van den Berg A, en Molema G. Analysis of *in vivo* endothelial cell activation applying RT-PCR following endothelial cell isolation by laser dissection microscopy. *Ann NY Acad Sci* 2002; 973: 586-589.
- Asgeirsdottir SA, Kok RJ, Everts M, Meijer DKF, en Molema G. Delivery of pharmacologically active dexamethasone into activated endothelial cells by dexamethasone-anti-E-selectin immunoconjugate. *Biochem Pharmacol* 2003; 65: 1729-1739.
- Davies SP, Reddy H, Caivano M, en Cohen P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 2000; 351: 95-105.
- English JM en Cobb MH. Pharmacological inhibitors of MAPK pathways. *Trends Pharmacol Sci* 23; 40-45, 2002.
- Everts M, Kok RJ, Asgeirsdottir SA, Melgert BN, Moolenaar TJM, Koning GA, van Luyn MJA, Meijer DKF, en Molema G. Selective delivery of dexamethasone to activated endothelial cells using an E-selectin directed immunoconjugate. *J Immunol* 2002; 168: 883-889.
- Flower RJ. The development of COX2 inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 2; 179-191, 2003.
- Griffioen AW en Molema G. Angiogenesis: potentials for pharmacological intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases and chronic inflammation. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 237-268.
- Iniguez MA, Rodriguez A, Volpert OV, Fresno M, en Redondo JM. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target in angiogenesis. *Trends Mol Med* 2003; 9: 73-78.
- Kok RJ, Asgeirsdottir SA, en Verweij WR. Development of proteinaceous drug targeting constructs using chemical and recombinant DNA approaches. In: *Drug Targeting - Organ specific strategies* (Eds. Molema G and Meijer DKF), pp. 275-308. Wiley-VCH, Weinheim, New York, 2001.
- Kok RJ, Schraa AJ, Bos EJ, Moorlag HE, Asgeirsdottir SA, Everts M, Meijer DKF, en Molema G. Preparation and functional evaluation of RGD-modified proteins as alpha(v)beta(3) integrin directed therapeutics. *Bioconjug Chem* 2002a; 13: 128-135.
- Kok RJ, Everts M, Asgeirsdottir SA, Meijer DKF, en Molema G. Cellular handling of a dexamethasone-anti-E-selectin immunoconjugate by activated endothelial cells: comparison with free dexamethasone. *Pharm Res* 2002b; 19: 1730-1735.
- Molema G en Meijer DKF. *Drug Targeting: Organ-Specific Strategies*. Wiley-VCH, Weinheim, 2001.
- Ogawara KI, Rots MG, Kok RJ, Moorlag HE, van Loenen A, Meijer DKF, Haisma HJ, en Molema G. RGDpeptide and anti-E-selectin antibody modified adenovirus selectively deliver genes into activated endothelial cells *in vitro* and *in vivo*. In prep, 2003.
- Schett G, Tohidast-Akrad M, Smolen JS, Schmid BJ, Steiner CW, Bitzan P, Zenz P, Redlich K, Xu Q, en Steiner G. Activation, differential localization, and regulation of the stress-activated protein kinases, extracellular signal-regulated kinase, c-JUN N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase, in synovial tissue and cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 2501-2512.
- Schraa AJ, Kok RJ, Moorlag HE, Bos EJ, Proost JH, Meijer DKF, de Leij LFMH, en Molema G. Targeting of RGD-modified proteins to tumor vasculature: a pharmacokinetic and cellular distribution study. *Int J Cancer* 2002a; 102: 469-475.
- Schraa AJ, Kok RJ, Berendsen AD, Moorlag H, Bos EJ, Meijer DKF, de Leij LFMH, en Molema G. Endothelial cells internalize and degrade RGD-modified proteins developed for tumor vasculature targeting. *J Contr Rel* 2002b; 83: 241-251.
- Thiele K, Bierhaus A, Autschbach F, Hofmann M, Stremmel W, Thiele H, Ziegler R, en Nawroth PP. Cell specific effects of glucocorticoid treatment on the NF- kappaBp65/IkappaBalpha system in patients with Crohn's disease. *Gut* 1999; 45: 693-704.



Otto Boerman (1959) studeerde chemie aan de Universiteit van Nijmegen, gevolgd door een periode (1984-1990) als junior onderzoeker bij achtereenvolgens de afdeling Parasitologie aan de Universiteit van Leiden, de afdeling Celbiologie en Histologie in Nijmegen en de afdeling Pathologie in Nijmegen. In 1990 promoveerde hij op het proefschrift 'Development and Application of Monoclonal Antibodies against Ovarian Cancer' aan de Universiteit van Nijmegen.

Na zijn promotie werkte hij als Research fellow van de Nederlandse Kankerbestrijding (NKB-KWF) aan het Center of Molecular Medicine & Immunology in Newark NJ, USA onder leiding van dr DM Goldenberg, bij dr DL Longo aan het National Cancer Institute in USA en bij de afdeling Klinische Immunologie in Groningen o.l.v. prof. dr The.

In 1992, werd hij senior onderzoeker en Hoofd van Preklinische Onderzoek bij de afdeling Nucleaire Geneeskunde van het Universitair Medisch Centrum Nijmegen. Sinds 2002 is Otto Boerman als universitair hoofddocent verbonden aan het Universitair Medisch Centrum Nijmegen.

Hij is lid van diverse internationale verenigingen, zoals de American Association for Cancer Research, the Society of Nuclear Medicine, European Association of Nuclear Medicine, American Chemical Society en de Nederlandse Vereniging voor Nucleaire Geneeskunde. Sinds 1999 is hij lid van de editorial board van de Journal of Nuclear Medicine.

Zijn interesse in het onderzoeksgebied van targeting in combinatie met kankertherapie blijkt onder meer uit de lange lijst onderzoeksprojecten en zijn optreden als co-promotor bij diverse promotieprojecten op het gebied van targeting naar tumorcellen. Hij is (co-)auteur van meer dan 140 wetenschappelijke publicaties op zijn vakgebied.

## OC Boerman

### ACHTERGROND

Het concept om medicijnen specifiek bij tumoren af te leveren verschijnt in 1890 voor het eerst in de medische literatuur toen de Duitse geleerde Paul Ehrlich (1854-1915) voorstelde om medicijnen te koppelen aan stoffen die een specifieke affiniteit hebben voor pathogenen (*side chain theory*). In de decennia daarna is er door talloze onderzoekers naar dit zogeheten *magic bullets* concept verwezen als gepoogd werd om stoffen specifiek naar tumoren te sturen. Niet lang na de identificatie en isolatie van de eerste specifieke antilichamen werd dan ook gepostuleerd dat antistoffen als doelzoekende moleculen voor cytotoxische stoffen gebruikt zouden kunnen worden. In 1950 levert Pressman het eerste *proof of principle* van tumortargeting. In een ratten sarcomamodel laat hij zien dat een polyclonaal antiserum gebruikt kan worden om een tumor te targeten. Het lukt echter in die tijd niet om een antiserum te produceren dat voldoende specifiek tegen de tumor is gericht om dit concept verder te ontwikkelen. In 1975 ontwikkelen Köhler en Milstein een techniek om oneindige hoeveelheden antilichamen te ontwikkelen tegen specifieke antigenen. Deze zogeheten hybridoma-technologie heeft een enorme invloed op het biomedisch onderzoek, en reeds in 1983 ontvangen zij de Nobelprijs voor het ontwikkelen van deze technologie. Met behulp van de hybridoma-technologie worden in begin jaren 80 onder meer monoclonale antilichamen geproduceerd tegen tumorantigenen (bijv. CEA, AFP, hCG, PSA). Bovendien werden met behulp van deze techniek nieuwe tumorgeassocieerde antigenen (bijv. MUC1, TAG72, G250) geïdentificeerd. In die jaren ontstaat er een enorm optimisme over de mogelijkheden om met behulp van deze monoclonale antilichamen methoden te ontwikkelen om tumoren specifiek op te sporen en te behandelen. Ondermeer komt het onderzoek om dit te doen met behulp van radio-actief gelabelde antilichamen (radioimmunoscintigrafie en radioimmunotherapie) in een stroomversnelling.

### RADIOIMMUNOSCINTIGRAFIE

Door monoclonale antilichamen te labelen met radionucliden die gammastralen uitzenden, kan de lokalisatie van deze antilichamen in het lichaam worden afgebeeld met een gammacamera. Begin jaren 80 komen er een aantal monoclonale antilichamen beschikbaar gericht tegen verschillende tumorgeassocieerde antigenen. Tumorgeassocieerde antigenen zijn antigenen die verhoogd tot expressie komen op tumorcellen. In tabel 1 zijn een aantal goed gekarakteriseerde tumorgeassocieerde antigenen opgesomd.

**tabel 1.** Tumorgeassocieerde antigenen.

tumor geassocieerd antigeen		expressie op
CEA	carcinoembryonic antigeen	colorectale tumoren
AFP	alfa-foetoproteïne	hepatocellulair carcinoom
MUC-1	mucin-1	adenocarcinomen
TAG72	tumor-associated glycoproteïne 72	ovarium en colorectale tumoren
EPG-2	epithelial glycoproteïne-2	adenocarcinomen
Her2/neu	EGF-receptor	mammacarcinoom
CD20	CD20	B-cell lymfomen

Bij radioimmunoscintigrafie wordt het monoclonale antilichamen gemarkeerd met een radioactieve stof die gammastralen uitzendt (<sup>123</sup>I, <sup>111</sup>In, <sup>99m</sup>Tc, e.a.) waardoor de lokalisatie van het antilichaam in het lichaam kan worden afgebeeld met een camera die de verdeling van de radioactiviteit in het lichaam kan afbeelden (figuur 1).



**figuur 1.** Radioimmunoscintigram van een patiënt met een niercel-carcinoom met uitgebreid gemetastaseerde ziekte. De opnamen zijn gemaakt 7 dagen na injectie van het chimere monoclonale antilichaam cG250 gelabeld met <sup>111</sup>I.

Voor dit doel zijn zowel intact IgG als F(ab')<sub>2</sub> als Fab-fragmenten van verschillende monoclonale antilichamen gebruikt. Met verschillende gelabelde antilichaampreparaten werd een sensitiviteit en specificiteit voor het opsporen van tumorlesies bereikt die hoger lag dan die van conventionele imagingmethoden zoals CT en echografie. In het laatste decennium van de vorige eeuw verscheen er een viertal antilichaampreparaten voor immunoscintigrafie op de markt (tabel 2).

**tabel 2.** Preparaten voor scintigrafische detectie van tumoren.

merknaam	antilichaampreparaat	voor detectie van
Oncoscint <sup>®</sup>	<sup>111</sup> In-anti-TAG72 IgG	ovarium-, colorectaalcarcinoom
Prostascint <sup>®</sup>	<sup>111</sup> In-anti-PSMA IgG	prostaatacinoom
CEA-scan <sup>®</sup>	<sup>99m</sup> Tc-anti-CEA Fab'	colorectaalcarcinoom
Veraluma <sup>®</sup>	<sup>99m</sup> Tc-anti-EPG-2 Fab'	longcarcinoom

Het gebruik van deze preparaten voor tumordetectie in de klinische praktijk is echter zeer beperkt gebleven. Dit is vooral het gevolg van de opkomst van het gebruik van positronemissietomografie (PET) met fluor-18-gelabeld deoxyglucose ( $^{18}\text{F}$ FDG).  $^{18}\text{F}$ FDG is een glucoseanalogon dat net als glucose wordt opgenomen door cellen via de glucose-1-transporter (Glut-1). Het wordt net als glucose in de cel gefosforyleerd, maar kan vervolgens niet verder gemetaboliseerd worden. Als gevolg hiervan wordt het  $^{18}\text{F}$ FDG in de cel vastgehouden. Door hun verhoogde glucosebehoefte nemen tumoren relatief veel  $^{18}\text{F}$ FDG op, en de meeste tumoren kunnen met  $^{18}\text{F}$ FDG met hoge sensitiviteit worden afgebeeld. Omdat fluor-18 een positronenemitter is wordt de afbeelding van *in vivo* distributie van het  $^{18}\text{F}$ FDG uitgevoerd met een speciale camera, de zogenaamde PET-camera. De afbeeldingen van een PET-camera hebben een hogere resolutie dan die van een conventionele gammacamera (figuur 2). Deze techniek heeft de afgelopen jaren een enorme vlucht genomen en wordt inmiddels in de klinische praktijk ondermeer gebruikt voor:

- restaging van tumoren (melanoma, longcarcinoom, coloncarcinoom);
- diagnose van tumoren van onbekende oorsprong (*cancer with unknown primary*);
- differentiatie tussen littekenweefsel en viabele tumor na operatie/therapie;
- vroegtijdig vaststellen van respons op therapie (*therapy response monitoring*).

Door de ontwikkeling van FDG-PET richt het gebruik van radioactief gelabelde antilichamen zich tegenwoordig niet meer op radioimmunosintigrafie maar op radioimmunotherapie.



figuur 2. Positronemissietomografie (PET)-opname van een patiënt met een gemetastaseerd melanoom. De opname is gemaakt met een PET-camera één uur na injectie van  $^{18}\text{F}$ -gelabeld fluorodeoxyglucose (FDG).

## RADIOIMMUNOTHERAPIE

Monoclonale antilichamen gelabeld met beta-emitters kunnen gebruikt worden om selectief radioactieve straling naar tumoren te geleiden om zo een therapeutische stralendosis naar tumoren te brengen. Beta-emitters met een halfwaardetijd die overeenkomt met die van de halfwaardetijd van antilichamen in de circulatie zijn voor deze toepassing het meest geschikt. De afgelopen jaren zijn voor radioimmunotherapie (RIT) een aantal verschillende radionucliden gebruikt zoals  $^{131}\text{I}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{67}\text{Cu}$  en  $^{177}\text{Lu}$ . Door het gebruik van verbeterde labelingstechnieken (meta-

boel resistente joderingstechnieken, macrocyclische chelaten, e.a.) is het tegenwoordig mogelijk om antilichamen met deze radionucliden stabiel te labelen. Voorts kan door het gebruik van chimere en gehumaniseerde antilichamen de vorming van *human anti-mouse antibodies* (HAMA) beperkt worden. Onderzoek heeft echter aangetoond dat de opname van gelabelde antilichamen in de meeste tumoren slechts beperkt is (0.001-0.01 % ID/g; ID = geïnjecteerde dosis). Hierdoor is ook de stralendosis die naar de tumoren geleid wordt in het algemeen te laag (<20 Gy) om therapeutische responsen van betekenis te induceren. Omdat de opname van antilichamen in kleine tumorlesies in het algemeen veel hoger is, richten de huidige radioimmunotherapiestudies in patiënten met solide tumoren zich op de behandeling tot *minimal residual disease* en/of micrometastasen.

Daarnaast wordt radioimmunotherapie tegenwoordig toegepast voor de behandeling van verschillende hematologische tumoren, zoals het non-Hodgkin's lymfoom (NHL). De belangrijkste reden hiervoor is dat deze tumoren relatief stralengevoelig zijn, waardoor met een stralendosis van ca. 20 Gy belangrijke therapeutische effecten bereikt kunnen worden. Voor RIT bij het NHL worden monoclonale antilichamen gebruikt gericht tegen oppervlakte-antigenen van B-cellen, zoals CD20 en CD22 (zie tabel 3). Deze antilichamen hebben bovendien een cytotoxisch effect op lymphomacellen via *antibody dependent cytotoxicity* (ADCC), *complement dependent cytotoxicity* (CDC), en andere mechanismen.

**tabel 3.** Antilichaampreparaten voor radioimmunotherapie van lymfomen.

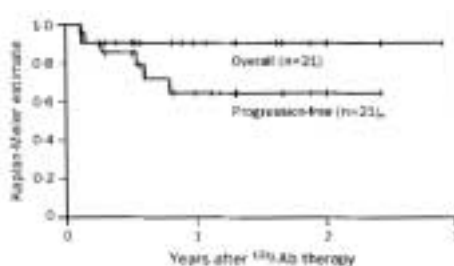
target Ag	Ab	species	radionuclide	naam	product naam
CD20	B-1	muis	<sup>131</sup> I	tositumomab	Bexxar <sup>®</sup>
CD20	2B8	muis	<sup>90</sup> Y	ibritumomab	Zevalin <sup>®</sup>
CD22	LL-2	gehumaniseerd	<sup>90</sup> Y	epratuzumab	LymphoCide <sup>®</sup>
HLA-Dr10	Lym-1	muis	<sup>131</sup> I		Oncolym <sup>®</sup>

In een fase III-studie in 146 patiënten met (*relapsed of refractory*) NHL bleek behandeling met 0.4 mCi/kg <sup>90</sup>Y- anti-CD20 (Zevalin<sup>®</sup>, 80% respons) effectiever dan behandeling met niet-radioactief anti-CD20 (Rituxan<sup>®</sup>/MabThera<sup>®</sup>, 56% respons). Met name op grond van deze studie is Zevalin<sup>®</sup> in februari 2002 door de FDA als geneesmiddel geregistreerd voor de behandeling van patiënten met NHL. Ook met <sup>131</sup>I-anti-CD20 (Bexxar<sup>®</sup>) is een dergelijke fase III-studie uitgevoerd: in 78 NHL patiënten werd het therapeutisch effect van toediening van ongelabeld tositumomab (anti-CD20, 2 x 485 mg) vergeleken met dat van <sup>131</sup>I-gelabeld tositumomab. Ook in deze studie was de radioimmunotherapie (55% respons) effectiever dan de immunotherapie (17% respons). Ook Bexxar<sup>®</sup> is onlangs (juni 2003) in de Verenigde Staten als geneesmiddel geregistreerd voor de behandeling van patiënten met NHL.

Bij radioimmunotherapie is de activiteitsdosis die maximaal aan een patiënt toegediend kan worden, beperkt door de stralingsgevoeligheid van het beenmerg. Om



onherstelbare schade aan het beenmerg te voorkomen wordt in het algemeen een dosis van maximaal ca. 125-175 mCi  $^{131}\text{I}$ -gelabeld monoclonaal antilichaam intraveneus toegediend. Voor  $^{90}\text{Y}$ -gelabelde antilichamen ligt de maximale dosis bij ca. 30-35 mCi. In verschillende studies combineert men daarom tegenwoordig radioimmunotherapie met een beenmergtransplantatie. Door van de patiënt stamcellen te isoleren vóór de radioimmunotherapie en deze stamcellen terug te geven nadat het activiteitsniveau in het lichaam tot een aanvaardbare hoogte is gedaald, kan een veel hogere activiteitsdosis worden toegediend. Bij deze zogenaamde myeloblatieve radioimmunotherapie worden doses tot 750 mCi  $^{131}\text{I}$ -anti-CD20 aan patiënten toegediend. Met deze benadering werd in een studie bij 30 van de 36 NHL-patiënten zelfs een complete remissie bereikt (figuur 3). Nu de radioactieve anti-CD20 antilichaampreparaten geregistreerd zijn als therapeuticum voor de 2<sup>e</sup>-lijnsbehandeling van NHL wordt de effectiviteit van deze preparaten in andere patiëntengroepen getest. Zo wordt de effectiviteit als 1<sup>e</sup>-lijnstherapie onderzocht. Daarnaast worden er inmiddels verschillende studies uitgevoerd waarin de effectiviteit van radioimmunotherapie in combinatie met andere therapieën wordt onderzocht. Zo wordt er op dit moment in Europa een studie uitgevoerd waarin het effect van Zevalin<sup>®</sup> wordt onderzocht in NHL-patiënten die in remissie zijn na 1<sup>e</sup>-lijnschemotherapie (FIT-studie).

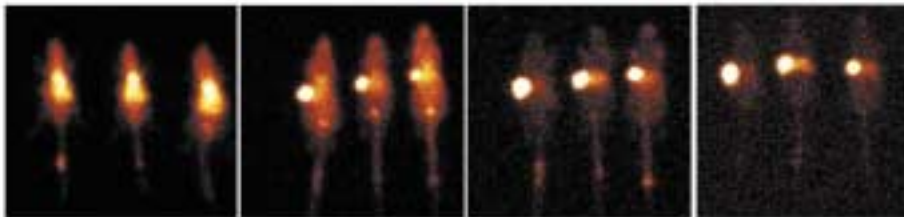


figuur 3. Overall en progression-free overleving van patiënten met chemoresistent non-Hodgkin's lymfoom na behandeling met myeloablatieve radioimmunotherapie met monoclonale antilichamen tegen CD20 gelabeld met hoge doses  $^{131}\text{I}$  (>280 mCi).

Met de registratie van beide radioimmunotherapeutica (Zevalin<sup>®</sup> en Bexxar<sup>®</sup>) lijkt radioimmunotherapie definitief een plaats te hebben gekregen in de behandeling van kanker. Het succes van radioimmunotherapie bij de behandeling van hematologische tumoren staat in schril contrast met de zeer beperkte therapeutische effecten die gezien zijn met radioimmunotherapie in patiënten met solide tumoren. Dit wordt vooral toegeschreven aan de beperkte en langzame diffusie van IgG-moleculen in tumoren, waardoor de opname van de antilichamen in de tumor relatief beperkt blijft (0.001-0.01 % ID/g).

Door deze beperking wordt gezocht naar nieuwe manieren om efficiënt tumoren te kunnen targeten. Enerzijds richt dit onderzoek zich op het gebruik van antilichaamfragmenten (F(ab')<sub>2</sub>, Fab, scFv, diabodies, minibodies, e.a.). Voorts wordt gebruikt gemaakt van zogenaamde pretargeting strategieën. Bij deze benaderingen

worden het antilichaam en het radionuclide na elkaar toegediend. De tumor wordt daarbij gepretarget met een antilichaamconstruct dat zowel affiniteit heeft voor het tumorgeassocieerde antigeen als voor het hapteen dat de radioactieve stof bevat. Pas als dit construct voldoende in de tumor is gelocaliseerd en voldoende uit het bloed is geklaard, wordt het radioactieve hapteen toegediend. Omdat dit hapteen een klein snel klarend molecuul is, wordt de stralenbelasting van het beenmerg aanzienlijk beperkt. De tumor kan bijvoorbeeld gepretarget worden met een antilichaam-avidine conjugaat, waarna radioactief biotine toegediend wordt. Ook worden voor pretargeting van tumoren zogenaamde bispecifieke monoclonale antilichaamconstructen gebruikt. Dat zijn antilichamen met affiniteit voor twee verschillende antigenen. In pretargetingstrategieën worden bispecifieke antilichamen met enerzijds affiniteit voor een tumor-geassocieerd antigeen en anderzijds voor een radioactief hapteen gebruikt. Zowel dierexperimentele studies als de eerste studies in kankerpatiënten laten zien dat middels pretargeting radioactiviteit efficiënter naar tumoren kan worden geleid dan met direct gelabelde monoclonale antilichamen. Binnen onze onderzoeksgroep wordt gewerkt aan de ontwikkeling van pretargetingstrategieën met behulp van biologisch geproduceerde bispecifieke monoclonale antilichamen. In muizen met humane niercelcarcinomen hebben wij aangetoond dat door gebruik te maken van bispecifieke antilichamen gericht tegen enerzijds de tumor en anderzijds tegen radioactief gelabeld DTPA, tumoren veel efficiënter getarget kunnen worden dan met direct gelabelde anti-tumorantilichamen (figuur 4).



figuur 4. Radioimmunoscintigrammen van drie muizen met subcutaan groeiend humaan niercelcarcinoom. De tumoren werden gepretarget met bispecifieke monoclonale antilichamen (anti-niercelcarcinoom x anti-DTPA). Drie dagen later werd bivalent <sup>111</sup>In-gelabeld DTPA toegediend. De scintigrafische opnamen werden gemaakt 0, 4, 24 en 96 uur na injectie van de radioactieve stof.

Naast de ontwikkeling van deze alternatieve antilichaamtargetingstrategieën richt het tumortargeting onderzoek zich tegenwoordig vooral op het gebruik van receptorbindende peptiden.

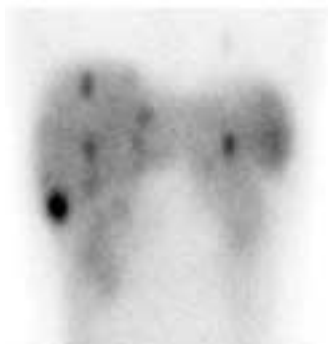
## RADIONUCLIDETARGETING NAAR PEPTIDERECEPTOREN

Op de membraan van verschillende typen tumorcellen komen verschillende receptoren tot expressie. Zo komen op het celoppervlak van neuro-endocrien tumoren somatostatinerceptoren voor. Somatostatinerceptoren worden ook

gevonden in neuroblastomen, medulaire schildklier carcinoemen, prostaat kankers en in kleincellig longcarcinoemen. Cholecystokininereceptoren komen tot expressie in medulaire schildklier carcinoemen en in kleincellig longcarcinoemen. Verder worden bombesinereceptoren gevonden op prostaat- en mammacarcinoemen. De liganden van deze receptor zijn in het algemeen kleine peptiden die een hoge affiniteit voor deze receptoren. Door nu deze peptiden en hun analoga te labelen met radionucliden ( $^{123}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$ ), kunnen met deze preparaten tumoren scintigrafisch worden afgebeeld. Ten opzichte van antilichamen hebben deze peptiden het voordeel dat het moleculen zijn die een relatief snelle diffusie in tumoren vertonen en snel uit het bloed en andere nontargetorganen klaren. In het lichaam hebben deze peptiden meestal een hormoonfunctie en daarom worden ze relatief snel gemetaboliseerd (feed-back mechanisme). Voor tumortargeting is een hogere metabole stabiliteit van het molecuul wenselijk. Daarom worden voor tumortargeting analoga van hormoonpeptiden ontwikkeld die resistent zijn tegen enzymatische afbraak *in vivo*. Het meest bekende voorbeeld van peptidereceptor-radionuclidetargeting van tumoren is de targeting van somatostatinetumoren.

Somatostatine heeft een hoge affiniteit voor de verschillende typen somatostatinerectoren. Inmiddels zijn er vijf verschillende subtypen van somatostatinerectoren geïdentificeerd (SSTR1 t/m SSTR5). De belangrijkste functie van somatostatine is de secretie van verschillende hormonen (groeihormoon, insuline, glucagon, gastrine) te remmen. Bovendien werkt somatostatine als neurotransmitter in de hersenen. Natief somatostatine is een polypeptide bestaande uit 14 aminozuren dat buitengewoon gevoelig voor enzymatische afbraak. Somatostatine heeft een halfwaardetijd in het bloed van slechts enkele minuten. Daarom werd een 8-aminozuur analogon van somatostatine ontwikkeld. Dit zogenaamde octreotide heeft een veel langere halfwaardetijd in het bloed en bindt met hoge affiniteit ( $K_d = 3 \text{ nM}$ ) aan de SSTR2-receptor. Dit octreotide werd radioactief gelabeld met  $^{123}\text{I}$  en getest voor de scintigrafische detectie van neuroendocrine tumoren. Evenals het somatostatine wordt octreotide echter na binding aan de SSTR2-receptor door de cel geïnternaliseerd, waarna het in de lysosomen van de cel wordt gemetaboliseerd, waarna het  $^{123}\text{I}$ -label door de cel wordt uitgescheiden. Hierdoor was de accumulatie van het  $^{123}\text{I}$ -octreotide in de tumoren slechts gering. Daarom werd het octreotide vervolgens gelabeld met een zogenaamd residualiserend radionuclide,  $^{111}\text{In}$ . Dat wil zeggen dat het  $^{111}\text{In}$  na metabolisering van het  $^{111}\text{In}$ -octreotide door lysosomale enzymen niet door de cel wordt uitgescheiden. Om labeling van het octreotide met  $^{111}\text{In}$  mogelijk te maken werd het octreotide N-terminaal voorzien van een chelaterende groep, het DTPA. Met  $^{111}\text{In}$ -DTPA-octreotide kunnen SSTR2-receptor expresserende tumoren inderdaad met hoge sensitiviteit (> 90%) scintigrafisch worden afgebeeld. Inmiddels is  $^{111}\text{In}$ -octreotide onder de productnaam Octreoscan<sup>®</sup> commercieel verkrijgbaar. Octreoscan<sup>®</sup> wordt gebruikt voor diagnose en de behandeling van patiënten met neuroendocrine tumoren (figuur 5). Een belangrijk deel van het ontwikkelingswerk voor dit preparaat is uitgevoerd aan de Erasmus universiteit in Rotterdam door de groep van prof. E Krenning.

Omdat radioactief gelabeld octreotide efficiënt lokaliseert in neuroendocrine tumoren richt het onderzoek zich tegenwoordig op de ontwikkeling van een octreotide-analoon voor therapeutische toepassing: peptidereceptor-radionuclidetherapie (PRRT). Teneinde het analoon stabiel te kunnen labelen met de  $\beta$ -emitter,  $^{90}\text{Y}$ , werd het DTPA-chelaat vervangen voor een macrocyclisch chelaat, DOTA. Om



figuur 5. Scintigrafische opname van een patiënt met een gastrinoma 24 uur na injectie van  $^{111}\text{In}$ -gelabeld octreotide (Otreoscan®). In de lever zijn verschillende metastasen van deze somatostatine-receptor-positieve tumor zichtbaar.

het molecuul voldoende hydrofiel te houden werd het derde aminozuur, phenylalanine, vervangen door tyrosine. De therapeutische effectiviteit van het  $^{90}\text{Y}$ -DOTA-Tyr3-octreotide voor de behandeling van neuroendocrine tumoren wordt op dit moment bepaald in een fase II-studie. In tegenstelling tot in de radioimmunotherapie studies, is de nier in deze PRRT-studies het activiteitsdosislimiterende orgaan. De maximale activiteitsdosis die patiënten in deze studies krijgen toegediend is ca. 500 mCi. Van de 54 patiënten met progressieve neuroendocrine tumoren werd bij 4 patiënten een partiële respons (7%) gezien, terwijl bij 33 patiënten de ziekte stabiliseerde (61%). Recent onderzoek in met name Rotterdam heeft echter laten zien dat een nieuw octreotide-analoon, Tyr3-octreotate gelabeld met  $^{177}\text{Lu}$  efficiënter in neuroendocrine tumoren accumuleert. Ook dit  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Tyr3-octreotate wordt op dit moment in een fase II-studie in patiënten getest. In deze studie kregen tot nu toe 67 patiënten 2 à 3 doses van 200 mCi  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Tyr3-octreotate toegediend. Eén patiënt had een complete remissie (1%), 22 hadden een partiële respons (29%) en bij 39 patiënten stabiliseerde de ziekte (52%). Deze resultaten van fase II-studies geven aan dat met PRRT met radioactief gelabelde somatostatine-analoga belangrijke therapeutische effecten bereikt kunnen worden in patiënten met neuroendocrine tumoren.

Gesteund door het succes van het onderzoek naar PRRT met somatostatine-analoga worden er momenteel verschillende andere peptidehormoonanaloga voor dit doel ontwikkeld. Met  $^{111}\text{In}$ -gelabelde bombesine-analoga kunnen colon-, prostaat- en mammacarcinomen en glioblastomen scintigrafisch worden afgebeeld. Met cholecystokine (CCK)-receptor bindende peptiden kunnen medulaire schildklier-carcinomen zeer efficiënt getarget worden. Voor het targeten van insulinomas wordt sinds kort gebruik gemaakt van analoga van het glucagon-like peptide-1 (GLP-1). De studies met bombesine, CCK en GLP-1-analoga verkeren nog in het

dierexperimentele stadium, en het zal moeten blijken of de ervaringen opgedaan met de somatostatine-analoga slechts een voorbeeld is van peptide-receptortargeting of dat het een uitzonderlijk systeem is waarmee tumoren met uitzonderlijke efficiëntie getarget kunnen worden.

## CONCLUSIE

Monoclonale antilichamen gericht tegen tumorgeassocieerde antilichamen hebben de enorme verwachtingen voor gebruik van specifieke targeting van kanker niet kunnen waarmaken. De accumulatie van deze antilichamen in de meeste tumortypen is daarvoor te inefficiënt. Het gebruik van radioactief gelabelde antilichamen voor het scintigrafisch afbeelden van tumoren heeft zich, mede door de ontwikkeling van positronemissietomografie, geen rol van betekenis in de klinische praktijk kunnen verwerven. Radioimmunotherapie van solide tumoren is eveneens ten gevolge van de relatief lage opname van antilichamen in de meeste tumoren ineffectief, en is mogelijk alleen geschikt voor de (adjuvante) behandeling van patiënten met micrometastasen. Wellicht dat het gebruik van nieuwe anti-lichaamconstructen (diabodies en minibodies) of pretargetingstrategieën de targeting efficiënter kunnen maken. Voor de behandeling van hematologische tumoren blijkt radioimmunotherapie echter zeer geschikt en effectief. Door de registratie van Zevalin<sup>®</sup> en Bexxar<sup>®</sup> heeft radioimmunotherapie inmiddels naast chemotherapie en radiotherapie een plaats verworven in de behandeling van met name patiënten met NHL. Voorts geven de resultaten die zijn bereikt in patiënten met neuroendocrine tumoren met gelabelde somatostatine-analoga aan dat tumoren zeer effectief getarget kunnen worden met gelabelde peptidehormoon-analoga. Deze targeting kan niet alleen worden gebruikt voor het afbeelden van tumoren, maar tevens voor hun therapeutische behandeling. De toekomst zal leren of behalve neuroendocrine tumoren ook andere typen tumoren met deze benadering gedetecteerd en/of behandeld kunnen worden.

## VERDER LEZEN

- Boerman OC, Oyen WJ, Corstens FH. Radio-labeled receptor-binding peptides: a new class of radiopharmaceuticals. *Semin Nucl Med.* 2000; 30: 195-208.
- Boerman OC, van Schaijk FG, Oyen WJ, Corstens FH. Pretargeted radioimmunotherapy of cancer: progress step by step. *J Nucl Med.* 2003; 44: 400-411.
- Goldenberg DM. Targeted therapy of cancer with radiolabeled antibodies. *J Nucl Med.* 2002; 43: 693-713.
- de Jong M, Kwekkeboom D, Valkema R, Krenning EP. Radiolabelled peptides for tumour therapy: current status and future directions. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2003; 30: 463-469.
- Postema EJ, Boerman OC, Oyen WJ, Raemaekers JM, Corstens FH. Radioimmunotherapy of B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Nucl Med* 2001; 28:1725-1735.



Christine d'Oliveira werd op 17 maart 1964 te Haarlem geboren. Zij is in 1986 met lof geslaagd aan het Ir. W. van de Broek Instituut te Amsterdam en werd het HLO-diploma voor laboratoriumpersoneel in de chemische richting behaald. Van september 1986 tot september 1988 was zij als analiste werkzaam op het Nederlands Kanker Instituut, Antoni van Leeuwenhoekhuis te Amsterdam. Daar heeft zij aan *Trypanosoma brucei* gewerkt. Van september 1988 tot oktober 1991 was zij werkzaam aan de University of California Los Angeles (UCLA), School of Medicine, Los Angeles, USA. Daar heeft zij aan *Trichomonas vaginalis* onderzoek gedaan. Terug gekomen in Nederland was zij van juni 1992 tot januari 1997 aangesteld als assistent in opleiding bij de afdeling Parasitologie en Tropische Diergeneeskunde van de vakgroep Infectieziekten en Immunologie van de Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Utrecht. Gedurende deze periode werd onderzoek verricht aan *Theileria annulata*, een verwant aan malaria, maar dan bij het rund. Het onderzoek werd afgerond met een proefschrift, getiteld: '*Theileria annulata*: Recombinant Vaccine Development and Molecular Identification'. Na een periode van vier jaar als postdoc onderzoek te hebben gedaan op achtereenvolgens de 'UCLA' (*T. vaginalis*) en het LUMC (hart- en vaat ziekten), is zij sinds september 2001 werkzaam bij OctoPlus Technologies B.V. Hier is zij als research scientist onder andere verantwoordelijk voor (samenwerkings)projecten waarin onderzoek wordt verricht naar zowel de gecontroleerde afgifte van eiwitten uit OctoDEX<sup>®</sup> als de DNA-afgiftesystemen van OctoPlus ten behoeve van DNA-vaccinaties.

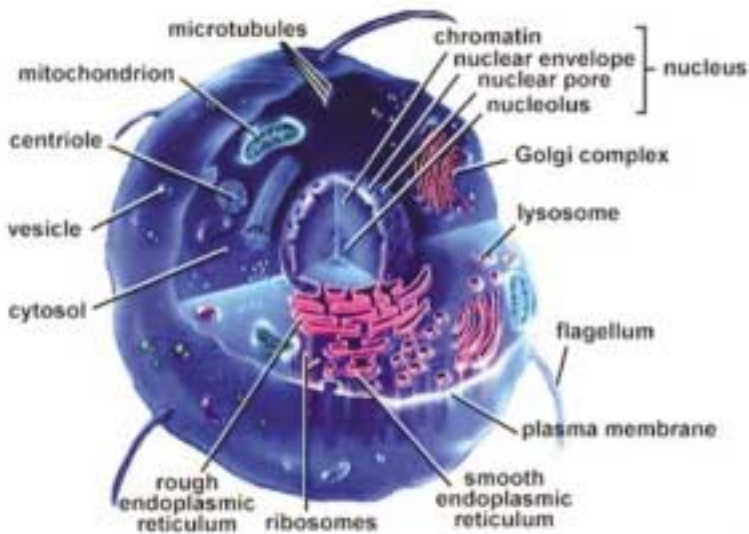
## C d'Oliveira

De succesvolle afgifte van geneesmiddelen tegen kanker, inclusief eiwitten en peptides, lost alleen een deel van het rendementsprobleem op. Voor veel geneesmiddelen afgeleid van eiwitten en peptides staat nu hun volgende uitdaging voor de deur: het bereiken van het doel binnen de cel, daar waar vele geneesmiddelen tegen kanker hun werking uitoefenen.

Na een korte inleiding over de structuur van een dierlijke cel wordt er uitgebreider stil gestaan bij een belangrijk onderdeel van de cel: de celmembraan. Na de verschillende mogelijkheden van transport van moleculen over deze membraan de revue te laten passeren, zal er aan de hand van een voorbeeld uit de praktijk de intracellulaire afgifte van macromoleculen besproken worden. Als voorbeeld wordt de weg van DNA naar de kern gevolgd ten behoeve van het onderzoek naar een genterapeuticum voor vaccindoeleinden.

### INTRODUCTIE VAN DE CEL

De *Cel Theorie* ligt ten grondslag aan de hedendaagse biologie. De voornaamste leerstellingen zijn: 1) alle levende wezens bestaan uit één of meerdere cellen; 2) de chemische reacties van levende cellen vinden plaats in de cel; 3) alle cellen



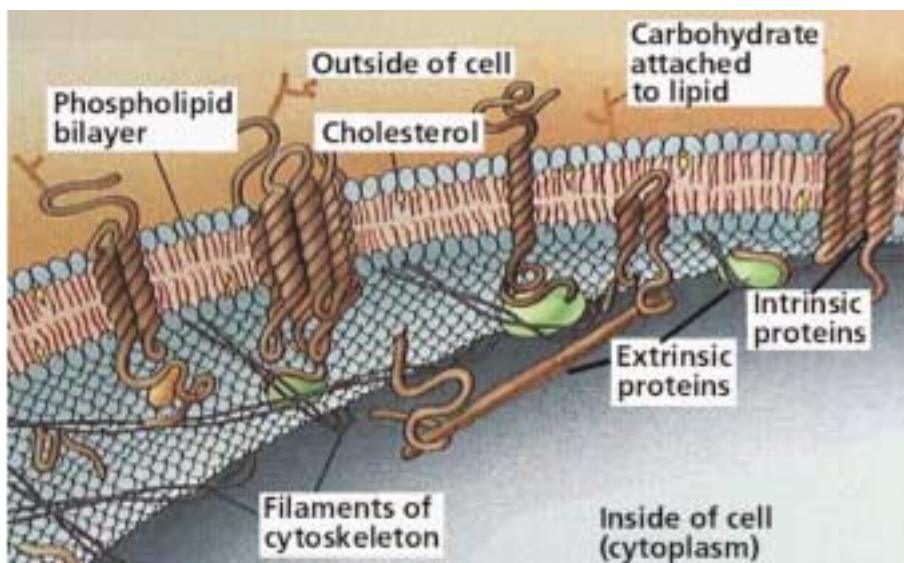
figuur 1. Structuur van een dierlijke cel (uit: <http://www.biosci.uga.edu/>).

ontstaan uit vooraf bestaande cellen; en 4) cellen bevatten erfelijke informatie die van generatie op generatie wordt overgedragen.

Cellen zijn onder te verdelen in prokaryotische (bacteriën) en eukaryotische (planten en dieren) cellen. Prokaryotische cellen zijn kleiner en missen de interne onderverdeling in organellen en daarmee de complexiteit van eukaryotische cellen. Afgezien van het type cel bezitten alle soorten cellen: een celmembran, DNA, cytoplasma, en ribosomen (figuur 1). Tevens zijn de cellen opgebouwd uit een kenmerkende, doch beperkende set op koolstof gebaseerde kleine moleculen die min of meer in elk levend organisme hetzelfde zijn. De voornaamste categorieën zijn suikers, vetzuren, aminozuren, en nucleotiden. Suikers leveren de energie aan de cel, vetzuren worden gebruikt voor de aanmaak van celmembranen, aminozuren zijn de bouwstenen van eiwitten en nucleotiden vormen een belangrijk onderdeel van RNA en DNA.

## DE CELMEMBRAAN

De celmembran heeft de functie van een semi-permeabele wand, die maar weinig moleculen doorlaat en ondertussen de meeste organisch geproduceerde chemische stoffen die in de cel gemaakt worden, binnenhoudt (figuur 2).



figuur 2. Schematische tekening van de celmembran (naar Purves *et al*, 2001).

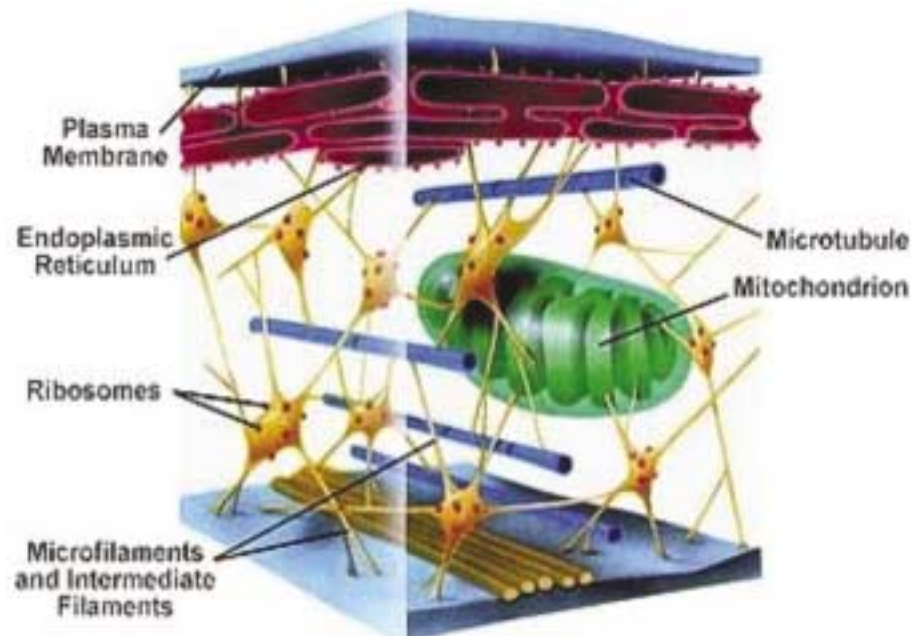
Het meest voorkomende molecuul in de membran is het fosfolipide, welke een polaire (=hydrofiel) kop heeft en twee niet-polaire staarten (=hydrofoob). Deze fosfolipiden zijn staart aan staart gelinieerd, zodat de niet-polaire delen een hydrofoob gebied vormen tussen de hydrofiel koppen aan de binnen- en buitenkant van de



membraan. Cholesterol is een andere belangrijke component die zich in de hydrofobe gebieden van de celmembraan bevindt. Celmembranen bevatten een groot aantal cholesterolmoleculen: gemiddeld één molecuul per fosfolipidemolecuul. Naast de regulering van de beweeglijkheid van de celmembraan, houdt cholesterol tevens de mechanische stabiliteit van de membraan in stand. Daarbij zijn er ook eiwitten opgeslagen in de binnenste laag, hoewel de meer hydrofiele delen van de eiwitten uitsteken in de binnenkant van de cel en/of naar de buitenkant van de cel. Deze eiwitten dienen als poort die sommige moleculen doorlaten om in of uit de cel te gaan. Het buitenste oppervlak van de membraan is meestal rijk aan glycolipiden, welke hun hydrofobe staart in de hydrofobe regio van de membraan hebben verstoppt, terwijl hun kop buiten de membraan steekt. Van deze glycolipiden wordt gedacht dat ze ter herkenning van hun soort werken. De inhoud van de cel wordt aangeduid als protoplasma en is verder onderverdeeld in cytoplasma (al het protoplasma behalve de inhoud van de kern) en het kernplasma.

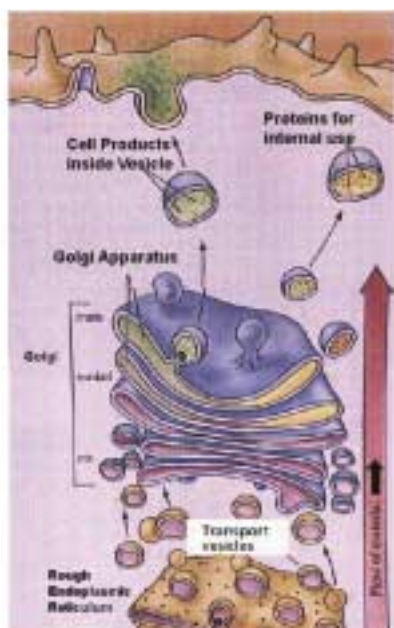
### HET CYTOPLASMA

Het cytoplasma is eerder gedefinieerd als het materiaal tussen de celmembraan en de nucleaire envelop. Vezeleiwitten die voorkomen in het cytoplasma, ook wel het cytoskelet genoemd, zorgen ervoor dat de cel dezelfde afmetingen behoudt (figuur 3).



figuur 3. Schematische tekening van het cytoskelet (uit: <http://www.biosci.uga.edu/>).

De belangrijkste zijn de actinefilamenten en de microtubuli. Tevens zorgen deze eiwitten ervoor dat organellen binnen de cel op hun plaats blijven maar ook zijn zij verantwoordelijk voor de interne beweging van de structuur in de cel. Microtubuli werken bij celscheiding en zijn bedoeld voor het tijdelijk ondersteunen van andere organellen. Actinefilamenten zijn dunne draadjes die bedoeld zijn voor de beweging van de organellen en/of eiwitten binnen de cel (de interne mobiliteit), maar ook voor de externe beweeglijkheid.



figuur 4. Eiwitsynthese en transport in vesicles (naar Purves *et al*, 2001).

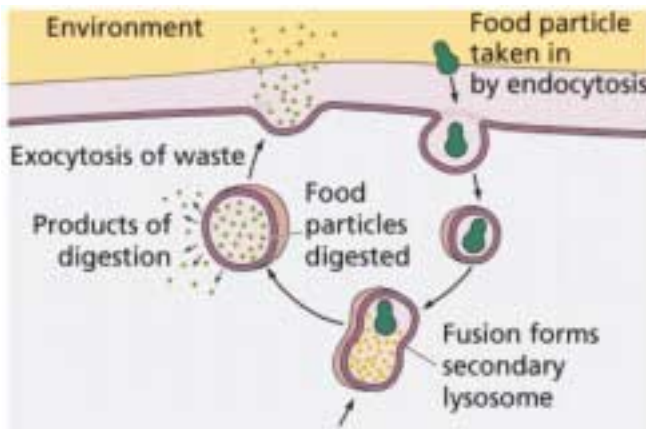
Het *endoplasmatisch reticulum* (ER) is een maas van aaneengesloten membranen die een functie vervullen bij de eiwitsynthese en het transport van eiwitten. Ruig ER wordt zo genoemd door zijn ruige uiterlijk dat hij krijgt door de vele ribosomen die op het ER liggen. *Ribosomen* zijn de plekken waar de eiwitsynthese plaatsvindt. Ruig ER heeft een link met de nucleaire envelop via het messenger RNA (mRNA), welke de blauwdruk is voor de eiwitsynthese op de ribosomen. Glad ER heeft geen ribosomen en er wordt gedacht dat het een functie heeft bij het transport van eiwitten door de vorming van *vesicles*.

*Golgi complexen* zijn platgemaakte stukken van membraangebonden holtes. Ze functioneren als opslagplaats, waar ze vesicles van het ruige ER veranderen. Het Golgi-apparaat is de voornaamste regisseur van macromoleculair verkeer binnen de cel. De met eiwit gevulde vesicles worden in de richting van de celmembranen gestuurd en na versmelting met deze wordt de inhoud buiten de cel geledigd. Echter, de vesicles kunnen ook een intern doel hebben, bijvoorbeeld de vorming van een *lysosoom*.

## MEMBRAANTRANSPORT VAN MOLECULEN

Plasma (= cel)-membranen zijn voor de meeste (maar niet alle) moleculen een barrière. Deze wanden worden semipermeabel genoemd. Water heeft de neiging om zich van ruimtes met een hoge concentratie te verplaatsen naar ruimtes met een lagere concentratie. De celmembraan dient als een semipermeabele wand, die als functie heeft om alleen een paar moleculen door te laten en de meeste organische geproduceerde stoffen in de cel te houden. Slechts weinig verbindingen, waaronder diverse geneeskrachtige stoffen, kunnen zomaar deze membraan passeren. Indien zij dat kunnen, en wel zonder hulp van een transporteiwit, dan wordt het proces passieve diffusie genoemd, waarbij de drijvende kracht de concentratiegradiënt is. Passieve diffusie kan, in tegenstelling tot carriergemedieerde processen, in beide richtingen plaatsvinden.

Vele stoffen kunnen niet passief opgenomen worden en hebben voor hulp bij transport een eiwit nodig. De transporteiwitten die zich in de celmembraan bevinden, zijn erg kieskeurig wat betreft de substraten die de membraan mogen passeren. Sommige van deze eiwitten kunnen alleen materialen door de membraan verplaatsen als ze worden geholpen door de concentratiegradiënt. Hierbij wordt geen energie van de cel gebruikt en dit type transport heet *facilitated diffusion*. Daarentegen gebruikt actief transport wél energie van de cel, meestal in de vorm van ATP of uit cotransport van bijvoorbeeld een ander ion, zoals  $\text{Na}^+$  of  $\text{H}^+$ . Een voorbeeld hiervan is het transport van moleculen zoals eiwitten, peptides en glucose over de celmembraan. Hierin worden er twee transportrichtingen onderscheiden. Exocytose is het proces waarbij de moleculen die in de cel worden gesynthetiseerd, verpakt worden in membraangebonden vesicles en geëxporteerd uit de cel (figuur 5). Hierbij fuseren de vesicles met het buitenste gedeelte van de celmembraan. De geëxporteerde materialen zijn celspecifieke eiwitten, neurotransmitters en een grote verscheidenheid aan andere moleculen.



figuur 5. Vesicle-gemedieerd transport over de celmembraan (naar Purves *et al*, 2001).

Endocytose (figuur 5) is het omgekeerde van exocytose. Een voedseldeeltje buiten de cel wordt omsloten door een deel van de membraan van de cel en zo naar binnen geloodst. Hierbij ontstaat een vesicle. Bij endocytose kunnen verschillende mechanismen worden onderscheiden: pinocytose, fagocytose en receptorgemedieerde endocytose. Fagocytose wordt uitgevoerd door speciale cellen (macrofagen) die grote extracellulaire deeltjes zoals dode cellen of indringers omvatten en dan naar het lysosoom transporteren. Pinocytose is het proces waarbij microscopisch kleine vloeistofdruppels door levende cellen via instulpingen van de celmembraan worden opgenomen. Tenslotte, receptor-gemedieerde endocytose komt voor als het materiaal dat getransporteerd moet worden zich bindt aan bepaalde gespecificeerde moleculen in de membraan. Voorbeelden hiervan zijn het transport van insuline en cholesterol in dierlijke cellen, maar ook vectormoleculen met eraan geassocieerd een geneesmiddel voor afgifte in de cel.

## EEN PRAKTIJKVOORBEELD: GENTHERAPIE

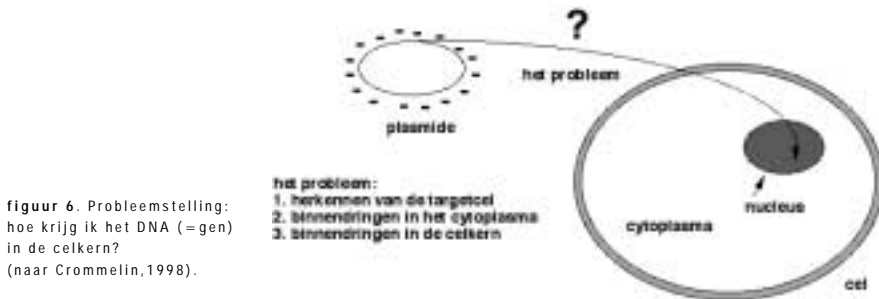
Celmembranen verhinderen de opname van macromoleculen zoals eiwitten en peptides, maar ook DNA en RNA, tenzij er actief transport plaatsvindt. Receptor-gemedieerde endocytose omvat de hechting van het vectormolecuul, met eraan vast het geneesmiddel, aan een specifiek ligand op de celmembraan. De vorming van endosomen is een efficiënt proces, echter de afgifte van de (intacte) macromoleculen wordt verhinderd door een inadequate ontsnapping uit de endosoom, gevolgd wordt door lysosomale afbraak.

Een verhoogde endosomale ontsnapping kan worden verkregen door het gebruik van onder andere lytische peptides en/of pH-gevoelige vectormoleculen die de membraan destabiliseren. Tevens kan er direct overdracht van het geneesmiddel in het cytoplasma plaatsvinden door de fusie van de lipide membranen, zoals bij virosomen en liposomen het geval is. Ook is het mogelijk dat de cel gebruik maakt van transductie: de macromoleculen passeren de celmembraan en komen het cytoplasma binnen in een receptor-onafhankelijke wijze. Het mechanisme is vooralsnog niet ontrafeld, maar het lijkt erop dat deze peptides direct met de lipide bilaag van de celmembraan reageren. Peptides die transductie teweegbrengen (PTDs, *protein transduction domains*) zijn afgeleid van eiwitten van virussen en van *Drosophila antennapedia*, maar ook van menselijk anti-DNA antilichamen (Torchilin en Lukyanov, 2003; Diatos, 2002). Het voordeel van het gebruik van de humaanafgeleide peptides is dat er geen immunologische reactie verwacht wordt bij humaan gebruik van deze peptides gekoppeld aan (synthetische) intracellulaire afgiftesystemen.

Aan de hand van een voorbeeld uit de gentherapie zal worden geïllustreerd welke obstakels DNA moet overbruggen om efficiënt en intact de kern te bereiken. Als macromolecuul is hier gekozen voor het DNA, echter de te overbruggen intracellulaire barrières gelden in grote lijnen ook voor elk ander geneesmiddel, zoals eiwitten en peptides, die de cel als einddoel hebben.

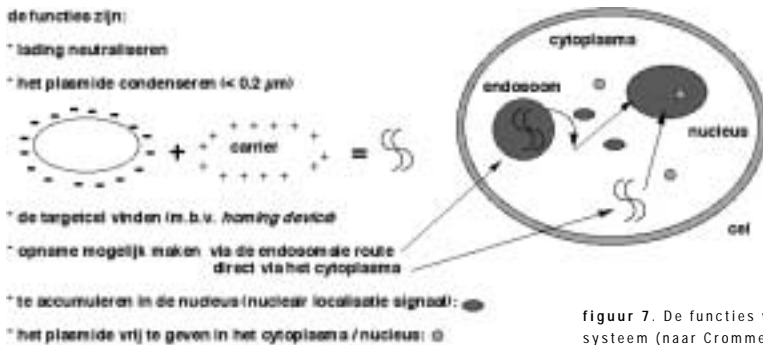
## PROBLEEMSTELLING

In principe is genterapie simpel: het inbrengen van genetisch materiaal (DNA) in cellen voor de behandeling van genetische defecten (bijv. cystic fibrosis), verworven defecten (kanker) en vaccinontwikkeling. In de praktijk blijken er nogal wat obstakels te zijn om dit te kunnen verwezenlijken. Maar dankzij betere afgiftesystemen is er goede hoop dat deze techniek in de toekomst succesvol zal gaan worden. Voor het succesvol afleveren van een gen in de doelcel moet er een efficiënt dragersysteem voor handen zijn die achtereenvolgens (1) de specifieke cel kan herkennen, (2) in staat is om de cel- en/of kernmembraan te passeren om (3) uiteindelijk in de kern het gen-van-interesse over te laten schrijven (figuur 6). Cruciaal voor het succesvol gebruiken van DNA als geneesmiddel is de transfectie-efficiëntie: in het algemeen ontvangen en expresseren de cellen te weinig exogeen DNA. Transfectie-efficiëntie is afhankelijk van zowel het doeltreffend afgeven van het DNA in de cel (en kern) en de daaropvolgende efficiënte afschrijving van het DNA. Er wordt veel onderzoek verricht om de specifieke opname van het DNA in de cel kern te vergroten, maar tot nu toe is het aantal cellen dat DNA efficiënt in hun kern afgegeven krijgt te klein om in voldoende mate te worden overgeschreven tot doeltreffend product. De uitdaging van DNA-afgifte omvat derhalve de ontwikkeling van een systeem dat zowel efficiënt is in de afgifte/overschrijving van het DNA, maar ook toepasbaar is in een klinische omgeving.



Drie belangrijke DNA-afgiftesystemen zijn er tot op heden ontwikkeld, te weten de recombinant virale vectoren, mechanische transfectiesystemen (bijv. electroporatie en microinjectie), en synthetische transfectiedeeltjes (bijv. kationische lipides en DNA-kationisch polymeer deeltjes (=polyplexen)). Door hun sterk ontwikkelde en gespecialiseerde componenten zijn de virale dragersystemen het meest effectief in DNA-afgifte met hoge efficiënties (>90%) voor zowel afgifte als overschrijving van het DNA. Zo rond de 60% van recente klinische trials met betrekking tot genterapie maken gebruik van recombinant virale vectoren, met name adeno- en retrovirussen voor DNA-afgifte in de cel. Echter, tot dusver is er geen definitief bewijs geleverd die de klinische toepassing en effectiviteit van een (viraal) genterapieprotocol ondersteunen. Dit is voornamelijk te wijten aan de

tekortkomingen van deze virale dragersystemen. Zowel de toxiciteit en immunogeniciteit van deze systemen, als wel de beperkte afgifte naar specifieke celtypes maken deze systemen onaantrekkelijk in een klinische omgeving. Daar komt nog bij dat retrovirussen (bij 34% van de onderzoeken) zich in het (menselijk) genoom insluiten en wanneer dit gebeurt op een zogenoemde *tumorsuppressor*-genlocatie, kan dit rampzalige gevolgen hebben voor de patiënt. Dit is recentelijk in een klinisch onderzoek voorgekomen waar twee van de elf behandelde patiëntjes met *severe combined immunodeficiency* (SCID) leukemie kregen omdat het (retrovirale) DNA in een actieve deel van het chromosomale DNA invoegde. 'Bubble boy disease' - een immuunziekte dat voorheen SCID genoemd werd - is de enige ziekte die genezen wordt met gentherapie. Wetenschappers hebben sinds lang gewaarschuwd dat kanker een serieus risico is van de toepassing van gentherapie met retrovirussen, zoals bij SCID toegepast wordt. Bij de behandeling worden er uit de beenmergcellen van het patiëntje in het laboratorium zogenoemde stamcellen geïsoleerd die vervolgens met een retrovirus geïnfecteerd worden die het ontbrekende gen vervangt. Na twee weken begint dan het eigen immuunsysteem op gang te komen en kan het patiëntje uit zijn 'bel' komen.



figuur 7. De functies van het drager-systeem (naar Crommelin, 1998).

Om de bovenstaande redenen wordt er veel onderzoek gedaan naar de ontwikkeling van efficiënte niet-virale, synthetische dragersystemen (figuur 7). Belangrijke voordelen van niet-virale vectoren ten opzichte van virale vectoren zijn, dat synthetische dragersystemen grotere stukken DNA kunnen vervoeren, herhaaldelijk geïnjecteerd kunnen worden zonder immunologische problemen te geven, en aangepast kunnen worden op specifieke wensen ter optimalisatie van specificiteit en effectiviteit. Een voorbeeld van een niet-viraal dragerstelsel zijn de kationische polymeren die, wanneer samengevoegd bij DNA, een complex vormen ter grootte van 100-200 nm (van de Wetering, 1999; Cherng, 1999). Deze zogenoemde polyplexen hebben een overwegend positieve lading en kunnen via interactie met de (negatieve) celmembranen worden opgenomen in vesicles.

## INTRACELLULAIRE BARRIÈRES

Polyplexen komen de cel binnen via lading-gemedieerde interacties met eiwitten op de celmembranen of via receptor-gemedieerde endocytose als gevolg van ligand-receptor bindingsinteracties. Beide methoden resulteren in de opname in vesicles en de uiteindelijke afgifte van het materiaal in de endosomen. Mede hierdoor ontstaan er intracellulaire barrières op de volgende stappen in het proces naar de kern: (1) endosomale ontsnapping, (2) de weg naar, en vervolgens (3) de opname in de kern met als laatste, (4) afschrijving van het vrije DNA in de kern.

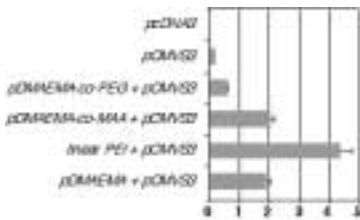
1. door de combinatie van het overwegend mild zure milieu van de endosoom/lysosoom (pH 5) en de chemische structuur van het polymeer werkt deze laatste als een endosomale ontsnappingsenhancer. Het polymeer bevat namelijk stikstofatomen die geprotoneerd kunnen worden en dus endosomale protonen consumeren. Deze zogenoemde 'protonspoons' leidt tot een toename in osmotische druk in het endosoom en veroorzaakt osmotische zwelling wat uiteindelijk de afgifte van de endosomale inhoud in het cytoplasma bewerkstelligt;
2. de weg die dan volgt is moeizaam. Virussen hebben de weg naar de kern gevonden door zich een weg te banen langs het cytoskelet. Zij bezitten specifieke eiwitten die zich via de filamenten het virus als een rups doen voortbewegen. Dit zorgt ervoor dat virussen ook niet-delende cellen kunnen transfecteren. Zonder hulp wordt het voor polyplexen moeilijk om zich een baan te breken door het cytoplasma richting de kern. Daar komt nog bij dat niet-delende cellen een hoge concentratie aan macromoleculen bevatten die diffusie van de polyplexen naar de kern bemoeilijken. Echter, gedurende een celdeling kan het zijn dat mede door de cytoplasmatische bewegingen en menging de polyplexen in de kern terecht komen;
3. de nucleaire porie laat deeltjes ter grootte van 39 nm door. Te klein voor virussen, maar weer hebben virussen hier iets op gevonden. Zowel adeno- als herpesvirussen geven hun DNA af bij de kern na aankomst voor de porie. Polyplexen zijn te groot voor passage door de nucleaire porie. Een oplossing hiervoor is gevonden in het synthetiseren van biodegradeerbare polymeren waarvan de polyplex zich in het cytoplasma dissocieert en het DNA vrijkomt voor afgifte naar de kern. Een ander mogelijkheid is het complexeren van polyplexen < 50 nm door de reactie-omstandigheden te variëren (Perales *et al.*, 1994);
4. na afgifte in de kern wordt het naakte DNA afgelezen, wat vervolgens leidt tot een product.

Op dit moment wordt de toepassing van genterapie alleen in somatische (overwegend niet-delende) cellen overwogen. Uit bovenstaande mag geconcludeerd worden dat niet-virale dragersystemen in het algemeen en de polykationische polymeren specifiek, voornamelijk een lage transfectie-efficiëntie hebben in niet-delende cellen. Als best-realiseerbare applicatie van de polymere transfectanten

wordt de DNA-immunisatie gezien. De argumentatie hiervoor is de volgende:

1. bij DNA-immunisatie volstaat lokale toediening (subcutaan, intramusculair) in plaats van systemische toediening zoals bij tumortherapie;
2. zelfs een geringe transfectie van antigeen-presenterende cellen (dendritische cellen, macrofagen) kan resulteren in een voldoende immuunrespons vanwege de natuurlijke versterkingsmechanismen die in het immuunsysteem zijn ingebouwd.

Mede door de (te) lage efficiëntie van niet-virale vectoren in niet-delende cellen, wordt hun toepassing voor vaccinatiedoeleinden verder onderzocht. Om een vaccin een effectieve immuunrespons te laten veroorzaken en dus bescherming tegen het antigeen teweeg te brengen, is het noodzakelijk dat cellen van het immuunsysteem adequaat het antigeen presenteren. Hiervoor lenen zich de kationische polymeren, die door middel van een ligand gericht naar deze cellen gestuurd kunnen worden. Daar komt nog bij dat niet alle cellen geraakt hoeven te worden voor een adequate immuunrespons. Recentelijk hebben dr G Bos en medewerkers (Bos *et al*, 2003) laten zien dat kationische polymeren gecomplexeerd met DNA, coderend voor het hepatitis B-oppervlak-antigeen, een sterke immuunrespons geven wanneer het wordt ingespoten in de spier van een muis (figuur 8). Onderzoek is gaande om dit verder te ontwikkelen tot een therapeutisch vaccin voor chronische hepatitis B-patiënten (interne gegevens Octoplus b.v.).



figuur 8. *In vivo* productie van het HBV-S-eiwit in muizen na i.m. injectie. De expressie van HBV-S-eiwit wordt weergegeven als de logaritme van het aantal picogrammen per gram spierweefsel (naar Bos *et al*, 2003).

De combinatie van gerichte, niet-virale dragersystemen en het feit dat men zich niet hoeft te richten tot alle cellen van het lichaam, brengt de klinische toepassing van gentherapie een stap dichterbij.



## REFERENTIES

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, en Walter P (Eds). *Molecular Biology of the Cell*, Fourth Edition. Garland Publishers – New York, NY 10003, USA (2002).
- Bos GW, Kanellos T, Crommelin DJA, Hennink WE, en Howard CR. *Cationic polymers that enhance the performance of HBsAg DNA in vitro and in vivo*. 2003 (manuscript submitted).
- Crommelin DJA. *Ontwerp en productie van genterapeutica*. In: *therapie aan gene zijde*. Stichting Anselmus Colloquium Houten (1998): pp 13-22.
- Diatos S.A. (F) and OctoPlus Technologies B.V. *TransPepDex, a novel platform for sustained intracellular delivery of therapeutic molecules*. P095/01/03 (2002).
- Purves W, Sadava D, Orians G, en Heller G (Eds). *Life: The Sciences of Biology*, Sixth Edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers – Sunderland, MA 01375-0407, USA (2001).
- Perales JC, Ferkol T, Beegen H, Ratnoff OD, en Hanson RW. *Gene transfer in vivo: Sustained expression and regulation of genes introduced into the liver by receptor-mediated uptake*. *Proc Nat Acad Sci USA* 1994; 91: 4086-4090.
- Torchilin VP en Lukyanov AN. *Peptide and protein drug delivery to and into tumors: challenges and solutions*. *Drug Discovery Today* 2003; 8: 259-266.
- Wetering, P van de. *Gene delivery with Cationic Polymers*. Thesis, Utrecht University (1999).
- Cherng, J-Y. *Pharmaceutical Aspects of Polymer-based Gene Delivery Systems*. Thesis, Utrecht University (1999).

AANTEKENINGEN

## AANTEKENINGEN

AANTEKENINGEN

## AANTEKENINGEN

AANTEKENINGEN

## AANTEKENINGEN

AANTEKENINGEN





## ORGANISATIE COMITÉ

DE VRIJESCHOOL, DE WERKZAMENENDE SCHOOLEN EN

DE NEDERLANDSE UNIVERSITEIT LEIDEN

DE RIJKS UNIVERSITEIT VAN LEIDEN, DE NEDERLANDSE RECHTERLIJKE HOOGESCHOOL ROTTERDAM

DE RIJKS UNIVERSITEIT UTRECHT EN DE WERKZAMENENDE SCHOOLEN

DE RIJKS UNIVERSITEIT GRIJNBURG

DE RIJKS UNIVERSITEIT