



Anselmus Colloquium

GROTE MOLECULEN, GROTE BELOFTEN
de wereld van de biofarmaca

Samenstellers
EMG van Bommel en E-J van Hoogdalem



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	GBP Consultancy bv
dr EJ van Hoogdalem	Octoplus nv
drs KH Hoogendoorn	Centocor bv
dr C Oussoren	Universiteit Utrecht
drs AMI van Paassen	Centocor bv
dr JJ Tukker	Pharmedia

Grote moleculen, grote beloften

de wereld van de biofarmaca

Samenstellers: EMG van Bommel en E-J van Hoogdalem

Houten: Stichting Organisatie Anselmus Colloquium (2008)

Met lit. opg.

ISBN/EAN 978-90-73520-20-2

Vormgeving en druk: Gildeprint BV, Enschede

Niets uit deze uitgave mag worden overgenomen op welke wijze dan ook, zonder voorafgaande toestemming van de auteursrechthouder
Houten, oktober 2008

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 in deze uitgave.

BIC

•

VA

•

VA

EIM

•

VA

•

FOI

AN

•

TO

•

BIC

TH

•

INHOUDSOPGAVE

BIOFARMACA, WAAR PRATEN WE OVER? • dr A Wafelman	4
VAN PATHOFYSIOLOGIE NAAR THERAPIE MET.....EIWITTEN • prof. dr H Schellekens	24
VAN PATHOFYSIOLOGIE NAAR THERAPIE MET BIJZONDERE EIWITTENANTILICHAMEN • dr C de Boer	34
VAN PATHOFYSIOLOGIE NAAR THERAPIE METNUCLEÏNEZUREN • dr R Schiffelers	66
FORMULERING VAN BIOFARMACA: SIMPELE OPLOSSINGEN, COMPLEXE ANALYSES • prof. dr W Jiskoot en drs KH Hoogendoorn	76
TOEDIENING VAN BIOFARMACA: SLIKKEN, SNUIVEN OF TOCH SPUITEN? • dr R Verrijck, drs D Deken en dr B Kremer	92
BIOFARMACON Z.K.M. DIAGNOSTICUM VOOR GEÏNDIVIDUALISEERDE THERAPIE • prof. dr J Schellens	110

DR AR WAFELMAN



Amon Wafelman studeerde farmacie in Amsterdam (doctoraaldiploma cum laude in 1987) en Groningen (apothekersdiploma in 1989). In de periode 1991-1994 werd vanuit het Slotervaartziekenhuis een promotie-onderzoek uitgevoerd betreffende ($[^{131}\text{I}/^{123}\text{I}]$ -) *meta*-joodbenzylguanidine in het Nederlands Kanker Instituut, promotores Prof.dr.J.H. Beijnen en Prof.dr. R.A.A. Maes. Dit onderzoek werd gecombineerd met de uitoefening van toezicht op de farmaceutische verzorging van de GG&GD te Amsterdam.

In 1994 werd hij manager kwaliteitscontrole/kwaliteitsborging bij Byk Nederland en sinds 1996 werkt hij in het Leids Universitair Medisch Centrum aan de kwaliteitszorg voor immuno- en genterapeutica, van 2000 tot 2005 als sectiehoofd van deze experimentele sectie. In de periode 1997-2000 heeft hij tevens de opleiding tot ziekenhuisapotheker gevolgd.

Vanaf 2006 is Wafelman ziekenhuisapotheker aan het LUMC, en hoofd kwaliteitsbeheer en qualified person. Tevens is hij secretaris van de NVZA-SIG Biotechnologie en Immunotherapie en hebben de biofarmaca blijvend zijn aandacht.

BI

AV

geb

A

A

C

C

C

C

C

C

E

F

F

F

C

II

II

H

M

n

M

P

R

rl

T

T

V

V

BIOFARMACA, WAAR PRATEN WE OVER?

A Wafelman

gebruikte afkortingen in dit hoofdstuk

ADCC	antibody dependent cellular cytotoxicity
ALL	acute lymfatische leukemie
CDC	complement dependent cytotoxicity
CDR	complementarity determining region
CH1..3	constant deel (van zware ketens van antilichaam)
CHO	chinese hamster ovariumcellen
CL	constant deel (van lichte ketens van antilichaam)
EGFR	epidermale groeifactor receptor
Fab	fragment antigen binding
Fc	fragment crystallizable
FcRn	neonatale Fc-receptor
GMP	goede manieren van produceren
IFN	interferon
IL	interleukine
HSA	humaan serum albumine
Mab	monoclonaal antilichaam
mPEG	monomethoxy polyethyleenglycol
Mw	molecuulgewicht
PSA	polysialzuur
RA	rheumatoïde arthritis
rh	recombinant-humaan
TNF	tumor necrose factor
TSE	transmissible spongiform encephalopathy
VH	variabel deel van zware ketens van antilichaam
VL	variabel deel van lichte ketens van antilichaam

Inleiding

Over een geschatte wereldwijde omzet aan monoclonale antilichamen (*mabs*) in 2011 van \$ 24 miljard USD (Deonarain, 2008). Voor Nederland geldt dat twee biofarmaca in de top 10 van geneesmiddelenuitgaven 2007 staan: etanercept (Enbrel[®]) met € 80 miljoen op de 5^e plaats en adalimumab (Humira[®]) op de 7^e plaats met € 73 miljoen, beide tegen rheumatoïde arthritis (RA). Kijkt men naar de toename in geneesmiddelenuitgaven 2007, dan staan beide middelen zelfs op de 2^e, resp. 4^e plaats. Biofarmaca zijn onder te verdelen in biologica (*biologicals*), die worden geïsoleerd uit mens, dier of plant, en biotechnologica (*biopharmaceuticals*), die worden geproduceerd door hybridoomtechnologie en/of recombinant DNA (rDNA)-synthese. *Biopharmaceuticals* zijn zeer verwant aan *biologicals*: beide worden door organismen geproduceerd, zij het dat de eerste onder GMP-condities in celkweek worden geproduceerd, terwijl de laatste geïsoleerd worden uit bijvoorbeeld bloed van een mens, die uit oogpunt van GMP onder ongecontroleerde omstandigheden leeft. *Biologicals* worden nog steeds toegepast, waarbij te denken valt aan heparine (- Leo[®]), nadroparine (Fraxiparine[®]), factor VIII (AAfact[®]), IVIG (Nanogam[®]) en albumine (Cealb[®]). *Biopharmaceuticals* zijn door hun grootte, complexiteit, mogelijke immunogeniteit, gevoeligheid voor schudden (vanwege aggregaatvorming) en microbiologisch risico (niet alleen vanwege bacteriën en schimmels maar ook vanwege virussen en prionen^{*1}) anders dan de chemisch gesynthetiseerde *small molecules*. Tot de *biopharmaceuticals* behoren onder andere de 5 generaties mabs met infliximab (Remicade[®]) en trastuzumab (Herceptin[®]) als bekendste, het rh-octocog- α (Kogenate Bayer[®]), rh-insuline lispro (Humalog[®]), en rh-darbepoëetine- α (Aranesp[®]). De laatste twee geneesmiddelen – die gezien kunnen worden als tweede generatie *biopharmaceuticals* (Walsh, 2004) – noem ik om te onderstrepen dat de kracht van biotechnologie niet alleen zit in het namaken maar ook in het verbeteren van de natuurlijke (glyco)proteïnen. Ten slotte worden ook genterapeutica wel tot de *biopharmaceuticals* gerekend, maar gezien het feit, dat deze strikt genomen geen producten zijn, maar ‘producerende organismen’, vallen zij buiten de *scope* van dit hoofdstuk.

In welke organismen worden *biopharmaceuticals* geproduceerd? Met name in de bacterie *E coli* en in de ovariumcellen van de chinese hamster (CHO). De voordelen

*1 die TSE kunnen overbrengen

van E coli zijn, dat het een – zowel bij fabrikant als overheid - bekend productie-organisme is met relatief eenvoudige, goedkope kweekomstandigheden. De genoemde zoogdiercellijn is eveneens bij fabrikant en overheid bekend en kan in tegenstelling tot E coli het eiwitproduct posttranslationeel glycosyleren, en is dus in tegenstelling tot E coli geschikt voor de productie van glycoproteïnen). Daar staat tegenover dat CHO-cellen onder complexe omstandigheden gekweekt en gefermenteerd moeten worden, hetgeen de productie duur maakt.

Monoclonaal versus polyclonaal, rDNA-synthese en *downstream processing**¹

Als men een gezonde muis met een antigeen inspuit, zullen er door verschillende B-cellen tegen de verschillende epitopen van dat antigeen antilichamen geproduceerd worden, waarbij één B-cel slechts één type antilichaam kan produceren. Als men vervolgens bloed aftapt, bevat dat antilichamen uit verschillende B-cellen gericht tegen verschillende epitopen van het antigeen, dus polyclonaal, ook wel antiserum genoemd.

Als men van bovengenoemde muis geen bloed aftapt, maar de milt verwijdert, hieruit één B-cel isoleert en deze laat fuseren met een muizemyeloomcel om de B-cel onsterfelijk te maken, dan heeft men een celkweek als bron voor een volledig murien monoclonaal antilichaam (zie als voorbeeld muromonab-CD3 in tabel 1). Het eenvoudigste (micro)-organisme dat voor rDNA-synthese wordt toegepast is de bacterie E coli, die naast chromosomaal DNA ook enkele ringvormige stukken DNA in het cytoplasma heeft zitten, plasmiden, die even goed worden afgelezen. Een plasmide wordt enzymatisch geopend. Een promotor en het gen voor het te produceren eiwit (= transgen) worden in het plasmide ingebouwd, evenals een antibioticum-resistentiegen. Dit gemodificeerde plasmide heet de vector. De vector wordt in het cytoplasma van de bacterie gebracht. Vervolgens moet de getransfecteerde bacterie in aanwezigheid van het antibioticum waarvoor de getransfecteerde bacterie resistent is, zich vermenigvuldigen, terwijl de niet-getransfecteerde bacteriën door het antibioticum gedood worden. Na de fase van vermenigvuldiging worden de bacteriën door veranderde voedingsomstandigheden in de eiwit-productiefase gebracht (zie figuur 1).

*¹*downstream processing* = alle fabricagestappen nadat het eiwit is geproduceerd

Tabel 1. Diverse gegevens van enkele MAbs, een Fab, een gePEGylerde Fab, fusie-proteïnen¹ en een gePEGylerde oplosbare Cytokine Receptor

Mab/Fab/FusProt/sCR	t _{1/2} ² (plasma)	Immunogeniteit	target; indicatie	Referenties
muromonab-CD3 Orthoclone-OKT3 [®] M	18 u	80 %	CD3; reëctie transplantaat	(Ros; Ste)
abciximab Reopro [®] Fab	20-30 m	6 %	GP2b/3a; profylaxe cardiale ischemie	(Ros; Sch; Wag)
rituximab Mabthera [®] M	3-17 d	1 %	CD20; B-cellymfoom	(Ros; Ste)
influximab Remicade [®] M	8-10 d	8 ³ -43 % RA pat. 61 % Crohn pat.	TNF α ; RA, ziekte v. Crohn	(Jen; Bae; Wol; Ste)
trastuzumab Herceptin [®] M	6-28 d	0 %	HER2/neu; borstkanker	(Bru; Ros)
Alemtuzumab Campath [®] M	12 d	2 % CLL pat. 63 % RA pat.	CD52; CLL	(Ros)
Certolizumab pegol Cimzia [®] PEG-Fab	14 d	8 %	TNF α ; ziekte v. Crohn	(Bli; San)
abatacept Orencia [®] FuPr	13 d	3 %	CD80 en -86; RA	(Hag; Lun)
etanercept Enbrel [®] FuPr	3-5 d	6 %	TNF α ; RA, psoriasis	(Dor; Jen; Kaw)
pegsunercept PEG-sCR	3 d	5 %	TNF α ; RA	(Dav)
adalimumab Humira [®] M	14 d	1 ⁴ -17 %	TNF α ; RA	(Bar; Ros)
panitumumab Vectibix [®] M	8-16 d	0 %	EGFR; solide tumoren	(Jak; Row; Wei)

¹ Fusie-proteïne = een oplosbare (= extracellulaire domein van een) Cytokine Receptor gekoppeld aan het Fc van een mab. In het geval van abatacept is de Cytokine Receptor het humaan cytotoxische T-lymfocyt-geassocieerde antigeen-4 (CTLA-4) (Haggerty *et al*, 2007); in het geval van etanercept is de Cytokine Receptor een Tumor Necrose Factor α -receptor (Dore *et al*, 2007).

² u = uur; m = minuten; d = dagen

³ Deze patiënten kregen ook methotrexaat toegediend.

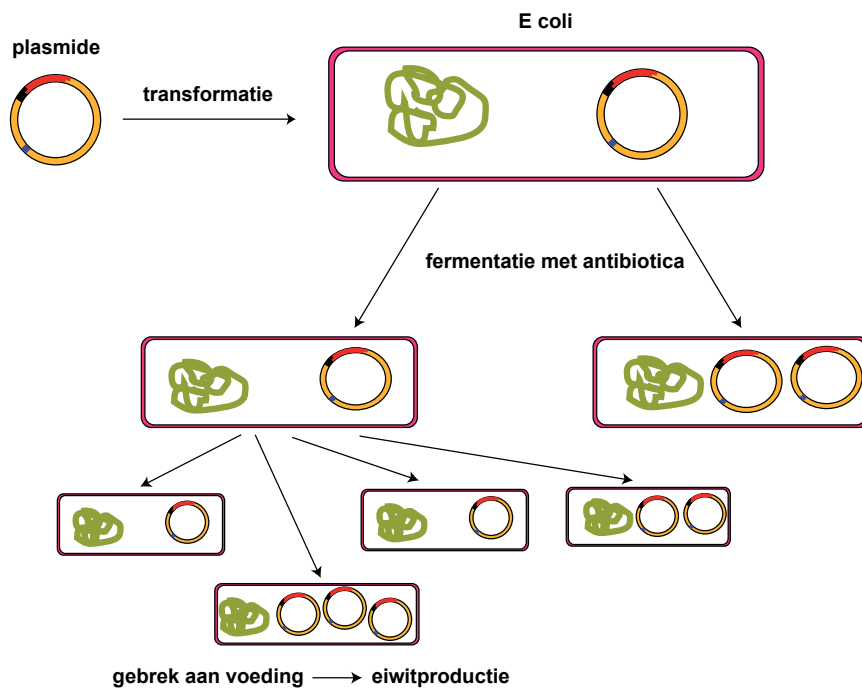
⁴ Deze patiënten kregen ook methotrexaat toegediend.

Het complexe proces van grondstof tot *biopharmaceutical* valt uiteen in 7 hoofdstappen, die elk van invloed kunnen zijn op de biologische activiteit of immunogeniteit van het product (Crommelin *et al*, 2003; Sharma, 2007a; Wafelman, 2001).

- ontwikkeling van het productie-organisme,
- opzetten van een *master cell bank*,
- eiwitproductie,
- zuivering,
- analyse,
- eindformulering,
- opslag en *handling*.

Fig
DN
resis
(figu

Enl
kw
rh-
vitr
(IFI
doc
zijn
in 2
teg
ver
zui
en
net
hog
hoc



Figuur 1. Het principe van rDNA-eiwitsynthese. Het ineengekronkelde groene materiaal is het chromosomale DNA van E coli; de ringvorm is een plasmide, waarbij dit plasmide gemodificeerd is met een antibioticum-resistentiegen (blauw), een promoter (groen) en het transgen (rood). Voor het overige zie de tekst. (figuur afgedrukt met toestemming, van Chiron bv)

Enkele voorbeelden van variatiebronnen tijdens het proces: variatie in kweekcondities tijdens eiwitproductie en in zuiveringsmethoden leidde tot rh-epoëtines met aanzienlijke verschillen in glycosylering en daarmee in *in vitro* en *in vivo* (muis) biologische activiteit (Yuen *et al*, 2003). Interferon- β 1a (IFN β 1a; Avonex[®], Rebif[®]) heeft de natuurlijke aminozuursequentie en wordt door twee fabrikanten in zoogdiercellen geproduceerd, dus beide producten zijn geglycosyleerd. Toch is het percentage multiple sclerose-patiënten dat in 2 trials neutraliserende antilichamen produceert tegen Avonex[®] 2-9% en tegen Rebif[®] 15-46% (Sölberg Sørensen *et al*, 2003; Bertolotto *et al*, 2004). Dit verschil wordt in ieder geval ten dele toegeschreven aan andere productie- en zuiveringsomstandigheden (Bertolotto *et al*, 2004). Verschil in opslagtemperatuur en verschil in productkwaliteit van IFN α 2a leidde tot een verschil in titer van neutraliserende antilichamen tegen IFN α 2a in behandelde patiënten, waarbij de hogere opslagtemperatuur (15-25°C) aanleiding gaf tot de hoogste titers en de hoogste hoeveelheid aggregaten (Hochuli, 1997; Ryff, 1997). Ook Hermeling *et al*

(2004) en Sinclair en Elliott (2005) noemen aggregaten als een belangrijke factor in de toename van immunogeniteit van proteïnen.

Het laatste voorbeeld is de veelbesproken plotselinge toename in erythrocytaire aplasie bij gebruikers van Eprex® in 1998, die samenviel met een veranderde samenstelling van de formulering: substitutie van HSA door polysorbaat 80. De vermoedelijke oorzaak voor de immuunreactie is gelegen in extractie door polysorbaat 80 van verbindingen uit de ongecoate rubberen plunjerkoppen van de voorgevulde spuit. De oplossing leek het gebruik van plunjers met gecoate koppen (Sharma, 2007b). Als alternatieve risicofactor voor de ontwikkeling van antilichamen is echter genoemd de vorming van micellen met erythroproëetine door de aanwezigheid van polysorbaat 80 (Hermeling *et al*, 2003).

Biologische veiligheid

Er wordt door de registratie-autoriteiten veel aandacht gevraagd voor de biologische veiligheid van biofarmaca. Met *biologicals* zijn ons dan ook uit het verleden ernstige¹ incidenten bekend, zoals in de jaren 80 het met HIV besmet raken van patiënten na toediening van besmette stollingsfactoren (Minor, 1994). Sindsdien is het beleid rondom voorkómen en verwijderen c.q. inactiveren van prionen en virussen aangescherpt en zijn de technische mogelijkheden verbeterd. Tot aan het begin van de jaren 90 had men de *solvent-detergent* methode en incubatie bij lage pH en verhoogde temperatuur als technieken om omhulde virussen (zoals hepatitis B, HIV en Epstein-Barr-virus) volledig te inactiveren. Deze methode werkt echter slechts gedeeltelijk bij naakte virussen (zoals hepatitis A, reo- en parvovirus). Toen kwam midden jaren 90 de 15- of 35-nm nanofiltratie beschikbaar, een techniek om alle virussen, naakt én omhuld, te verwijderen tot aan het kleinste, naakte virus (parvovirus, 18-26 nm) met 5 logs-reductie (Burnouf en Radosevich, 2003). Hoewel het grootste immunoglobuline, IgM met 970 kD en 22 nm theoretisch te groot zou zijn voor deze filtratie, blijkt dit in de praktijk door de flexibiliteit van het IgM door het filter heen te gaan, in tegenstelling tot

¹Overigens niet met biopharmaceuticals, getuige EMEA ICH Topic Q5A: 'To date, however biotech products derived from cell lines have not been implicated in the transmission of viruses.'

²Cofact®, Factor VII (Baxter), Feiba NF®, Kiovig®, Nanogam®, Nonafact®, WinRho SDF® en in de nabije toekomst ook Cetor®.

het
wo:
pro
Vae
pro
chr
die
al, 2
bes
Uit
var
bec
slec
bijn
(Ro
die

Ins

Na:
zov
(Nc
det
wei
mir
Dat
kar
Gla
pH
inje
var
aan
Ha:
lag

GRO

het parvovirus, dat een star skelet heeft (Maerz *et al*, 1996). Sinds de introductie wordt nanofiltratie steeds meer toegepast, ook bij in Nederland op de markt zijnde producten (Terpstra *et al*, 2006).²

Vaak worden meerdere virusinactiverende of –verwijderende stappen in het productieproces opgenomen en worden enkele van deze, zoals anion-exchange chromatografie, 15 nm-nanofiltratie en koude ethanolfractionering met dieptefiltratie ook gevalideerd voor de uitschakeling van prionen (Poelsler *et al*, 2008; Terpstra *et al*, 2007). Daarnaast wordt een enkel product nog steeds γ -bestraald, zoals foetaal kalfsserum met 25 kGy.

Uit oogpunt van biologische veiligheid streeft men ernaar in het productieproces van een *biopharmaceutical* zo min mogelijk *biologicals* te gebruiken. Bij de beoordeling van de biologische veiligheid van een *biopharmaceutical* dient men niet slechts te kijken naar de eindformulering, maar ook of er soms in de productiefase, bijvoorbeeld als mediumcomponent, niet van een *biological* gebruik is gemaakt (Roddie en Ludlam, 1997). Ook ziet men dat productieprocessen van producten, die reeds op de markt zijn in dit opzicht worden verbeterd (Anoniem, 2001).

Insuline en -analoga

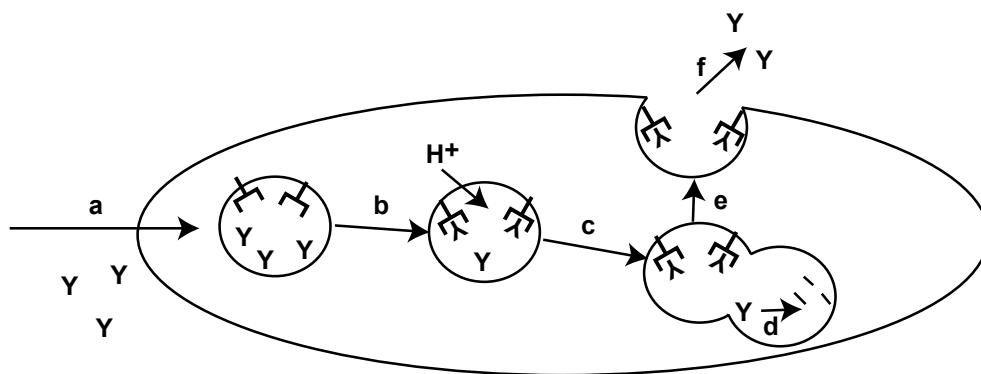
Naast rh-insuline behoren ook de volgende analoga tot de *biopharmaceuticals*: zowel snel-en-kortwerkende analoga (insuline lispro (Humalog[®]), insuline aspart (Novorapid[®]) en insuline glulisine (Apidra[®])) als langwerkende analoga (insuline detemir (Levemir[®]) en insuline glargine (Lantus[®])). Lispro, aspart en glulisine werken sneller en minder lang dan gewone insuline, doordat hun configuratie minder neigt tot zelf-associatie en dus voor een veel groter deel monomeer blijft. Dat heeft ondermeer als voordeel, dat men de analoga echt kort vóór de maaltijd kan toedienen in tegenstelling tot gewone insuline: 30-45 minuten vóór de maaltijd. Glargine ontleent zijn lange werking aan de vorming van microprecipitaten bij pH 7,4 op de plaats van subcutane injectie. Detemir blijft opgelost na subcutane injectie, maar ontleent zijn verlengde werking aan zelf-associatie op de plaats van injectie en, eenmaal in het centrale compartiment, aan reversibele binding aan albumine. Als voordelen van glargine en detemir, boven neutraal protamine Hagedorn (NPH), worden genoemd: minder hypoglycaemie, en bovendien een lagere, nuchtere bloedsuikerspiegel bij éénmaal daagse dosering (Roach, 2008).

Monoclonale antilichamen, fusie-proteïnen en afgeleide verbindingen

De natuurlijke antilichamen zijn er in het isotype IgA, IgD, IgE, IgG en IgM. De *biopharmaceuticals* die op dit moment in ontwikkeling of reeds op de markt zijn, zijn alle van het isotype IgG. Een igG-antilichaam bestaat uit twee zware en twee lichte ketens, bijeengehouden met disulfide-bindingen, heeft een molecuulgewicht van 150 kDa en een halfwaardetijd in plasma van 23 dagen, m.u.v. subtype IgG3 (zie verder Lobo *et al*, 2004). De lichte ketens bestaan elk uit een variabel deel (VL), van belang voor binding van het antigeen, en een constant deel (CL); de zware ketens elk uit een variabel deel (VH) en drie constante delen (CH1, CH2 en CH3) – zie voor een voorbeeld infliximab in figuur 5 – die op CH2 geglycosyleerd zijn. Aan de uiteinden van VH en VL bevinden zich de antigeenbindingsplaatsen, in vakjargon *complementarity determining regions* (CDR). Behalve bovengenoemde structurele tweedeling: variabel versus constant, hanteert men ook een functionele tweedeling: het *fragment antigen binding* (Fab), bestaande uit VL-CL en VH-CH1, en het *fragment crystallizable* (Fc), bestaande uit de 'brug' (*hinge*), CH2 en CH3. Fab heeft een mw van ≈ 50 kDa en een halfwaardetijd in plasma van maximaal enkele uren (zie als voorbeeld abciximab in tabel 1). Fc heeft een mw van ≈ 100 kDa en een halfwaardetijd gelijk aan het hele IgG. De Fc bepaalt het subtype IgG:1 t/m 4. Dit subtype is bepalend voor de farmacokinetiek en farmacodynamiek van het antilichaam. IgG1, -2 en -4 hebben een hoge affiniteit voor de Brambell of neonatale Fc-receptor (FcRn), die het antilichaam beschermt tegen afbraak. IgG3 heeft een lagere affiniteit voor FcRn, waardoor het een kortere (ca. 7 dagen) halfwaardetijd heeft dan de andere IgG's (Ternant en Paintaud, 2005; Jefferis R, 2007; zie ook figuur 2).

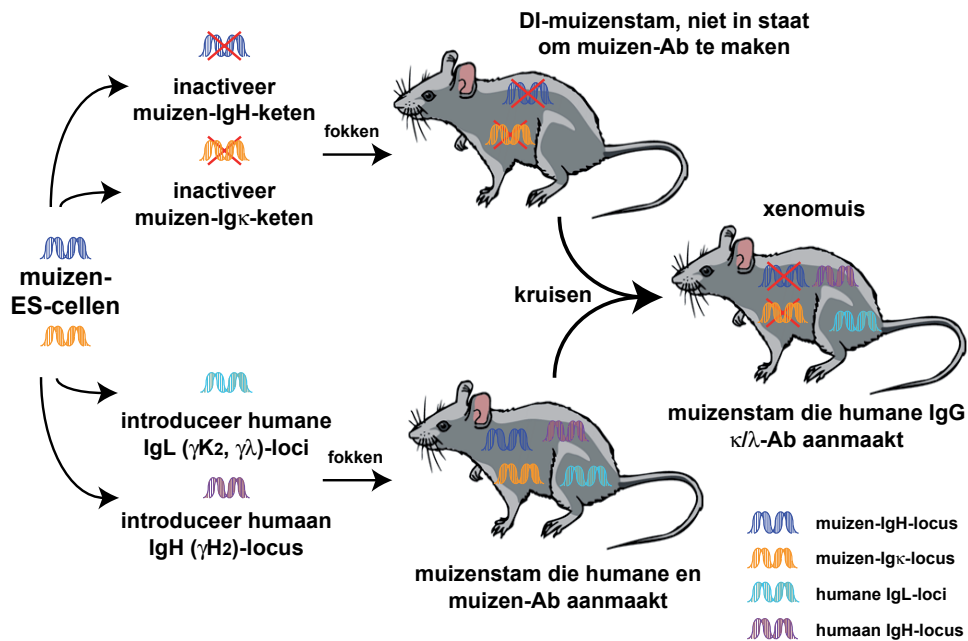
*Figuur 5
mid
FcRn
door
wor
inter*

De
mu
naa
een
te v
me:
het
dee
-xi
vol
en o
voc
(Ne
- tu
laal
et a



Figuur 2. Interactie FcRn – IgG. a) IgG moleculen treden de cel (zoals vaatendotheel- of spiercellen) binnen door middel van pinocytose; b) H^+ treedt het endosoom binnen, waardoor de pH ter plaatse omlaag gaat en IgG met FcRn bindt; c) het endosoom fuseert met een lysosoom; d) ongebonden IgG wordt afgegeven aan het lysosoom en door proteases gekatabolyseerd; e) het endosoom fuseert met het celmembraan, waardoor het FcRn-IgG complex wordt blootgesteld aan fysiologische pH, waardoor f) het IgG weer los komt van FcRn en in het plasma of de interstitiële vloeistof terecht komt (figuur afgedrukt met toestemming van Lobo et al, 2004).

De eerste generatie mabs, waartoe muromonab-CD3 behoort, is volledig murien, en herkenbaar aan het tussenvoegsel –mo- in de naamgeving. Voor de naamgeving van antilichamen wordt verwezen naar pagina 44 van dit boek. In een poging, de immunogeniteit van de Mabs te verminderen, de halfwaardetijd te verlengen en de effectorfuncties ADCC en CDC (zie verder) te benutten, heeft men in eerste instantie de humane genetische code voor het constante deel van het mab gerecombineerd met de muriene genetische code voor het variabele deel van het Mab: een zogenaamd chimeer antilichaam met het tussenvoegsel –xi-, zoals infliximab (figuur 5). Een dergelijk mab is voor 65-90% humaan. De volgende stap was om nog slechts de CDR door muriene genen te laten coderen en de rest recombinant humaan, hetgeen leidde tot gehumaniseerde mabs, die voor 95% humaan zijn, met als tussenvoegsel –zu- en als voorbeeld trastuzumab (Newsome en Ernstoff, 2008). Inmiddels kan men volledig humane mabs maken – tussenvoegsel –u-, eerst met behulp van bacteriofagen (adalimumab) en als laatste techniek is toegevoegd de xenomuis (panitumumab; zie Figuur 3 en Roskos et al, 2004).



Figuur 3. De xenomuis. Met behulp van gen-knockout technologie wordt in muriene embryonale stamcellen de muriene genetische code voor het produceren van mabs uitgeschakeld. In andere muriene embryonale stamcellen worden de benodigde humane code's voor het produceren van mabs toegevoegd, en de uit deze twee groepen gefokte muizen worden met elkaar gekruisd, resulterend in de xenomuisen, die alleen humane mabs kunnen produceren (figuur afgedrukt met toestemming van Jakobovits et al, 2007).

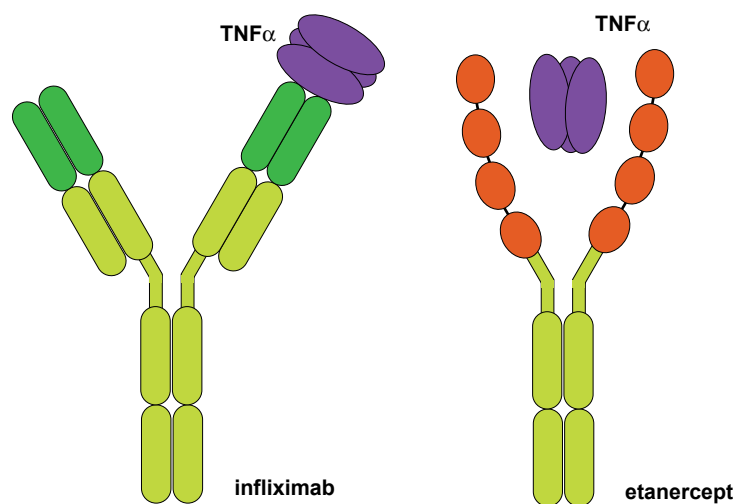
Bovenin tabel 1 staan twee *biopharmaceuticals* met een goed te verklaren, korte halfwaardetijd. Muromonab-CD3 is een volledig murien monoclonaal, en het muriene Fc heeft een lage affiniteit voor de humane FcRn; en abciximab, een Fab, dat niet bindt aan FcRn en dat met zijn mw van 50 kDa nog onderhevig is aan renale klaring (Roskos *et al*, 2004). Abciximab is bewust als Fab ontwikkeld: voor de toepassing als adjuvans na dotteren is de korte plasma eliminatie-halfwaardetijd geen probleem en omdat het geen suikerketen oftewel glycaan nodig heeft is de productie relatief goedkoop, want in *E coli* (Schrör en Weber, 2003). Voor wat betreft de halfwaardetijden van de mabs kan men voorts concluderen, dat de stap van murien naar chimeer een significante toename heeft laten zien, maar dat de ghumaniseerde en humane mabs niet van de chimere verschillen. Dat is ook niet vreemd, wanneer men beschouwt dat de halfwaardetijd hoofdzakelijk door het Fc wordt bepaald, met als overige factoren de immunogeniteit, de glycosylering en de gevoeligheid voor proteolyse (Lobo *et al*, 2004). Het gePEGylerde Fab certolizumab pegol, laat goed zien, dat koppeling van een polyethyleenglycol

(PE
ver
rela
rec
wij
de i
gro
van
op

Figu

Eer
gev
de i
org
Om
de i
rec
zou
Voc

(PEG) staart van 40 kDa aan een Fab van ca. 50 kDa tot een significante verlenging van de halfwaardetijd leidt (Melmed *et al*, 2008). Anderzijds is de relatief korte halwaardetijd van de gePEGyleerde (30kDa) oplosbare cytokine receptor pegsunercept met een MW inclusief PEG van 42 kDa vermoedelijk te wijten aan renale klaring van dit molecuul (Davis *et al*, 2000). Voor wat betreft de immunogeniteit geldt grosso modo hetzelfde als voor de halfwaardetijd: het grootste verschil is te zien tussen muriene en chimere mAbs. Wel laat het voorbeeld van alemtuzumab goed zien, dat de immuunstatus van de patiënt van invloed is op de immunogeniteit van het Mab (Roskos *et al*, 2004).



Figuur 5. Impressies van infliximab en etanercept. (figuur afgedrukt met toestemming van Anderson, 2005).

Een toepassing, waarin de korte halfwaardetijd van een murien mab (30 uur) juist gewenst is, is die van het radiofarmacon ^{90}Y -ibritumomab tiuxetan (Zevalin[®]), om de radioactiviteit zo kort mogelijk in contact te laten zijn met gezonde weefsels of organen.

Om het aanbod aan anti-rheuma *biopharmaceuticals* te completeren wil ik naast de anti-TNF α -mabs en TNF α -receptoren nog één principe noemen: de anti-IL1-receptor antagonist anakinra (Kineret[®]), hoewel de effectiviteit van anakinra achter zou blijven bij die van de anti-TNF α -strategieën (Nixon *et al*, 2007).

Voor de farmacodynamie is van belang, dat IgG1 en -3 – in tegenstelling tot IgG2

en -4 – *antibody dependent cellular cytotoxicity* (ADCC) en *complement dependent cytotoxicity* (CDC) op kunnen roepen (Deonarain, 2008). Alle Mabs in Tabel 1 met humane Fc zijn van het IgG1-type, met als bewuste uitzondering panitumumab (IgG2), om de toxiciteit jegens gezond weefsel, dat ook de EGFR tot expressie brengt, te beperken. Voor – bijvoorbeeld - rituximab is het essentieel om een IgG1 te zijn met de daarbij behorende cytotoxische effectorfuncties, maar voor panitumumab, waarbij het gaat om het bezetten van de EGFR, niet (Yan *et al*, 2008). In die gevallen, waarbij cytotoxiciteit niet essentieel of zelfs niet gewenst is, kan men in principe ook Fabs ontwikkelen met een PEG-staart in plaats van een Fc. PEG heeft echter enkele nadelen, die hierna beschreven worden.

Gemodificeerde eiwitten: verlengde werking en verminderde immunogeniteit

In de behandeling van chronische ziekten, waarvoor *biopharmaceuticals* vaak worden ingezet, geldt een reductie in doseringsfrequentie van bijvoorbeeld drie keer naar één keer per week als een belangrijke verbetering, zeker als het een parenterale toediening betreft. De drie belangrijkste ontwikkelingen op het gebied van eiwitmodificatie, die alle ten doel hebben om door conjugatie de eliminatie te vertragen en door sterische hindering of afscherming de enzymatische afbraak en immunogeniteit te verminderen, zullen de revue passeren. In de praktijk blijkt, dat die sterische hindering door het conjugaat ook de *in vitro* biologische activiteit van het proteïne vermindert, maar de verlengde circulatietijd compenseert dat ruimschoots (Egrie en Browne, 2001).

De techniek, die momenteel de meeste geregistreerde geneesmiddelen heeft opgeleverd is de koppeling met mPEG, oftewel PEGylering. Uit tabel 2 blijkt dat minder frequent toedienen en een lagere top-dalspiegel variatie worden bereikt door PEGylering van IFN α (Glue, 2000; Harris 2001; Perry 2001; Bukowski 2002).

Tabe

Pro
(Rc
(Pe
(In
(PI
On
Par
Ne
Ne
Mi
Epi
Are

PE
ant
liet
me
een
dar
Cor
van
De
ma
of
nie
onc
pat
Voc
lich
(Gr
6 v
aan

Tabel 2. Overzicht van gePEGyleerde geneesmiddelen en verschillen met niet-gepegyleerde varianten.

Product	Actief	Dosering	Top/dalspiegel ratio	Bijwerkingen
(Roferon-A®)	Interferon- α 2a	3x /wk	>40	
(Pegasys®)	m-PEG-Interferon α 2a	1x /wk	1½	
(Intron A®)	Interferon- α 2b	3x /wk	>40	
(PEG Intron®)	Interferon- α 2b	1x /wk	6	
Oncaspar®	PEG-asparaginase 2000-2500 IU/m ²	1x /2-4wk		(antilichaam-vorming) 5-18%
Paronal®	E.coli-asparaginase 6000 IU/m ²	3x /wk		(antilichaam-vorming) 45-75%
Neulasta®	Pegfilgrastim			(neutropenie, koorts) 9%
Neupogen®	filgrastim			(neutropenie, koorts) 18%
Mircera®	CERA	1 /mnd		
Eprex®	epoëtine- α	1 /wk		
Aranesp®	darbepoëtine- α	1 /2 wkn		

PEG-asparaginase leidt in een aanzienlijk lager percentage patiënten tot antilichamen dan E.coli-asparaginase (Avramis en Panosyan, 2005). Pegfilgrastim liet in een onderzoek (296 borstkankerpatiënten op combinatie-chemotherapie) met een s.c. dosering van 100 μ g/kg 1x per chemocyclus van 21 dagen (!) een significant geringer percentage neutropene patiënten met koorts zien dan filgrastim in een s.c. dosering van 5 μ g/kg/dag (Curran en Goa, 2002). *Continuous Erythropoietin Receptor Activator* (CERA), tenslotte, is een molecuul van 60 kDa bestaand uit PEG gekoppeld aan rh- (geglycosyleerd) epoëtine- α . De eliminatiehalfwaardetijd na i.v. injectie bedraagt 134 uur, wat leidt tot een maximaal doseerinterval van een maand. Dit is langer dan voor epoëtine- α of darbepoëtine- α . Qua effectiviteit in dialysepatiënten is CERA overigens niet effectiever gebleken dan epoëtine- α of darbepoëtine- α , een dose-rangingsonderzoek in kankerpatiënten is voortijdig gestopt aangezien er significant meer patiënten overleden in de CERA-arm (Topf, 2008).

Voorzichtigheid met PEGylering als techniek is geboden, omdat PEG niet lichaamseigen is, en niet biologisch afbreekbaar, met opslag in weefsels tot gevolg (Gregoriadis et al., 2005). Tevens kan antilichaamvorming de kop op steken. In 6 van de 16 (38%) ALL patiënten op Oncaspar® werden anti-PEG antilichamen aangetoond, nauw geassocieerd met een snelle klaring van Oncaspar®. Dat het

vermoedelijk om een reeds bestaande reactie en niet door het middel geïnduceerd ging, blijkt uit eerder onderzoek bij 350 gezonde PEG-naïeve bloeddonoren, waarvan 22-25% anti-PEG-antilichamen bezat (Armstrong *et al*, 2007). Verder bleek uit een onderzoek bij patiënten met chronische hepatitis C, dat interferon- α 2b gekoppeld aan albumine (albuferon) in doseringsregimes van 900-1200 $\mu\text{g}/2\text{wk}$ of 1200 $\mu\text{g}/4\text{wk}$ tot significant minder patiënten met antilichamen leidde, namelijk maximaal 4% op 108 patiënten dan Pegasys[®] 180 μg 1x/wk: 21% op 114 patiënten. (Zeuzem *et al*, 2008). In schril contrast hiermee staat echter het feit, dat geen van de 1789 met CERA behandelde patiënten antilichamen ontwikkelde (Topf, 2008), hetgeen doet vermoeden, dat de glycanen van het epoëtine- α het PEG als antigeen afschermen.

Met uitzondering van de eerder aangestipte immunoreactie, die zich plotseling uitte in erythrocytaire aplasie bij gebruikers van Eprex[®] in 1998 (Sharma, 2007b), is het ontstaan van antilichamen tegen epoëtines een zeldzaamheid (Casadevall, 2002) en tegen darbepoëtine- α nog niet gemeld (Sinclair en Elliott, 2005). Dit wordt toegeschreven aan het feit, dat epoëtines geglycosyleerd zijn, waardoor de antigene epitopen door de glycanen worden afgeschermd. Evenzo is het percentage neutraliserende antilichamen van carcinoïd patiënten, behandeld met het geglycosyleerde humane, leukocytaire interferon 0%, terwijl dat na behandeling met de ongeglycosyleerde proteïnen Intron A[®] en Roferon-A[®] 17, resp. 38% is (Öberg en Alm, 1997).

Het tot nu toe enige geregistreerde geneesmiddel, dat geproduceerd is door (het rh- epoëtine- α) chemisch te hyperglycosyleren oftewel polysialyleren (naar sialzuur, het eindstandige molecuul van een humane glycaan) is darbepoëtine- α (Aranesp[®]). De aminozuursequentie verschilt op 5 posities van die van epoëtine- α om naast de 3 recombinant geproduceerde N-glycanen en ene O-glycaan plaats te maken voor nog 2 chemisch gekoppelde N-glycanen. Deze extra glycanen geven darbepoëtine- α na i.v. toediening in dialysepatiënten een terminale halfwaardetijd van 25 uur en na s.c. circa 50 uur ten opzichte van 8,5 uur voor epoëtine- α i.v. (MacDougall *et al*, 1999; Ibbotson en Goa, 2001; Sinclair en Elliott, 2005). Dit leidt dan ook tot minder frequente dosering voor darbepoëtine- α (Allon *et al*, 2002). Gezien het voordeel, dat een biologisch afbreekbare polysialzuur(PSA-)keten heeft boven een PEG-keten is het niet verwonderlijk, dat er naar meer toepassingen onderzoek wordt gedaan. Zo laten in muizen insuline met een 22 kDa en met een 39 kDa PSA-keten een glucosespiegel zien die enkele uren langer verlaagd blijft ten

opzichte van onbehandelde insuline (Jain *et al*, 2003). Ook zijn er enkele *proof-of-principle* experimenten door dezelfde onderzoekers gedaan met PSA-asparaginase en PSA-IFN α 2b (Gregoriadis *et al*, 2005).

De laatste techniek die hier besproken wordt, het recombinant produceren van een fusie-eiwit waar albumine deel van uitmaakt, heeft al geleid tot een geneesmiddel in klinisch onderzoek: het interferon- α 2b. In doseringsregimes van 900-1200 μ g/2wk of 1200 μ g/4wk leidde het tot dezelfde effectiviteit als Pegasys[®] 180 μ g 1x/wk, maar wel met aanzienlijk minder patiënten met antilichamen (zie eerder; Zeuzem *et al*, 2008). Bij albumine: het fusie-eiwit albumine-insuline zou men in eerste instantie aan insuline detemir denken, dat na toediening immers ook aan albumine bindt. Die binding is echter reversibel, en detemir ontleent zijn vertraagde werking vooral aan zelf-associatie op de injectieplaats met een verdwijnings halfwaardetijd uit het depot van circa 10 uur (Havelund *et al*, 2004). Eénmaal in de bloedbaan is de eliminatie-halfwaardetijd van detemir 7 min, door de reversibele binding aan albumine nog altijd 6x langzamer dan ongemodificeerde insuline (Chapman en Perry, 2004). Van een andere orde van grootte is echter de op grond van muize-experimenten geschatte eliminatie halfwaardetijd van albumine in de mens: circa 50 uur (Duttaroy, 2005).

Conclusies

Het biotechnologische productieproces is complex; een geringe wijziging van één van de stappen kan tot een eindproduct met andere eigenschappen leiden. Overheid en industrie hanteren een zodanig pakket van normen, dat *biopharmaceuticals* vanuit het oogpunt van besmetting door virussen of prionen veilig zijn gebleken. Aangaande *biologicals* is nanofiltratie nog steeds *state of the art*, hetgeen ook blijkt uit reeds op de markt zijnde producten, waaraan nanofiltratie als zuiveringsstap wordt toegevoegd. Het feit, dat men voor panitumumab voor het eerst voor een IgG2 heeft gekozen is interessant. Waarschijnlijk zijn enkele van de eerder ontwikkelde mabs onnodig van het subtype IgG1, dit wil zeggen dat ze voor hun werking niet afhankelijk zijn van ADCC en CDC en dat deze effectorfuncties onder bepaalde omstandigheden misschien wel ongunstig zijn. Van de drie beschreven technieken ter verlenging van de eliminatie-halfwaardetijd en vermindering van de immunogeniteit is PEGylering momenteel het verst in

de kliniek doorgedrongen. Wanneer polysialylering en albuminering op grotere schaal kunnen worden toegepast, zouden deze laatste technieken door hun biologische compatibiliteit wel eens de voorkeur kunnen krijgen.

Referenties

- Allon M, Kleinman K, Walczyk M *et al.*** Pharmacokinetics and pharmacodynamics of darbepoetin alfa and epoetin in patients undergoing dialysis. *Clin Pharmacol Ther* 2002; 72: 546-55.
- Anoniem.** *Pharmaceutical Visions* 2001:35.
- Armstrong JK, Hempel G, Koling S *et al.*** Antibody against poly(ethylene glycol) adversely affects PEG-asparaginase therapy in acute lymphoblastic leukemia patients. *Cancer* 2007; 110: 103-11.
- Avramis VI en Panosyan EH.** Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of asparaginase formulations, the past, the present and recommendations for the future. *Clin Pharmacokinet* 2005; 44: 367-93
- Bertolotto A, Deisenhammer F, Gallo P *et al.*** Immunogenicity of interferon beta: differences among products. *J Neurol* 2004; 251(Suppl.2): II/15-24.
- Bukowski RM, Tandler C, Cutler D *et al.*** Treating cancer with PEG Intron: pharmacokinetic profile and dosing guidelines for an improved interferon-alpha-2b formulation. *Cancer* 2002; 95: 389-96.
- Burnouf T en Radosevich M.** Nanofiltration of plasma-derived biopharmaceutical products. *Haemophilia* 2003; 9: 24-37.
- Casadevall N, Nataf J, Viron B, Kolta A, Kiladjian J-J, Martin-Dupont Ph, *et al.*** Pure red-cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin. *N Engl J Med* 2002; 346: 469-75.
- Chapman TM en Perry CM.** Insulin detemir: a review of its use in the management of type 1 and 2 diabetes mellitus. *Drugs* 2004; 64: 2577-95.
- Crommelin DJA, Storm G, Verrijk R, Leede de L, Jiskoot W, Hennink WE.** Shifting paradigms: biopharmaceuticals versus low molecular weight drugs. *Int J Pharm* 2003; 266: 3-16.
- Curran MP en Goa KL.** Pegfilgrastim. *Drugs* 2002; 62: 1207-13.
- Davis MW, Feige U, Bendele AM *et al.*** Treatment of rheumatoid arthritis with PEGylated recombinant human soluble tumour necrosis factor receptor type I: a

clinical update. *Ann Rheum Dis* 2000; 59(suppl I): i41-3.

Deonarain MP. Recombinant antibodies for cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2008; 8: 1123-41.

Dore RK, Mathews S, Schechtman J et al. The immunogenicity, safety, and efficacy of etanercept liquid administered once weekly in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2007; 25: 40-6.

Duttaroy A, Kanakaraj P, Osborn BL et al. Development of a long-acting insulin analog using albumin fusion technology. *Diabetes* 2005; 54: 251-8.

Egrie JC en Browne JK. Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). *Br J Cancer* 2001; 84(Suppl.1): 3-10.

Glue P, Fang JW, Rouzier-Panis R et al. Pegylated interferon-alpha2b: pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and preliminary efficacy data. Hepatitis C Intervention Therapy Group. *Clin Pharmacol Ther* 2000; 68: 556-67.

Gregoriadis G, Jain S, Papaioannou I et al. Improving the therapeutic efficacy of peptides and proteins: A role for polysialic acids. *Int J Pharm* 2005; 300: 125-30.

Haggerty HG, Abbott MA, Reilly TP et al. *J Rheumatol* 2007; 34: 2365-73.

Harris JM, Martin NE, Modi M. Pegylation: a novel process for modifying pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet* 2001; 40: 539-51.

Havelund S, Plum A, Ribel U et al. The mechanism of protraction of insulin detemir, a long-acting, acylated analog of human insulin. *Pharm Res* 2004; 21: 1498-504.

Hermeling S, Schellekens H, Crommelin DJA, Jiskoot W. Micelle-associated protein in epoetin formulations: a risk factor for immunogenicity? *Pharm Res* 2003; 20: 1903-7.

Hermeling S, Crommelin DJA, Schellekens H, Jiskoot W. Structure-immunogenicity relationship of therapeutic proteins. *Pharm Res* 2004; 21: 897-903.

Hochuli E. Interferon Immunogenicity: Technical Evaluation of Interferon- α 2a. *J Int Cytokine Res* 1997; 17(Suppl.1): S15-21.

Ibbotson T en Goa KL. Darbepoetin Alfa. *Drugs* 2001; 61: 2097-104.

Jain S, Hreczuk-Hirst DH, McCormack B et al. Polysialylated insulin: synthesis, characterization and biological activity in vivo. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1622: 42-9.

Jakobovits A, Amado RG, Yang X et al. From XenoMouse technology to panitumumab, the first fully human antibody product from transgenic mice. *Nat*

Biotech 2007; 25: 1134-43.

Jefferis R. Antibody therapeutics: isotype and glycoform selection. *Expert Opin Biol Ther* 2007; 7: 1401-13.

Lobo ED, Hansen RJ en Balthasar JP. Antibody Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *J Pharm Sci* 2004; 93: 2645-68.

MacDougall IC, Gray SJ, Elston O et al. Pharmacokinetics of Novel Erythropoiesis Stimulating Protein Compared with Epoetin Alfa in Dialysis Patients. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 2392-5.

Maerz H, Hahn SO, Maassen A et al. Improved removal of viruslike particles from purified monoclonal antibody IgM preparation via virus filtration. *Nat Biotech* 1996; 14: 651-2.

Melmed GY, Targan SR, Yasothan U et al. Certolizumab pegol. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7: 641-2.

Minor PD. Ensuring safety and consistency in cell culture production processes: viral screening and inactivation. *Trends Biotechnol* 1994; 12: 257-61.

Nixon R, Bansback N en Brennan A. The efficacy of inhibiting tumour necrosis factor α and interleukin 1 in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis and adjusted indirect comparisons. *Rheumatology* 2007; 46: 1140-7.

Öberg K en Alm G. The Incidence and Clinical Significance of Antibodies to Interferon- α in Patients with Solid Tumors. *Biotherapy* 1997; 10: 1-5.

Perry CM, Jarvis B. Peginterferon-alpha-2a (40 kD): a review of its use in the management of chronic hepatitis C. *Drugs* 2001; 61: 2263-88.

Poelsler G, Berting A, Kindermann J et al. A new liquid intravenous immunoglobulin with three dedicated virus reduction steps: virus and prion reduction capacity. *Vox Sang* 2008; 94: 184-92.

Roach P. New insulin analogues and routes of delivery. *Clin Pharmacokinet* 2008; 47: 595-610.

Roddie PH en Ludlam CA. Recombinant coagulation factors. *Blood Rev* 1997; 11: 169-77.

Roskos LK, Davis CG en Schwab GM. The clinical pharmacology of therapeutic monoclonal antibodies. *Drug Dev Res* 2004; 61: 108-20.

Ryff J-Ch. Clinical Investigation of the Immunogenicity of Interferon- α 2a. *J Int Cytokine Res* 1997; 17(Suppl.1): S29-33.

Schrör K en Weber A-A. Comparative Pharmacology of GP IIb/IIIa Antagonists. *J Thromb Thrombolys* 2003; 15: 71-80.

Sha
ma
Sha
clo
Sin
pro
Söl
Jen
bet
91.
Ter
of t
200
Ter
filt
Ter
Bio
To
Pha
Wa
200
Wa
185
Yar
200
Yue
stru
pro
Ha
Zet
or f
Hej

- Sharma B.** Immunogenicity of therapeutic proteins. Part 3: Impact of manufacturing changes. *Biotechnol Adv* 2007a; 25: 325-31.
- Sharma B.** Immunogenicity of therapeutic proteins. Part 2: Impact of container closures. *Biotechnol Adv* 2007b; 25: 319-24.
- Sinclair AM en Elliott S.** Glycoengineering: The effect of glycosylation on the properties of therapeutic proteins. *J Pharm Sci* 2005; 94: 1626-35.
- Sölberg Sørensen P, Ross Ch, Clemmesen KM, Bendtzen K, Frederiksen JL, Jensen K, et al.** Clinical importance of neutralising antibodies against interferon beta in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Lancet* 2003; 362: 1184-91.
- Ternant D en Paintaud G.** Pharmacokinetics and concentration-effect relationships of therapeutic monoclonal antibodies and fusion proteins. *Expert Opin Biol Ther* 2005; 5(Suppl.1): S37-47.
- Terpstra FG, Parkkinen J, Tölö H et al.** Viral safety of Nanogam[®], a new 15 nm-filtered liquid immunoglobulin product. *Vox Sang* 2006; 90: 21-32.
- Terpstra FG, Kleijn M, Koenderman AHL et al.** Viral safety of C1-inhibitor NF. *Biologicals* 2007; 35: 173-81.
- Topf JM.** CERA: third-generation erythropoiesis-stimulating agent. *Expert Opin Pharmacother* 2008; 9: 839-49.
- Wafelman AR.** Kwaliteitsaspecten van biofarmaca in de praktijk. *Pharm Weekbl* 2001; 136: 228-34.
- Walsh G.** Second-generation biopharmaceuticals. *Eur J Pharm Biopharm* 2004; 58: 185-96.
- Yan L, Hsu K en Beckman RA.** Antibody-based therapy for solid tumours. *Cancer J* 2008; 14: 178-83.
- Yuen C-T, Storrington PL, Tiplady RJ et al.** Relationships between the N-glycan structures and biological activities of recombinant human erythropoietins produced using different culture conditions and purification procedures. *Br J Haematol* 2003; 121: 511-26.
- Zeuzem S, Yoshida EM, Benhamou Y et al.** Albinterferon alfa-2b dosed every two or four weeks in interferon-naïve patients with genotype 1 chronic hepatitis C. *Hepatology* 2008; 48: 407-17.

PROF. DR H SCHELLEKENS



Huub Schellekens is arts-medisch microbioloog met bijzondere interesse voor toepassingen van genetische modificatie in de geneeskunde, en voor de productie en preklinische ontwikkeling van therapeutische eiwitten. Hij studeerde geneeskunde aan de Erasmus Universiteit in Rotterdam. Na zijn artsexamen in 1973 bekleedde hij verschillende functies bij de Erasmus Universiteit. Onderwijl behaalde hij zijn aantekening als arts-medisch microbioloog in 1980. In datzelfde jaar voltooide hij zijn promotie-onderzoek met interferon als onderwerp. Tot 1990 vervulde hij verschillende functies bij TNO in Rijswijk, inclusief die van viroloog en van afdelingshoofd. Hij was van 1990 tot 1997 in dienst van de SSDZ in Delft als medisch microbioloog. Sinds 1997 is Schellekens werkzaam bij de Rijksuniversiteit van Utrecht, wederom in verschillende functies, zoals hoogleraar in de medische biotechnologie en in de farmaceutische biotechnologie. Vanwege zijn brede expertise heeft Schellekens een aanzienlijk aantal nevenfuncties. Hij is lid van het College ter Beoordeling van Geneesmiddelen, en lid van een aantal internationale organisaties op het gebied van onderzoek naar en toepassing van biotechnologische producten, inclusief therapeutische eiwitten zoals cytokines. Hij publiceerde meer dan 250 wetenschappelijke artikelen; de laatste jaren voornamelijk met als thema therapeutische eiwitten, hun immunogeniciteit, en biosimilars. Schellekens is ook columnist bij het Financieel Dagblad.

VAN PATHOFYSIOLOGIE NAAR THERAPIE MET..... EIWITTEN

H Schellekens

Inleiding

Meer dan 25 jaar geleden, in 1982, werd humaan insuline als het eerste recombinant-DNA therapeutisch eiwit in Nederland geïntroduceerd. Sindsdien zijn meer dan 200 verschillende eiwitten als geneesmiddel geregistreerd en op de markt gebracht, waardoor deze klasse van producten een stevige positie heeft verworven. Veel van deze middelen hebben een grote therapeutische waarde en zijn of levensreddend, of ze verhogen de kwaliteit van het leven in zeer belangrijke mate. Bekende voorbeelden van deze producten zijn groeihormoon, beta- en alfa-interferonen, erythropoëetine en G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*). In de afgelopen 25 jaar zijn grote vorderingen geboekt met de technieken voor productie en zuivering van deze complexe en instabiele moleculen. Tevens is veel ervaring opgedaan met het veilig en effectief gebruik van deze moleculen bij patiënten. De pioniersfase met de eerste generatie van therapeutische eiwitten en de bijbehorende leercurve loopt ten einde, nu de octrooien van deze producten zijn afgelopen of in de nabije toekomst af zullen lopen. Zoals ook het geval was bij de klein-moleculaire, klassieke geneesmiddelen leidt het verlopen van octrooien tot innovatie. De bedrijven die het oorspronkelijke product hebben ontwikkeld, komen met verbeterde versies van het molecuul, in het bijzonder met moleculen die door pegylering of hyperglycosylering een verlengde eliminatie-halfwaardetijd hebben, zoals PEG-Intron, Pegasys and darbepoëetine alfa. Een andere consequentie van het aflopen van octrooien is de ontwikkeling en marktintroductie van kopieën van het innovatorproduct. In het geval van klassieke farmaca is registratie mogelijk wanneer het actieve bestanddeel chemisch identiek is aan dat in het merkgeneesmiddel, en wanneer de beide producten bioequivalent zijn in termen van vergelijkbare farmacokinetiek. Vanwege de geringe ontwikkel- en marketingkosten zijn generica stukken goedkoper dan merkgeneesmiddelen. Vandaar dat zorgverzekeraars en overheden in veel landen het voorschrijven van generica stimuleren. Echter, bij therapeutische eiwitten is de situatie anders dan bij klassieke, klein-moleculaire farmaca. Het verlopen van octrooien op therapeutische eiwitten leidt nu tot de introductie van de tweede generatie producten en van 'biosimilars', of wel 'bijna-kopieën' van de eiwitten van de eerste generatie.

Eerste en tweede generatie van therapeutische eiwitten

Bij de ontwikkeling van de eerste generatie van therapeutische eiwitten bleek een aantal problemen op te treden. Sommige van die problemen waren te verwachten en hebben te maken met het feit dat het natuurlijke gedrag van de eiwitten in het lichaam niet overeenkomt met het gewenste gedrag, zoals de farmacokinetiek. Sommige van de problemen kwamen onverwacht en pasten niet bij het beeld van een lichaamseigen eiwit, zoals de toxiciteit en immunogeniciteit.

De eerste generatie biofarmaceutica geproduceerd met recombinant DNA-technologie bestond uit nagenoeg exacte kopieën van natuurlijk voorkomende eiwitten met een regulerende functie in het lichaam. Eiwitten met een fysiologische functie werden verondersteld nauwelijks of geen bijwerkingen te hebben. Echter, in de praktijk bleken sommige lichaamseigen stoffen extreem toxisch zoals *tumor necrosis factor* (TNF), interleukine-10 en interleukine-2 (IL-2). In sommige gevallen bleek de behandeling fatale gevolgen te hebben voor de patiënt. Voor interleukine-10 en TNF betekende de toxiciteit dat pogingen om de producten op de markt te krijgen werden gestaakt. De meest gehoorde verklaring over de bijwerkingen van deze in principe fysiologische stoffen is dat behandeling leidt tot te grote hoeveelheden op de verkeerde plaats in het lichaam en op het verkeerde tijdstip.

Een aantal biofarmaceutica induceert in patiënten de vorming van antistoffen. Voor sommige producten lag dat voor de hand, zoals voor de eerste generatie monoklonale antistoffen, die van muizen oorsprong waren en daarom door de mens als vreemd eiwit worden gezien. Voor andere producten, zoals IL-2 en interferon alfa-2 die werden beschouwd als kopieën van lichaamseigen stoffen, was deze antistofvorming onverwacht. De immunogeniciteit van dit soort producten berust op de doorbreking van B-cel tolerantie. Daarbij spelen aggregaten een belangrijke rol (zie bijdrage Jiskoot in deze uitgave). Een voorbeeld van de ernstige gevolgen van antistofvorming tegen een biofarmaceutisch product is de aplastische anemie (*acquired pure red cell aplasia*, PRCA) verbonden aan het gebruik van epoetin alfa (Eprex®). De antistoffen geïnduceerd bij chronisch nierfalen na subcutane toediening van epoetin alfa neutraliseren ook het endogene erythropoietine bij de patiënt, waardoor een ernstige vorm van anemie ontstaat. De precieze oorzaak van de immunogeniciteit van epoetine alpha is omstrede, en valt samen met de vervanging van humaan serum albumine in het product met polysorbaat 80 in

1998. Wellicht speelt ook de subcutane toedieningsroute van epoetine alfa een rol in de immunogeniciteit van het product.

Er is een aantal mogelijkheden om de eigenschappen van eiwitten te modificeren, zoals veranderingen in de aminozuurvolgorde, covalente koppeling van het eiwit aan een lange keten (PEGylering, hyperglycosylering, koppeling aan albumine) en de constructie van hybride moleculen. Een aantal van dit soort tweede generatie eiwitten is thans in ontwikkeling of op de markt, vooral met modificaties die tot doel hebben om de halfwaardetijd te verlengen.

De ontwikkeling van biosimilars

Het probleem rond de PCRA en Eprex heeft grote invloed gehad op de discussie rond de richtlijnen die gelden voor de toelating van biosimilars, de kopie-producten die op de markt mogen worden gebracht als de octrooien van therapeutische eiwitten aflopen.

Om verschillende redenen is de conventionele benadering van generica, gebaseerd op chemische identiteit en bioequivalentie, niet van toepassing op therapeutische eiwitten. Eiwitten zijn grote, complexe moleculen en het huidige arsenaal aan analytische technieken schiet te kort voor een volledige karakterisering van alle relevante eigenschappen van het product. Eiwitten zijn heterogeen door variatie in de mate van glycosylering en in het enzymatisch afsplitsen van stukjes van de eiwitketen (*protein clipping*) in de gastcellen waarin het eiwit wordt geproduceerd. Na biologische synthese kunnen modificaties in het eiwit optreden tijdens het opzuiveren, formuleren en verpakken van het eindproduct, en tijdens opslag. Tevens zijn de productie en de daaropvolgende stappen momenten waarop onzuiverheden in het product kunnen optreden. Deze onzuiverheden kunnen verwant zijn aan of afkomstig zijn van het actieve eiwit, maar kunnen ook afkomstig zijn van de gastcellen en van de materialen die gebruikt worden tijdens productie en vervolgstappen. Voorbeelden van de laatste zijn de harsen en monoclonale antilichamen die gebruikt worden bij affiniteits-chromatografie. Onzuiverheden en verontreinigingen kunnen de biologische eigenschappen, inclusief werkzaamheid en veiligheid in de patiënt, beïnvloeden. Om deze reden dienen alle processtappen in productie en opzuivering minutieus met gebruik van standaarden gevolgd te worden. Dit is een dynamisch proces: voor veel therapeutische eiwitten, in het bijzonder de eerste producten waarvan het octrooi

verloopt, is het productieproces over de jaren doorlopend verbeterd, waardoor het huidige product aanmerkelijk verschilt van het product dat oorspronkelijk op de markt werd geïntroduceerd.

gea
bio
pat

'Comparability'

Reg

De biologische eigenschappen van een therapeutisch eiwit vloeien voort uit de primaire eigenschappen, zoals de aminozuurvolgorde en de drie-dimensionale structuur, maar ook uit de omstandigheden waaronder het eiwit is geproduceerd, gezuiverd, geformuleerd, verpakt en bewaard. Registratie-autoriteiten verlangen van de producent dat deze het productieproces begrijpt en onder controle heeft, en dat het eiwit zodanig reproduceerbaar gefabriceerd kan worden dat het na uitgebreide en precieze karakterisatie aan alle productspecificaties voldoet.

De
the
ter
mec
'bic
en i
inn

Wijziging van het productieproces op enig moment tijdens het 'leven' van een product met een therapeutisch eiwit is vrijwel onvermijdelijk. In dat geval is de producent het aan zichzelf, aan de patiënt en aan de autoriteiten verplicht om aan te tonen dat het product van het nieuwe proces vergelijkbaar ('comparable') is met het product uit het oorspronkelijke proces. Dit dient te worden aangetoond in 'comparability studies' die het nieuwe product naast het oude product karakteriseren met 'state-of-the-art' analyses, inclusief stabiliteitsstudies. Daarnaast kan het noodzakelijk zijn om niet-klinische en klinische studies uit te voeren om de farmacokinetische, -dynamische en immunologische eigenschappen van het nieuwe product met het oude product te vergelijken, inclusief veiligheid en werkzaamheid bij patiënten.

bet
die
om
nie
ana
sur
Tot
reg
bio
200
De

Uit het bovenstaande moge blijken dat een bedrijf dat een kopie wil ontwikkelen van een therapeutisch eiwit waarvan de patentbescherming verloopt, een flink aantal uitdagingen voor zich ziet. Van het oorspronkelijke product zullen weinig of geen belangrijke details omtrent het productieproces en de analytische methoden in het publieke domein beschikbaar zijn, aangezien deze belangrijke informatie tot het intellectueel eigendom van de oorspronkelijke producent behoort. Met uitzondering van enkele eenvoudige eiwitten zoals calcitonine is het voor een concurrent niet mogelijk om op grond van informatie in patenten of monografieën of van gepubliceerde fysisch-chemische eigenschappen te claimen dat de kopie vergelijkbaar is met het eiwit van de innovator. Bovendien zijn zelfs de meest

con
die
inn
pro

Voc
aan
Voc
uitg
inn

geavanceerde analytische technieken en instrumenten niet geschikt om de biologische eigenschappen van een eiwit, inclusief veiligheid en werkzaamheid bij patiënten, in hun volle breedte te voorspellen.

Registratie van biosimilars

Deze overwegingen impliceren dat de generieke benadering niet toepasbaar is op therapeutische eiwitten, en dat een term als 'biogenerica' misleidend is. De officiële terminologie voor een kopie van een therapeutisch eiwit is '*similar biological medicinal product*' in de EU, en '*follow-on biologic*' in de USA. De omschrijving 'biosimilar' is nu de voorkeusterminologie in de wetenschappelijke literatuur en in discussies en publicaties op het terrein van registratiezaken. Tevens groeien innovatieve en biosimilar industrie en registratie-autoriteiten naar consensus wat betreft de inhoud van het registratiedossier voor biosimilars. Het registratiepakket dient niet alleen een volledig kwaliteitsdossier en niet-klinisch veiligheidsdossier te omvatten, maar ook klinische gegevens van het biosimilar product. Zoals voor alle nieuwe producten moet het registratiedossier van een biosimilar een 'risk/benefit' analyse en een risico-minimalisatieplan omvatten, inclusief een 'post-marketing surveillance' plan met nadruk op immunogeniciteit.

Tot nu toe is de 'European Medicine Evaluation Agency' (EMA) de enige registratie-autoriteit die richtlijnen heeft uit doen gaan voor de registratie van biosimilars. Deze richtlijnen zijn gebaseerd op de EU wetgeving die in november 2005 van kracht werd, en die onderscheid maakt tussen generica en biosimilars. De *Committee for Medicinal Products for Human Use* (CHMP), de wetenschappelijke commissie van de EMA, heeft een aantal richtlijnen gepubliceerd voor de data die voor registratie overlegd moeten worden. Biosimilars worden, net zoals innovatieve biotechnologische producten, in Europa beoordeeld via de centrale procedure bij de EMA, en niet door de nationale Europese overheden.

Voor beoordeling en registratie via de EMA komen uitsluitend biosimilars in aanmerking waarvoor het product van de innovator in de EU geregistreerd is. Voor goedkering in de EU moet voor het biosimilar product een vergelijkbaar uitgebreid pakket aan kwaliteits- en veiligheidsdata ingediend worden als voor het innovatorproduct. Bovendien moet het dossier aantonen dat het biosimilar product

‘vergelijkbaar’ is met het innovatorproduct in termen van kwaliteit, veiligheid en werkzaamheid. Deze laatste eis is een lastige, omdat de niet-geformuleerde grondstof van het innovatieve product niet beschikbaar is voor de fabrikant van het biosimilar product. Deze laatste kan alleen gebruik maken van het geformuleerde, commercieel verkrijgbare materiaal. Om sommige analytische technieken toe te kunnen passen is het daarom nodig om het eiwit uit de eindformulering te isoleren. Door deze isolatie kunnen eiwitmodificaties optreden die de vergelijking van biosimilar eiwit met innovatoreiwit belemmeren. Dit laatste wordt dan weer ondervangen door beide eiwitten uit dezelfde formulering te isoleren, opdat voor mogelijke eiwitmodificaties wordt gecorrigeerd.

Wat betreft de registratie van biosimilars in de EU zijn het geen stille tijden, en is er sprake van successen en van tegenslag . Er zijn inmiddels twee biosimilar groeihormoonpreparaten toegelaten, namelijk Omnitrop® en Valtropin®. Er zijn twee biosimilar erythropoietines toegelaten, te weten Epoetin alfa Hexal® en Abseamed®. Recent heeft Tevagrastrim® als eerste biosimilar G-CSF product een positieve CHMP-opinie gekregen. Het biosimilar interferon alfa-2a Alpheon® kreeg een negatieve CHMP-opinie, en de aanvragen van drie biosimilar insulines werd teruggetrokken.

De kosten van biosimilars

Het bovenstaande zal de lezer duidelijk maken dat de interessante situatie zich voordoet dat de producent van het biosimilar product aanzienlijk grotere fysisch-chemische en analytische uitdagingen heeft dan de toenmalige innovator. Vanwege de grote investeringen die de biosimilar producent moet doen voor ontwikkeling en productie, is een grote prijsdaling na de marktintroductie van een biosimilar niet waarschijnlijk. In tegenstelling tot de klassieke situatie van de klein-moleculaire generica, zal de markt van therapeutische eiwitten niet alleen op prijs bevochten worden. De producenten van biosimilars zullen de toegevoegde waarde van hun product moeten aantonen, bijvoorbeeld in termen van gebruiksgemak voor de patiënt, verbeterde verdraagbaarheid of veiligheid, of verbeterde werkzaamheid. Dit geldt in het bijzonder voor de Europese, Noord-Amerikaanse, Canadese, Australische en Japanse markten.

Er zijn grote delen van de wereld waar de hoge kosten van therapeutische eiwitten

de t
dez
vaa
is b
onc
voc
Dit
ver

Tot

De
the
the
kar
een
dat
inn
kla:
bio
ont
Inn
ver

Ref

Ha:
Ga:
Ho
(PR
146
Sch
200

de toepassing bij verreweg de meeste patiënten onmogelijk maken. In veel van deze landen zijn reeds lokaal geproduceerde eiwitproducten beschikbaar. Echter, vaak ontbreekt deskundig regulatorisch toezicht, en een aantal van deze producten is behept met kwaliteitsproblemen. De World Health Organisation (WHO) onderzoekt de mogelijkheid om voor deze landen een systeem te ontwikkelen voor de productie, registratie en het veilig gebruik van therapeutische eiwitten. Dit WHO systeem zal uiteraard de balans moeten vinden tussen veilig en verantwoord gebruik enerzijds en productprijs anderzijds.

Tot slot

De kennis die inmiddels is opgedaan met epoetin alfa en met andere therapeutische eiwitten leert ons dat de biologische en klinische activiteit van therapeutische eiwitten moeilijk te voorspellen is op basis van fysisch-chemische karakterisering en *in vitro* testen. De wereld van de therapeutische eiwitten is een andere dan die van de klein-moleculaire farmaca, met als bijzonderheid dat de biosimilar producent een moeilijker kwaliteitspad te gaan heeft dan de innovator. Voor de toelating van biosimilars is in tegenstelling tot generica van klassieke geneesmiddelen klinisch onderzoek noodzakelijk. Om de veiligheid van biosimilars goed te beschrijven, te begrijpen en te volgen is niet alleen een klinisch ontwikkelingsprogramma nodig, maar tevens onderzoek na toelating op de markt. Inmiddels zijn in Europa de eerste biosimilars geregistreerd en commercieel verkrijgbaar.

Referenties

Hanauer SB. The ethics of phase I trials of biologic agents. *Nature Clin Practice Gastroenterol Hepatol* 2008; 5: 533.

Howman R en Kulkarni H. Antibody-mediated acquired pure red cell aplasia (PRCA) after treatment with darbepoetin. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22: 1462-1464.

Schellekens H. Immunogenicity of therapeutic proteins. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 1257-1259.

Schellekens H. How similar do 'biosimilars' need to be? *Nat Biotechnol* 2004; 22: 1357-1359.

Schellekens H. Biosimilar epoetins: how similar are they? *Eur J Hosp Pharm* 2004; 3: 349-360.

Schellekens H. Follow-on biologics: challenges of the "next generation". *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20: iv31-36.

Wiecek A en Mikhail A. European regulatory guidelines for biosimilars. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: v17-20.



DR C DE BOER



Carla de Boer (1967) studeerde in 1991 af in de Medische Biologie aan de Universiteit van Amsterdam. Zij promoveerde in 1996 op de dissertatie '*Cyclin D1 in B-cell Neoplasia*', gevolgd door het postdoc project '*Cell adhesion molecules in epithelial structures, role of EpCam*', beide op de afdeling Pathologie van het LUMC.

Na 10 jaar wetenschappelijk onderzoek, verruilde zij de universiteit voor de farmaceutische industrie en werkte zij ruim een jaar als

Clinical Research Associate bij Knoll BV.

Sinds 2001 is zij werkzaam bij Centocor BV in Leiden. Centocor BV (onderdeel van Johnson & Johnson) is een biotechnologisch bedrijf, gespecialiseerd in de ontwikkeling en marketing van monoklonale antilichamen bestemd voor immunologische, cardiovasculaire en oncologische indicaties.

Carla startte bij Centocor als studie manager op de Clinical Trials Management-afdeling en werkte onder andere aan fase 1-3 studies in reumatologie en oncologie. In 2004 stapte zij over naar de Clinical R&D Hematology/Oncology-afdeling waar zij sindsdien werkzaam is als Clinical Project Scientist. In die hoedanigheid is zij nauw betrokken bij de ontwikkeling van oncologische producten, geeft zij input ten aanzien van Europese zaken op klinische studies en staat zij in nauw contact met onderzoekers wereldwijd voor de uitvoering van klinische studies.

VAN PATHOFYSIOLOGIE NAAR THERAPIE MET BIJZONDERE EIWITTEN.....ANTILICHAMEN

C de Boer

Introductie

Voor de behandeling van ziektes en aandoeningen zijn we niet meer gebonden aan chemisch geproduceerde middelen, ook wel *small molecules* genoemd, die in de regel een moleculair gewicht van 300-700 Dalton hebben. Er zijn tegenwoordig meer en meer mogelijkheden voor het gebruik van biologische middelen, zoals eiwitten of antilichamen. Antilichamen (*antibody*: Ab) spelen een grote rol in de behandeling van diverse ziektebeelden zoals infectieuze ziekten, allergieën, auto-immuunziekten, ontstekingsziekten en kanker.

Door de jaren heen zijn er steeds meer antilichamen ontwikkeld – ongeveer een verdrievoudiging sinds de 80-er jaren: van 4.3 Ab / jaar in de tachtiger jaren, 8.3 Ab / jaar in de jaren negentig tot 13.3 Ab / jaar in de periode 2000-2005. Dit komt doordat het ontwikkelingsproces van antilichamen is verbeterd, in het bijzonder door het vinden van het juiste doelwit waartegen een antilichaam gericht moet zijn, door verbeterde ontwikkeltechnieken, en doordat productie op grote schaal mogelijk is waardoor therapeutische toepassing in grote hoeveelheden tot de mogelijkheden behoort.

Voor therapeutische toepassing in de mens zijn er momenteel 22 antilichamen voor de Amerikaanse markt goedgekeurd door de FDA en 17 voor de Europese markt door de EMEA. De inschatting is dat ongeveer 20% van de biofarmaceutica die in ontwikkeling zijn zullen bestaan uit antilichamen en afgeleiden daarvan. Men voorspelt dat de wereldwijde markt voor antilichamen ongeveer \$17 miljard zal zijn in 2008. Tevens lopen er op dit moment meer dan 1000 klinische studies met zo'n 200 verschillende antilichamen in diverse indicaties (oncologie, chronische inflammatoire ziekten, transplantatie, infectieuze ziekten en cardiovasculaire ziekten), als monotherapie of in vergelijking met of in combinatie met geregistreerde middelen (Brekke en Sanddlie, 2003; Alkan, 2004; Carter, 2006; Schrama *et al*, 2006; Reichert *et al*, 2007).

Alles bij elkaar genomen zijn de antilichamen in opmars voor de dagelijkse behandeling van ziektes en aandoeningen. Maar wat zijn antilichamen?

Hoe worden ze geproduceerd, waarvoor worden ze gebruikt, wat zijn hun neveneffecten? In dit hoofdstuk komt een aantal van deze aspecten aan bod, met verwijzing naar een aantal uitstekende overzichtsartikelen die in detail op de zaken ingaan.

Wat zijn antilichamen?

Antilichamen, of ook wel antistoffen genoemd, behoren tot de immunoglobulines (afgekort Ig). Het zijn eiwitten die door de mens en andere gewervelde dieren worden geproduceerd als antwoord op het binnendringen in het lichaam van een lichaamsvreemde stof of lichaamsvreemde cellen. De binnendringende deeltjes, die door het lichaam als gevaarlijk worden beschouwd, heten antigenen (afgekort Ag). Een antigeen is een molecuul dat in staat is een reactie van het afweersysteem op te wekken, waarbij antilichamen worden aangemaakt. Het woord antigeen komt van het engelse woord 'antigen' - *antibody generating*. Virussen of bacteriën worden herkend als lichaamsvreemd, waarna een afweerreactie op gang komt en de infectie bestreden kan worden. Als het binnendringende molecuul geen kwaad kan, is een afweerreactie ongewenst. Dit is bijvoorbeeld het geval bij allergische reacties, waarbij de afweerreactie soms zelfs dodelijk kan zijn (zoals bij een wespensteek). Ook bij orgaantransplantaties en bloedtransfusies kunnen de antigenen op het orgaan of op de rode bloedcellen zorgen voor een afweerreactie, waarna vaak een levensgevaarlijke afstoting of afbraak ontstaat.

Bij een auto-immuunziekte kan het lichaam ook afweerreacties geven tegen lichaamseigen antigenen. Cellen in het lichaam bevatten op de buitenkant van hun membraan een groot aantal eiwitten die als antigenen kunnen fungeren, zoals de bloedgroep-antigenen, signaaltransductie-receptoren en cel-adhesiemoleculen. Deze antigenen zijn er de oorzaak van dat transplantaties niet tussen iedere donor en ontvanger mogelijk zijn. Wanneer dan geen bijzondere voorzorgsmaatregelen getroffen worden, zal een nieuwe cel afkomstig van een donor vrijwel altijd als lichaamsvreemd worden herkend.

Antilichamen worden gemaakt door B-cellen. Elke B-cel kan maar één soort antilichaam maken. B-cellen zijn lymfocyten die een belangrijke rol spelen in het humorale immuunsysteem – het systeem van antilichaamproductie voor afweer. De afkorting 'B' staat oorspronkelijk voor de 'Bursa van Fabricius', een orgaan dat alleen in de dikke darm van vogels voorkomt en waarin B-cellen uitrijpen. Bij alle andere gewervelden worden B-cellen in het beenmerg geproduceerd. Het menselijk lichaam produceert talloze verschillende types B-cellen; ze zijn uiterlijk gelijk, maar elk type heeft een uniek receptoreiwit op het membraan dat maar aan

één
doc
pro
Er :
het
•
•
Het
ant
Eer
var
en t
doc
zov
en c
en c
gro
ver
dete
ant
bin

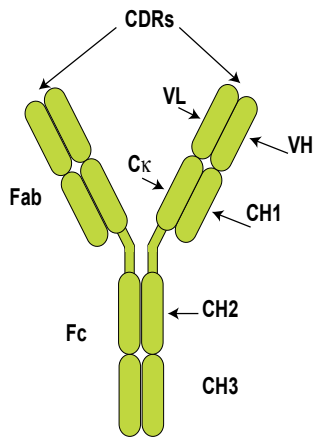
één specifiek antigeen bindt. Normaal gesproken circuleren er miljoenen B-cellen door de bloedsomloop en het lymfestelsel van het menselijk lichaam, maar ze produceren niet altijd antilichamen.

Er zijn van iedere specifieke cellijn (welke bestaat uit alle B-cellen die voor hetzelfde antilichaam coderen) twee soorten B-cellen:

- *plasmacellen* zijn getransformeerde B-cellen die actief antilichamen aanmaken waar ze voor geprogrammeerd zijn en die meehelpten bij de vernietiging van antigenen door zich aan hen te binden opdat ze een makkelijker doelwit vormen voor fagocyten;
- *geheugen-B-cellen* worden tijdens de primaire immuunrespons geproduceerd en blijven daarna zeer lange tijd in rustende toestand in leven, opdat ze snel kunnen reageren door zich te vermenigvuldigen en zich te transformeren tot plasmacellen bij een tweede blootstelling aan hetzelfde antigeen.

Het bloed van een volwassene bevat per milliliter gemiddeld 16 milligram antilichamen.

Een antilichaam is een heterodimeer (bestaande uit twee verschillende structuren) van ongeveer 150 kDa, is Y-vormig en bestaat uit twee identieke zware (≈ 50 kDa) en twee identieke lichte (≈ 25 kDa) aminozuurketens die samengehouden worden door covalente (zwavelbruggen) en niet-covalente bindingen (zie figuur 1). Bij zowel de zware als de lichte ketens is er een onveranderlijk (constant, C) deel, en een veranderlijk (variabel, V) deel. Het constante deel staat voor de stabiliteit en de interactie met lichaamseigen receptoren op (immuun)cellen en vertoont grote homologie tussen de diverse antilichamen, met maar een paar aminozuren verschil. Het variabele deel van de zware en lichte ketens, ook wel *complementarity determining region* (CDR1, -2, -3) of hypervariabel deel genoemd, is uniek voor elk antilichaam en varieert in aminozuurcompositie. Het is de specifieke antigeen-bindingsplaats van een antilichaam.



Figuur 1. Basisstructuur van een antilichaam; voor uitleg, zie de tekst. CDRs (complementarity determining regions) is het hoog-variabel gebied dat de specificiteit van de binding aan individuele antigenen bepaalt.

Door middel van enzymen kan een antilichaam in drie verschillende delen worden gesplitst: twee Fab-fragmenten (dit zijn de antigeenbindende delen) en een Fc-deel (het *crystalline* gedeelte). De Fab-fragmenten bestaan uit de lichte en een deel van de zware keten. Het Fc-deel bestaat uit een deel van beide zware ketens. Door middel van pepsine-enzymbehandeling kan een antilichaam net onder de 'V' geknipt worden waardoor er een F(ab')₂-fragment ontstaat en het Fc-gedeelte wordt opgedeeld in kleinere stukken. Door middel van papaïne-enzymbehandeling kan een antilichaam opgesplitst worden in twee losse Fab-fragmenten en een Fc-deel: het antilichaam wordt tussen en net onder de 'V' geknipt (Taberno en Vanhöfer, 2003; Almagro *et al*, 2008; Strome *et al*, 2004). Er bestaan verschillende vormen antilichamen, gebaseerd op hun constante regio van de zware keten: afhankelijk van de omstandigheden wordt een verschillende DNA-sequentie toegepast: μ (IgM), γ (IgG), α (IgA), ϵ (IgE), en δ (IgD). De lichte keten kan geclassificeerd worden in twee types: κ of λ . De κ - tot λ -ratio in de mens is ongeveer 2:1. Therapeutische antilichamen zijn meestal van het IgG en κ type.

IgM

IgM komt zowel tot expressie op het oppervlak van B-cellen als in uitgescheiden vorm, en heeft een hoge bindingscapaciteit. IgM ruikt in het vroege stadium van B-cel-gemedieerde, humorale immuniteit ziekteverwekkers op, nog voordat er voldoende IgG is gevormd voor de langere-termijnimmunitet. IgM vormt een pentameerstructuur.

IgG
IgC
pat
om
hoe
ver
IgC

IgA
IgA
en l
gev

IgE
IgE
die
alle
een
ove
var

IgD
IgE
blo
ma

Mo

An
Mo
één
een
het
- el

IgG

IgG levert het overgrote deel van de antilichaamgedieerde immuniteit tegen pathogenen. Dit is het enige antilichaam dat ook de placenta kan passeren om immuniteit te geven aan de foetus. IgG wordt aangemaakt bij grotere hoeveelheden van of bij een tweede contact met het antigeen. IgG is onder te verdelen in 4 subklassen: IgG1, IgG2, IgG3 en IgG4. De 4 subklassen van humaan IgG verschillen weinig van elkaar in de aminozuursequentie.

IgA

IgA wordt met name gevonden op mucosa, zoals de maag, darm, de luchtwegen, en het urogenitaal stelsel, en voorkomt kolonisatie van pathogenen. Het wordt ook gevonden in speeksel, traanvocht en moedermelk. IgA vormt een dimeerstructuur.

IgE

IgE bevindt zich op de slijmvliezen en zit meestal vast op basofiele granulocyten, die histamine vrij laten bij binding aan een antigeen. Dit is ook de oorzaak van allergische reacties, die gekenmerkt worden door bijvoorbeeld rode ogen en een rode neus vanwege de vaatverwijdende werking van histamines. Tegen het overdreven vrijlaten van histamine kan men antihistaminica nemen die de werking van histamine tegengaan. IgE beschermt ook tegen parasitaire wormen.

IgD

IgD functioneert met name als antigeenreceptor op B-cellen die nog niet zijn blootgesteld aan antigeen. De functie is nog niet precies gedefinieerd. IgD vormt maar 1% van alle immunoglobulines.

Monoklonale antilichamen

Antilichamen (Ab) kunnen worden onderverdeeld in monoklonaal of polykonaal. Monoklonale antilichamen (mAb) zijn antilichamen die afkomstig zijn van slechts één B-lymfocyt (plasmacel) en zij herkennen een specifiek antigeen op bijvoorbeeld een cel. Polyklonale antilichamen (pAb) zijn afkomstig van verschillende B-cellen, hetgeen resulteert in een mengsel van antilichamen tegen een bepaald antigeen – elk antilichaam herkent een uniek en verschillend deel op dit antigeen.

Monoklonale antilichamen van de muis (murine-Ab) zijn voor het eerst beschreven door Köhler en Milstein in 1975 (Köhler *et al*, 1975; Alkan, 2004; zie ook figuur 2). Het productieproces verloopt als volgt: een bepaald antigeen wordt bij een muis ingespoten. Zes tot twaalf weken later gebeurt dit nog een keer. Drie dagen later wordt de milt uit de muis gehaald. De milt bevat nu cellen die antilichamen tegen het ingespoten antigeen produceren, maar ook antilichamen voor andere antigenen. Hierna wordt van de milt een celsuspensie gemaakt. Omdat miltcellen niet goed te kweken zijn, bedachten de onderzoekers Köhler en Milstein dat ze deze cellen konden laten fuseren met tumorcellen van een andere muis. Tumorcellen zijn namelijk wel goed te kweken, omdat ze zich ongeremd delen. De tumorcellen missen echter wel een enzym dat de gifstof aminoptherine kan afbreken, een enzym dat de miltcellen wel hebben. Nadat de tumorcellen en de miltcellen zijn samengebracht, worden ze op een kweekmedium gebracht, dat aminoptherine bevat. De niet-gefuseerde tumorcellen overleven dit niet. De niet-gefuseerde miltcellen sterven na één à twee weken van ouderdom. De groepjes cellen die na drie weken nog leven heten celklonen of hybridomas. Elke celkloon is ontstaan uit een gefuseerde milt- en tumorcel. De klonen die het gewenste antilichaam produceren worden geselecteerd; dit zijn de antilichamen die een positieve reactie geven met het van tevoren gekozen antigeen. Alleen deze klonen worden verder gekweekt in een laboratorium.

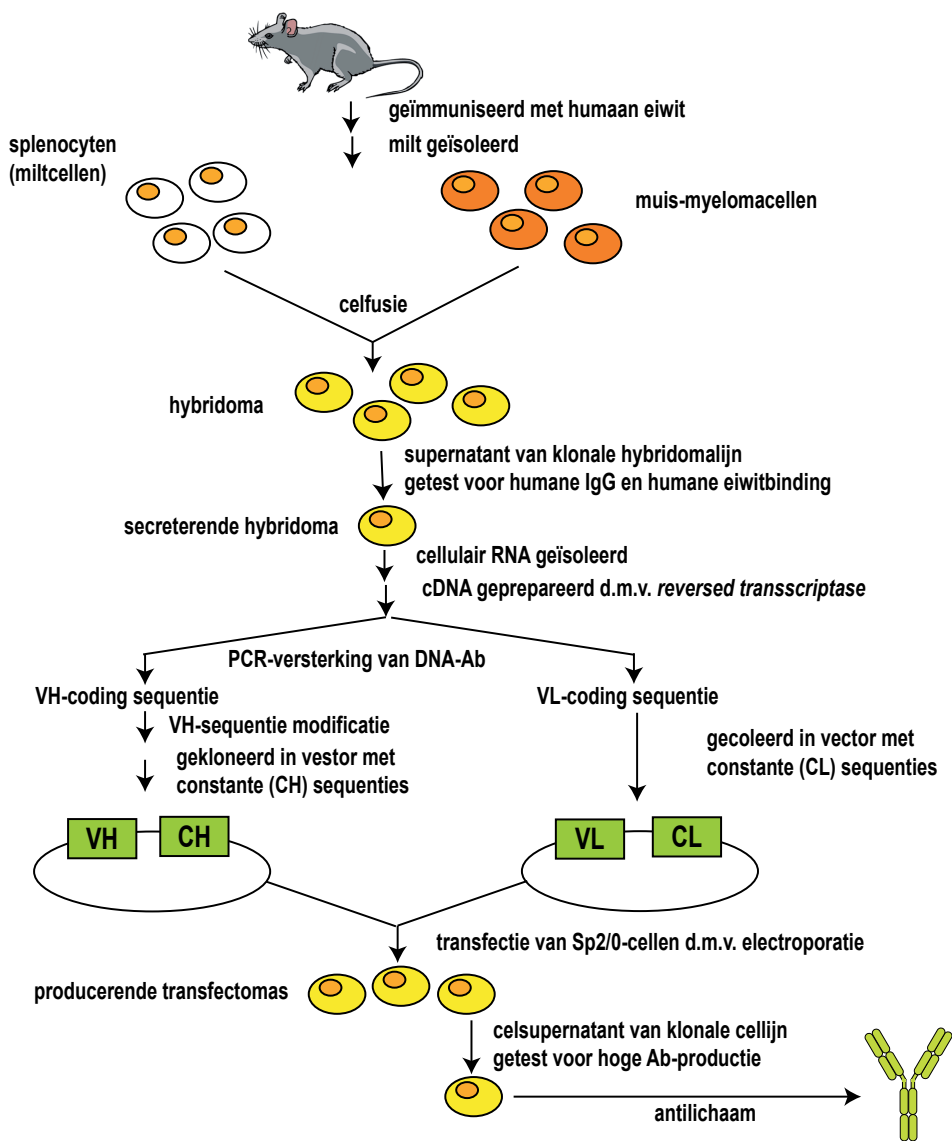
Muisantilichamen vergroten echter de kans op een immuunrespons bij de mens, en ze worden sneller afgebroken omdat ze als vreemd worden herkend door de mens. Bovendien kan er na herhaalde toediening een *human-anti-mouse-antibody* (mens-anti-muis-antilichaam; HAMA) respons optreden. Dit kan leiden tot neutralisatie van het antilichaam, versnelde afbraak van het antilichaam (en daarmee verminderde effectiviteit van het antilichaam) en/of allergische reacties. Allergische reacties kunnen variëren van koortsachtige verschijnselen, verlaagde bloeddruk, roodheid en jeuk van de huid, maar in extreme gevallen kunnen allergische reacties leiden tot anafylactische shock en zelfs dood. Antilichaamimmunogeniciteit is afhankelijk van verschillende lichamelijke factoren, en kan ook beïnvloed worden door klinische factoren zoals de dosering, de toedieningsroute (i.v., s.c. of i.m.) en frequentie van toediening en tenslotte de farmaceutische kwaliteit van het product (zie bijdrage Jiskoot). Ook patiëntgebonden factoren spelen mee, zoals ziekte, andere gebruikte medicatie, immuunstatus, en het type major histocompatibility complex (MHC) van de

pat
bij
(HI
Do
om
hur

sp
(m

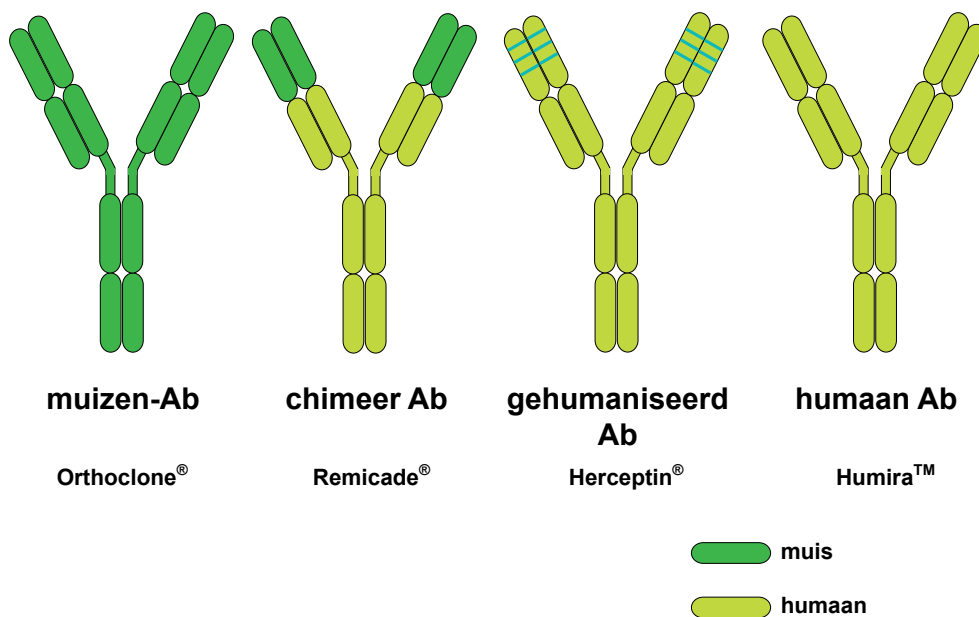
Fig

patiënt. Dit laatste betreft de groep van genen van de patiënt die een rol spelen bij de de antigeenproductie, en die onder andere de humane leukocyt-antigenen (HLA) omvat (Carter, 2006, Almagro *et al*, 2008, Scallon *et al*, 2006). Door middel van recombinant-DNA-technieken is het tegenwoordig mogelijk om een chimeer antilichaam te construeren en te produceren, welke voor 65% uit humane aminozuursequenties bestaat (zie figuur 2).



Figuur 2. Productie van antilichamen via hybridomatechniek (bron: Centocor bv).

Bij een chimeer antilichaam zijn een zware en lichte muizen-variabel deel (Fab) gekoppeld aan een humaan constant (Fc) gedeelte. Dit gebeurt door de specifieke DNA-sequenties aan elkaar te plakken. Deze antilichamen bevatten nog steeds dezelfde antigeen bindingsaffiniteit en -specificiteit, maar hebben maar 1/3 van de muis-aminozuursequenties. Deze chimere antilichamen verlagen daarom de immunogeniciteit en de HAMA-respons aanzienlijk. Chimere antilichamen zijn over het algemeen nog steeds immunogeen en kunnen dan ook een *human antichimeric antibody* (HACA) respons opwekken, met tot gevolg dat de effectiviteit van het chimere antilichaam afneemt. Ook hier geldt dat door deze immunogeniciteit resistentie tegen het antilichaam kan optreden en de klinische activiteit en response omlaag gaan, en de dosering omhoog moet om een vergelijkbaar antilichaamniveau in het serum te behouden voor klinisch activiteit. Later is men er in geslaagd om 'gehumaniseerde' antilichamen te maken (zie figuur 3). Hierbij worden humane zware en lichte ketens en het variabele bindingsdeel van een antilichaam verder voorzien van humane aminozuursequenties, waardoor tot ongeveer 90% van het antilichaam uit humane aminozuursequenties bestaat. Een deel blijft echter nog muisaminozuursequentie, in het bijzonder in het zogenoemde CDR of hypervariabele gebied dat de antilichaamaffiniteit ten goede komt.



Figuur 3. Categorieën van therapeutische antilichamen.

Volledig humane antilichamen worden verkregen uit humane cellen, of transgene muizen die humane antilichamen produceren. Humane monoklonale antilichamen worden gemaakt door de humane immunoglobuline-genen te transfereren in het muizegenoom en vervolgens deze muis in te spuiten met het juiste antigeen. De muis gaat vervolgens humane monoklonale antilichamen aanmaken tegen dit antigeen. Een andere techniek berust op het gebruik van humane antilichaam *phage display* / *yeast display* banken waarbij door middel van recombinant DNA technieken humane antilichamen kunnen worden geproduceerd door een virus of gist. Dit zijn zeer geavanceerde technieken en verdere details zullen hier verder niet besproken worden. (Almagro *et al*, 2008; Brekke en Sandlie, 2003; Scallon *et al*, 2006)

Productie van antilichamen

De productie van monoklonale antilichamen voor therapeutische toepassing is een complex proces, dat vele stappen omvat. Omdat antilichamen via de parenterale route (door injectie of infuus) worden toegediend, dient het eindproduct steriel te zijn en moet er onder aseptische condities geproduceerd worden of steriel gefiltreerd worden over een 0.2 μ -filter. Eindsterilisatie door autoclaving of gammastraling kan niet plaatsvinden. Immers, dat zou leiden tot afbraak van de monoklonale antilichamen tot een onacceptabel niveau. Meestal wordt er een combinatie gebruikt van aseptisch werken en steriele filtratie.

Het proces wordt opgesplitst in bereiding van actieve grondstof en van eindproduct.

Figuur 4 geeft een globaal overzicht van de bereidingsstappen voor de actieve grondstof, in dit geval een antilichaam.

Hieronder worden de verschillende bereidingsstappen verder toegelicht.

Naamgeving van antilichamen

De naamgeving van monoklonale antilichamen is aan strenge regels gebonden. De uitgang is hetzelfde: -mab, aangevend dat het een monoclaal antilichaam is. Vervolgens worden daar van achter naar voren lettercombinaties voor gezet, coderend voor:

- de bron van het antilichaam, bijvoorbeeld humaan of muis
- het doelwit, bijvoorbeeld bacteriën, immuunsysteem, cardiovasculair enzovoorts

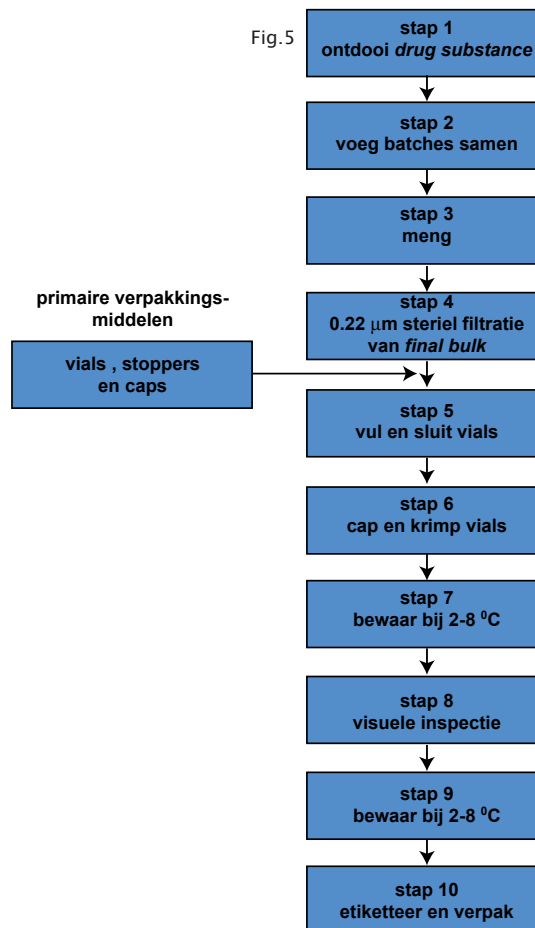
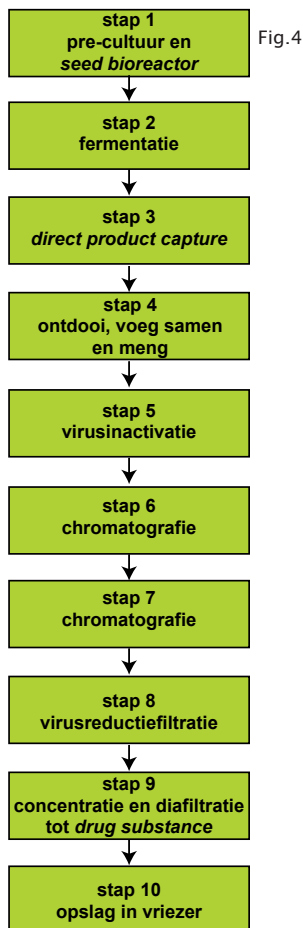
Het voorvoegsel is vrij te bepalen, maar moet wel een uitspreekbaar (!) woord opleveren, toepasbaar zijn in diverse talen (dus geen dubbele betekenis hebben) en nog niet eerder gebruikt zijn.

eerste	doel		bron		laatste
variable	-vi(r)-	viral	-u-	human	-mab
	-ba(c)-	bacterial	-o-	mouse	
	-li(m)-	immune system	-a-	rat	
	-le(s)-	infectious lesions	-e-	hamster	
	-ci(r)-	cardiovascular	-i-	primate	
	-fu(ng)-	fungal	-xi-	chimeric	
	-ne(r)-	nervous system	-zu-	humanized	
	-ki(n)-	interleukin	-axo-	rat/murine hybrid	
	-mu(l)-	musculoskeletal	-xizu-	chimeric + humanized	
	-o(s)-	bone			
	-tox(a)-	toxin as target			
	-co(l)-	colonic tumor			
	-me(l)-	melanoma			
	-ma(r)-	mammary tumor			
	-go(t)-	testicular tumor			
	-go(v)-	ovarian tumor			
	-pr(o)-	prostate tumor			
	-tu(m)-	miscellaneous tumor			



Figur
Figur

ber
•
Het
en o
De
inh
een
Dit



Figuur 4. Bereiding van een monokonaal antilichaam als actieve grondstof (drug substance) (bron: Centocor bv).
 Figuur 5. Bereiding van een monokonaal antilichaam als vloeibaar eindproduct (bron: Centocor bv).

bereiding van de actieve grondstof

- stap 1: pre-cultuur en inoculatie van *seed bioreactor*

Het pre-cultuur proces start met het ontdooien van een container uit de celbank, en die de cellen bevat die het gewenste monoklonale antilichaam gaan produceren. De cellen worden opgekweekt in een specifiek cultuurmedium in een fles. Als de inhoud van de fles volgroeid is doordat zich een celsuspensie heeft gevormd van een bepaalde celconcentratie, worden de cellen overgezet in grotere fles of *wavebag*. Dit proces wordt een aantal keer herhaald totdat er voldoende cellen gevormd zijn

om een *seed bioreactor* te inoculeren. Een dergelijke reactor heeft een inhoud van tientallen tot honderd liter. In de bioreactor groeien de cellen en wordt het medium continu ververst. Parameters zoals mediacomponenten (onder andere glucose, lactaat, ionen), zuurstof, kooldioxide en pH worden continu gemeten. Een aantal parameters, waaronder glucose en zuurstof, kunnen worden aangepast aan de behoefte van de groeiende cellen.

- stap 2: fermentatie

Als in de *seed-bioreactor* een bepaalde celconcentratie is gevormd, worden de cellen overgezet in een 'productie bioreactor' (100-1000 liter). In die bioreactor zijn de groeicondities van het grootste belang voor de hoeveelheid en de kwaliteit van het te produceren monoklonale antilichaam. Terwijl de cellen groeien en delen, scheiden ze allerlei stoffen af, waaronder het monoklonale antilichaam. Door middel van een filtersysteem worden de cellen gescheiden van het monoklonale antilichaam. Het nog niet opgezuiverde monoklonale antilichaam (*crude harvest*) wordt in een buffer bewaard totdat er voldoende monoklonale antilichaam is geproduceerd, om door te gaan naar stap drie.

- stap 3: affiniteitschromatografie

In stap drie wordt het onopgezuiverde monoklonale antilichaam op een affiniteitskolom gebracht. Het doel van deze chromatografische stap is het scheiden van het monoklonale antilichaam van allerlei medium- en celcomponenten die aanwezig zijn in het onopgezuiverde bulkmateriaal. Als de *crude harvest* op de kolom wordt gebracht bij een bepaalde pH, zal het monoklonale antilichaam binden aan de kolom en zullen allerlei onzuiverheden niet binden, maar door de kolom lopen in het eluens. Dit is de afvalstroom. Als daarna de pH wordt veranderd op de kolom, laat het monoklonale antilichaam weer los en loopt het met de elutievlloeistof van de kolom af. Dit is de eerste opzuiveringsstap. Na deze stap wordt het monoklonaal antilichaam ingevroren.

- stap 4 & 5: ontdooien, samenvoegen, mengen en virus inactivatiestap

In stap vier worden verschillende deelbatches monoklonaal antilichaam ontdooid, samengevoegd en gemengd. Vervolgens wordt aan het monoklonaal antilichaam een mengsel van vloeistoffen toegevoegd om eventueel aanwezige virussen te doden.

•
Na
doc

•
In s
geh
ant

•
In c
wa:
for
ant
opg
pre

ber
•
Aft
ont
vlo

•
Me
De
en '
Hie

•
All
opg
vrij

- stap 6 & 7: chromatografie

Na de virusinactivatie wordt het monoklonaal antilichaam verder opgezuiverd door middel van twee kolomchromatografische stappen.

- stap 8: virusreductiefiltratie

In stap acht wordt het monoklonaal antilichaam over een virusreductiefilter gehaald, om nog eventueel aanwezige virussen te scheiden van het monoklonaal antilichaam.

- stap 9: concentratie en diafiltratie

In deze laatste stap van de bereiding van de actieve grondstof wordt de buffer waarin het monoklonaal antilichaam zich bevindt verwisseld voor de uiteindelijke formuleringsbuffer. Tevens vindt er concentratie plaats van het monoklonale antilichaam tot de gewenste waarde. Het monoklonale antilichaam wordt tenslotte opgeslagen in de vriezer, totdat er het eindproduct van wordt gemaakt. Figuur 5 presenteert een stapsgewijs overzicht van de productie van het eindproduct.

bereiding van het vloeibare eindproduct

- stap 1, 2, 3 & 4: ontdooien, samenvoegen, mengen en steriele filtratie.

Afhankelijk van de gewenste batchgrootte wordt een aantal batches grondstof ontdooid, bij elkaar gevoegd en gemengd tot homogeniteit. Vervolgens wordt de vloeistof gefiltreerd over een 0.2 µ-filter.

- stap 5, 6 en 7: vullen, stopperen en *cappen* van de flacons voor injectie en opslag.

Met behulp van een vulmachine wordt een specifiek volume in flacons gevuld. De ruimte (*headspace*) boven de vloeistof in de flacons wordt gevuld met stikstof en vervolgens worden de flacons afgesloten met een stopje en een aluminium *cap*. Hierna worden de flacons tussen 2 en 8°C opgeslagen onder quarantaine.

- stap 8 en 9: visuele inspectie van de flacons, en opslag.

Alle flacons ondergaan een visuele inspectie en worden tussen 2 en 8°C opgeslagen onder quarantaine totdat de vrijgifte-analyses zijn uitgevoerd en een vrijgiftecertificaat van de betreffende batch is uitgegeven.

- stap 10: labelen en verpakken van de flacons

Tenslotte worden de flacons geëtiketteerd en in de secundaire verpakking gedaan en daarna opgeslagen tussen 2 en 8°C.

Therapeutisch succes van antilichamen

Een antilichaam is therapeutisch succesvol als aan de volgende criteria wordt voldaan:

- het antigeen heeft een hoog en selectief expressieniveau, namelijk alleen op de aangedane cellen en niet op normale cellen;
- de antigeenexpressie moet stabiel zijn;
- antigeenexpressie moet op alle aangedane cellen plaats vinden;
- het antigeen moet betrokken zijn bij de ziekte, bijvoorbeeld TNF- α in immunologische ziektebeelden, of het antigeen op de tumorcellen bij een oncologische indicatie;
- het antilichaam moet veilig in gebruik zijn.

Preklinische diermodellen kunnen een goed hulpmiddel zijn om therapeutische activiteit te voorspellen. Echter, het blijft afwachten hoe het resultaat is als het antilichaam wordt toegepast bij de mens. Antilichamen worden over het algemeen goed verdragen als therapie, hoewel infuusreacties, in het bijzonder bij de eerste dosering, veel voorkomend zijn. Men moet dan denken aan koortsachtige verschijnselen, koude rillingen, zwakte, hoofdpijn, misselijkheid, overgeven, diarree, lage bloeddruk, rode vlekken op de huid. Deze infuusreacties zijn over het algemeen goed behandelbaar – de infuussnelheid kan verlaagd worden en antihistaminica kunnen als premedicatie worden gegeven. Uiteraard zijn er ook antilichaamspecifieke bijwerkingen die te maken hebben met het doelwit waartegen het antilichaam is gericht. Deze bijwerkingen kunnen zeer divers zijn en worden dan ook apart behandeld.

Effectiviteit van antilichamen wordt voor een deel bepaald door de plasmahalfwaardetijd van een antilichaam. Deze kan variëren van enkele minuten in geval van (svFv)₂-fragmenten (enkelvoudige variabel-domeinfragmenten) tot enkele weken in geval van IgG-antilichamen. Afhankelijk van de therapeutische toepassing kan het zinvol zijn de halfwaardetijd aan te passen door wijziging van

de structuur van het antilichaam. Een product met een langere halfwaardetijd kan leiden tot verhoogde effectiviteit, lagere dosering of frequentie van toediening, of verhoogde lokalisatie bij het doelwit omdat het antilichaam langer de tijd heeft om het doelwit te bereiken. Een product met kortere halfwaardetijd kan zinvol zijn om de totale blootstelling van gehele lichaam aan een antilichaam te verlagen, of de verhouding *target-to-non-target* te verbeteren (Carter, 2006).

Een antilichaam kan in de praktijk op twee manieren worden toegediend: door middel van intraveneus (i.v.) infuus of via een subcutane (s.c.) injectie. Beide toedieningsroutes hebben voor- en nadelen. Een i.v. toediening moet in de regel op een gespecialiseerde infuusunit in het ziekenhuis of een gespecialiseerd centrum plaatsvinden, en vereist een bezoek van de patiënt aan de arts en ziekenhuis of centrum. Voordeel is dat er regelmatig contact van de patiënt met de behandelende arts is voor de controle ten aanzien van eventuele bijwerkingen, en dat het klaarmaken van het infuus en de manier van toediening gecontroleerd en van gelijke kwaliteit zijn.

Subcutane injecties zijn makkelijker voor de patiënt, omdat het thuis gedaan kan worden. Het vereist echter ook opslag van de medicatie thuis onder gecontroleerde omstandigheden (meestal de koelkast). Bovendien is er geen supervisie ten aanzien van de toediening zelf. Ook bij zelftoediening zal de patiënt dus regelmatig een bezoek aan de behandelende arts moeten brengen om de behandeling te controleren op effectiviteit, het optreden en voorkomen van eventuele bijwerkingen en eventueel om doseringsaanpassingen te bespreken.

werking van antilichamen

Antilichamen kunnen op diverse manieren werken (zie ook figuur 6; Carter *et al*, 2006; Schrama *et al* 2006; Strome *et al*, 2007; Reichert *et al*, 2007; Scallon *et al*, 2006; Taberno en Vanhöfer 2003):

- *neutralisatie*: dit betekent dat de antilichamen zodanig aan een antigeen binden, dat het antigeen geen interacties met cellen of moleculen meer aan kan gaan. Het antigeen verliest hierdoor zijn werking. Dit gebeurt onder meer bij gifstoffen (bijvoorbeeld geproduceerd door bacteriën, zogenoemde exotoxines) of virussen;
- *opsonisatie*: door het omringen van antigeen met antilichamen wordt fagocytose vergemakkelijkt. Dit komt omdat fagocyterende cellen receptoren bezitten voor het constante deel van een antilichaam (Fc-receptoren);

- *binding* aan essentiële groeifactoren en receptoren op cellen waardoor hun functie wordt geblokkeerd en wordt ingegrepen op het functioneren van die cellen;
- *binding* aan het antigeen op een cel waardoor direct apoptose (= actieve celdood) wordt ingezet;
- activatie van het complementsysteem. Dit geeft celgemedieerde cytotoxiciteit die afhankelijk is van antilichamen.
 - *ADCC (antigen dependent cellular cytotoxicity)* wil zeggen dat het antilichaam een antigeen herkent. Vervolgens bindt het constante deel (Fc-gedeelte) van het antilichaam aan immuuneffectorcellen, zoals B-cellen, macrofagen, monocyten en natural killer (NK) cellen. Door deze binding worden deze immuun-effectorcellen geactiveerd, waardoor het antilichaam en de cel of het antigeen waaraan het antilichaam was gebonden gefagocyteerd kan worden.
 - *CDC (complement dependent cytotoxicity)*. Door binding van het antilichaam aan het antigeen wordt het klassieke complementcascadesysteem geactiveerd, wat vervolgens leidt tot celdestructie. Dit leidt tot verbetering van de opsonisatie, omdat fagocyterende cellen ook complementreceptoren bezitten. Hierdoor wordt fagocytose verder vergemakkelijkt. Ook kan het binden van complement leiden tot directe vernietiging van het antigeen.

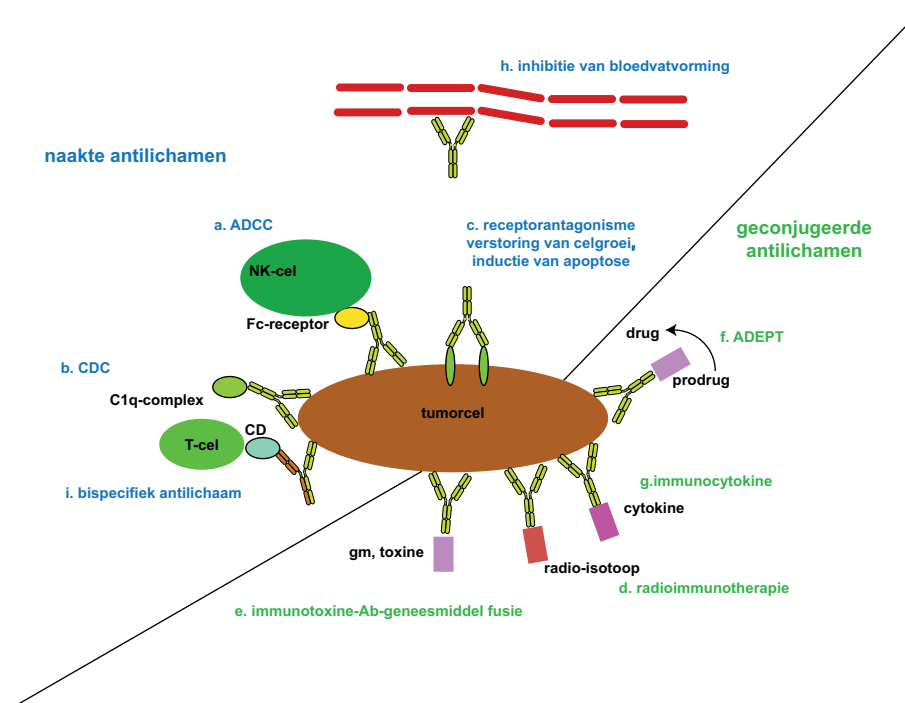
ADCC en CDC kunnen bijdragen aan de effectiviteit van het antilichaam wanneer de destructie van de doelwitcellen gewenst is, of wanneer tumorcellen of virus-geïnfecteerde cellen opgeruimd moeten worden.

- antilichamen kunnen ook gekoppeld worden aan cytotoxische middelen, cytokines, toxines of radionucleotiden. Men noemt dit geconjugeerde antilichamen en met deze koppelingsproducten kunnen doelwitcellen gedood worden (Wu en Senter, 2005). Met name in de oncologie wordt deze techniek veel toegepast. Doel is uiteraard de destructie van de tumorcellen, met zo min mogelijke bijwerkingen en met het intact laten van gezonde cellen. Men spreekt ook wel van *targeted therapies*, ofwel doelgerichte therapie. Dat kan in een directe of een indirecte vorm. Direct wil zeggen dat het antilichaam direct aan de tumorcel bindt en daarmee de celsignaaltransductie verandert en verstoort. Indirect wil zeggen dat het antilichaam aan een tumorspecifiek antigeen bindt en daarmee een effectorfunctie heeft, bijvoorbeeld door ADCC

Fig

te activeren, of daarmee toxines (difterietoxine, Pseudomonas exotoxin, ricine A, saporine) of radio-isotopen kan afleveren aan een doelcel. Voorwaarde is dat het antilichaam hoge specificiteit heeft en eventueel geïnternaliseerd wordt voor snelle en lokale werking van toxines. Een manier om toxiciteit te verminderen is door het verpakken van antilichamen in liposomen, ook wel immunoliposomen genoemd – een dubbellaagse lipidestructuur. Deze liposomen worden gebruikt voor het verlagen van toxiciteit en tegelijkertijd het verhogen van de toxische dosis afgeleverd bij de tumor;

- *bispecifieke antilichamen*: dit zijn antilichamen waarvan één arm van het antilichaam bindt aan de doelwitcel (bijvoorbeeld een tumorcel), en de andere arm bindt aan een effectorcel. Antigenen op effectorcellen zijn bijvoorbeeld CD16 (op natural killer cells en monocyten), CD64 (op monocyten en geactiveerde granulocyten) en CD3 (op T-cellen). Door deze dubbele binding worden immunoprocessen zoals ADCC en CDC direct geactiveerd, waardoor er een verhoogde effectiviteit ontstaat.



Figuur 6. Varianten en werkingmechanismen van antilichamen (bron: Zafir-Lavie et al, 2007).

Antilichamen in de dagelijkse praktijk

Antilichamen worden in diverse indicatiegebieden gebruikt. Men kan dan denken aan het gebruik in de diagnostiek van ziekten, de behandeling van auto-immuunziekten, de behandeling van kanker en immuunsuppressie na orgaantransplantatie. Enkele voorbeelden zullen hieronder verder besproken worden om een idee te geven van de diverse therapeutische indicaties en fysiologische processen waarvoor antilichaamtherapie gebruikt wordt.

Voor een volledig overzicht van geregistreerde antilichamen wordt u verwezen naar:

- Voor Amerika de website van FDA:
<http://www.fda.gov/cder/drug/default.htm>
- Voor Europa de website van EMEA:
<http://www.emea.europa.eu/htms/human/epar/eparintro.htm>
- Voor een overzicht van antilichamen die momenteel getest worden in klinische studies wordt u verwezen naar: www.clinicaltrials.gov

diagnostische toepassing van antilichamen

De klinische chemie is het onderdeel van de analytische chemie dat zich bezighoudt met de analyse van patiëntenmateriaal zoals weefsel, bloed en ander lichaamsvocht ten behoeve van de diagnose en preventie van ziekte en het volgen van de effecten van behandeling.

Voor deze testen maakt men vaak gebruik van antilichamen ter herkenning van cellen. Denk aan bloedgroepbepaling, detectie van onstekingsmediatoren in het bloed of urine (bijvoorbeeld $TNF\alpha$ en IL-6), typering van subtypes in geval van solide tumoren, typering van subtypes in geval van een lymfomen of leukemie, ten behoeve van selectie van de juiste behandeling.

toepassing van antilichamen bij orgaantransplantatie

Bij het transplanteren van organen kan het lichaam deze vreemde cellen als een

vija
aan
Dit
voc
een
in l
ver
Me

•

•

Als
geb
chr
afst
de j
inn
spe
toe
ant
T-c
(AI
ver

voc
anti
Cyt
bin
zijn

vijandige infectie beschouwen. Het afweermechanisme van de ontvanger wordt aangezet om dit vreemde lichaam onschadelijk te maken (*host versus graft*-reactie). Dit wordt veroorzaakt door het *major histocompatibility complex* (MHC), dat codeert voor eiwitten die zich aan de oppervlakte van veel zoogdiercellen bevinden en die een belangrijke rol spelen bij de herkenning van 'eigen' en 'niet-eigen' elementen in het lichaam. Het gaat om ongeveer 140 eiwitten die verschillende functies vervullen.

Men onderscheidt de acute afstoting van de chronische afstoting:

- Een acute afstotingsreactie treedt op kort na de transplantatie en gaat gepaard met ernstige (ontstekings-) verschijnselen.
- Een chronische afstoting is een proces waarbij het getransplanteerde orgaan door een min of meer traag verlopende ontstekingsreactie ten gronde wordt gericht. Een chronische afstotingsreactie is met medicatie (immunosuppressiva) veel moeilijker te behandelen dan een acute afstotingsreactie en bepaalt de overleving van het transplantaat op lange termijn.

Als er een chronische afstoting tegen het lichaamsvreemde orgaan plaatsvindt, gebeurt dit meestal in de eerste zes maanden na de transplantatie. Bij een chronische afstoting worden antilichamen geproduceerd, maar hoe de chronische afstoting precies werkt, weet men niet. In dit soort gevallen is het nodig dat de patiënt de rest van het leven dagelijks een aantal anti-afstotingsmedicijnen inneemt. Daar horen, naast immunosuppressiva zoals corticosteroïden, ook specifieke antilichamen tegen bepaalde componenten van het immuunsysteem toe die speciaal ontwikkeld zijn om afstoting te voorkomen, zoals monoklonaal antilichaam tegen IL-2-receptor α (basiliximab, daclizumab), of polyklonale anti-T-cel-antilichamen zoals *anti-thymocyte globulin* (ATG) en *anti-lymphocyte globulin* (ALG). Hierdoor is men echter wel vatbaarder voor simpele infecties zoals een verkoudheid of griep.

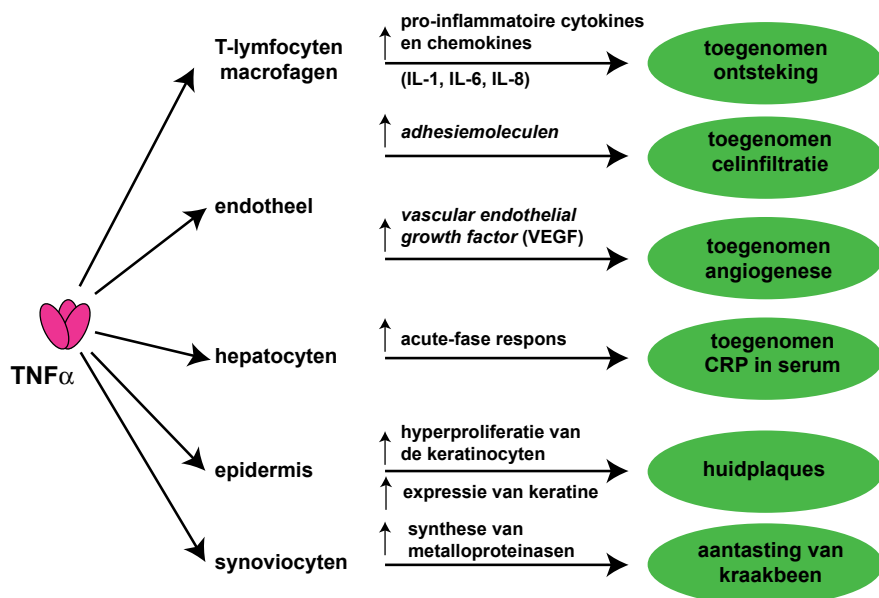
voorbeelden van therapeutische toepassing van antilichamen

antilichamen tegen cytokines

Cytokines zijn stoffen die berichten doorgeven van de ene naar de andere cel binnen het afweersysteem. Twee van de behandelde voorbeelden van cytokines zijn tumor necrosis factor α en de interleukines.

- **tumor necrosis factor α (TNF α)**

Tumor necrosis factor α (TNF α) behoort tot de cytokines. Het is een oplosbaar eiwit van 17 kDa dat als homotrimeer (3 TNF α -moleculen vormen één complex) aan twee verschillende celoppervlakte receptoren kan binden: tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1 - p55, CD120a) en TNFR2 (p75, CD120b). Macrofagen zijn de grootste bron van TNF α , maar ook een variëteit aan andere cellen kan TNF α produceren, waaronder fibroblasten, astrocyten, Kupffer-cellen, gladde spiercellen, keratinocyten en tumor cellen. TNF α is een veelzijdig cytokine – het medieert een breed scala aan biologische activiteiten, zoals celrekrutering, celdeling, celdood en immuunsysteemregulatie (zie figuur 7). Het exacte werkingsmechanisme van TNF α is voor een groot deel nog onbekend. TNF α heeft een belangrijke rol in de pathogenese van autoimmuunziekten zoals reumatoïde artritis, de ziekte van Crohn en psoriasis. Tevens is TNF α betrokken bij de snelle inductie van andere cytokines zoals IL-1 β , IL-6, en bij de inductie van acute-fase eiwitten zoals C-reactive protein (CRP), die alle een rol spelen bij auto-immuunziekten. TNF α werkt al vroeg in een complex netwerk van cellen, ontstekingsmediatoren en signaaltransductiepaden. Het wordt daarom gezien als één van de belangrijkste factoren in ziekteprocessen (zie voor meer gedetailleerde beschrijving Tracey *et al*, 2008).



Figuur 7. Biologische activiteit van TNF α (bron: Veale, 2005).

Er l
en l
ont
che
tun
cyt
die
fibr
200
var
wai
hoc
zijn
TN
en
leu
pre
TN
et a
ma
et a
en l
ant
(He

Hel
ren
net
•
•
•
•
•

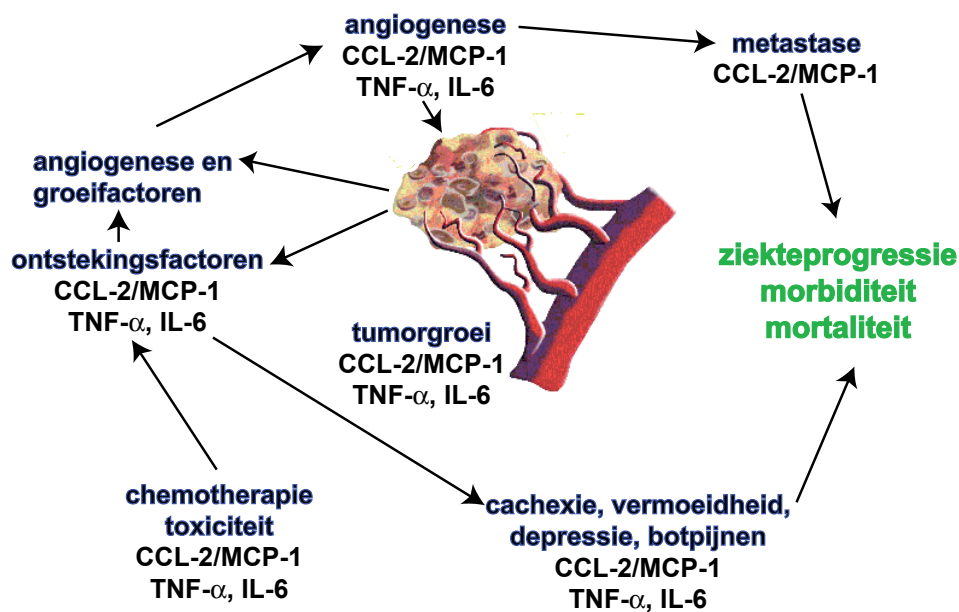
Er bestaat een link tussen ons cytokine-gemedieerde immuunsysteem, infecties en het ontstaan van kanker. Het wordt meer en meer duidelijk dat chronische ontsteking op de plek van een tumor, die voor een deel wordt gemedieerd door chemokines en cytokines, kan bijdragen aan de groei en metastasering van deze tumor. Tumorcellen en stroma (extracellulair weefsel) kunnen chemokines en cytokines uitscheiden die weer andere cellen aantrekken, bijvoorbeeld leukocyten die angiogenese (nieuwe vaatvorming) stimuleren, of door middel van TNF α fibroblasten activeren in groei en functie (Szlosarek *et al*, 2003; Mocellin *et al*, 2005; Tracey *et al*, 2008). TNF α speelt in dat opzicht een dubbelrol. Het niveau van TNF α is bepalend: een laag niveau betekent een tumor-remmende werking waar het zijn oorspronkelijke naam *tumor necrosis factor* aan heeft te danken:); een hoog niveau heeft een tumor-activerende werking. Hoge TNF α -expressieniveaus zijn aangetoond in pancreas-, nier-, borst-, long- en prostaatkanker. Een hoog TNF α -expressieniveau is gecorreleerd met het tumorstadium, algehele overleving, en de mate van tumor-geassocieerde fenomenen zoals cachexie, hypercalcemie, leucocytose, koorts, anemie en vermoeidheid (zie figuur 8). Daarom wordt er preklinisch en klinisch onderzoek gedaan naar het effect van het wegvangen van TNF α door middel van antilichamen bij kanker (Szlosarek *et al*, 2003; Anderson *et al*, 2004; Yan *et al* 2006). In het proefdiermodel zijn de resultaten veelbelovend, maar resultaten van klinische studies zijn nog niet breed gepubliceerd (Mocellin *et al*, 2005). Het lijkt er op dat combinatietherapie met een antilichaam tegen TNF α en met bijvoorbeeld chemotherapie de beste optie is. Wat betreft het anti-TNF α -antilichaam infliximab (Remicade[®]) lijkt het dat er activiteit is in niercelcarcinoom (Harrison *et al*, 2007).

Het werkingsmechanisme van TNF α -antagonisten (antilichamen of andere remmers) is voor een groot deel nog onbekend. Duidelijk is wel dat door de neutralisatie van TNF α -overproductie, diverse processen als het ware omkeren:

- *omgekeerde signaaltransductie*: door het binden aan de TNFR of aan TNF α worden andere cascades aangezet;
- *apoptose*: geprogrammeerde celdood wordt geactiveerd;
- *anti-ontsteking* en de vermindering van onstekings-gerelateerde cytokines;
- *angiogenese*: vorming van nieuwe bloedvaten rond een tumor;
- *cytotoxiciteit* door het constante (Fc) deel van het antilichaam (ADCC, CDC, fagocytose, degranulatie);

- *normalisatie* van immuunfunctie;
- *stoppen van botdestructie* (bijvoorbeeld in reumatoïde arthritis of arthritis psoriatica);

Zie voor meer gedetailleerde beschrijving Tracey *et al*, 2008.



Figuur 8. Ontstekingsmediatoren die een rol spelen in de oncologie (bron: Centocor bv).

TNF α -remmers grijpen in op een van de belangrijkste moleculen in het immuunsysteem. Daarom moet men bedacht zijn op een aantal aspecten. Zo kunnen TNF α -remmers het risico van infecties verhogen, met name re-activatie van latente tuberculose. Het veiligheidsprofiel van TNF α -antilichamen is niet alleen gebaseerd op bijwerkingenrapportage in klinisch onderzoek en spontaan gerapporteerde bijwerkingen, maar ook op uitgebreide patiëntveiligheidsregistraties, waarin van grote cohorten patiënten de gegevens van het gebruik van deze antilichamen worden verzameld. Deze registraties hebben bijgedragen tot een bredere kennis qua veiligheid van gebruik en effectiviteit tegen de ziekte van deze producten (Tracey *et al*, 2008; Szlosarek *et al*, 2003; Mocellin *et al*, 2005).

Div
infl
aan
TN
Eer
TN
me
TN
het
Er
een
voc

•
Inte
van
afw
ont
her
B-c
ma
IL-
rec
acti
als
in c
diff
nor
kor
ont

Diverse anti-TNF α -antilichamen zijn er op de markt. Een voorbeeld hiervan is infliximab (Remicade[®]), een gehumaniseerd monoklonaal antilichaam dat bindt aan de oplosbare variant en de celmembraan- of receptorgebonden variant van TNF α . Bovendien kan het ook ADCC induceren.

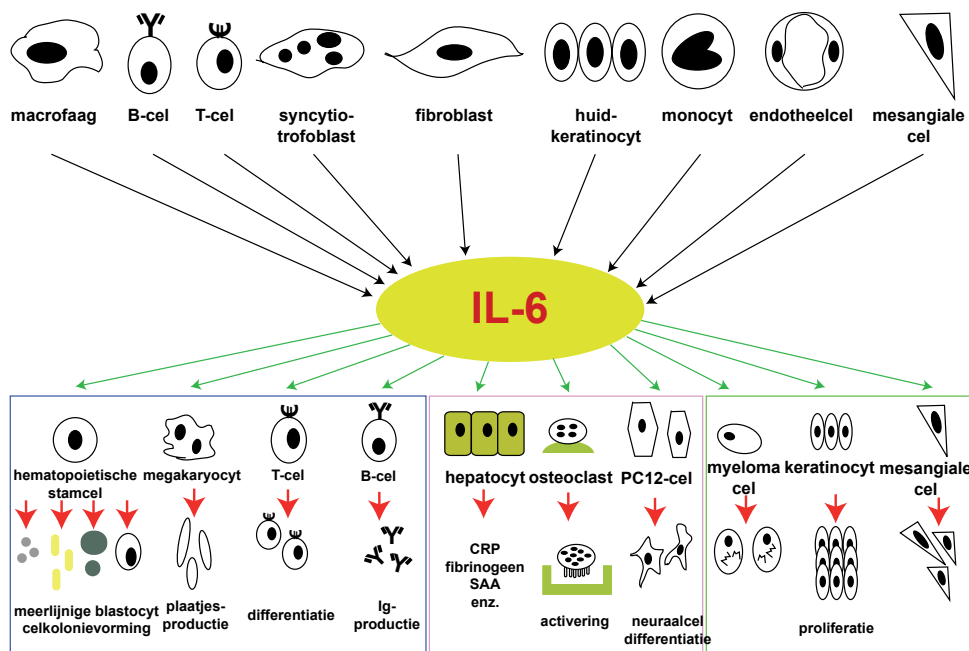
Een andere variant is Humira[®] (adalimumab), een humaan antilichaam tegen TNF α , welke in voorgevulde injectiespuiten of prikpenen aan de patiënt wordt meegegeven voor subcutane injecties thuis. Enbrel[®] (etanercept) heeft ook een TNF α -remmende werking, maar wordt niet tot de antilichamen gerekend omdat het een fusie is tussen de TNF-receptor en het Fc-gedeelte van IgG.

Er worden nog meer volledig humane antilichamen ontwikkeld die zowel via een intraveneus infuus of via subcutane injecties kunnen worden toegediend. Een voorbeeld daarvan is golimumab (Tracey *et al*, 2008).

- **interleukines**

Interleukines behoren tot de cytokines en worden benoemd met nummers. Een van die interleukines is interleukine 6, afgekort IL-6. In een normaal functionerend afweersysteem heeft IL-6 vele werkingsmechanismen, onder andere in ontsteking, immuniteit, botmetabolisme, reproductie, neuronale ontwikkeling en hematopoïesis. Eén daarvan is het zorgen voor de groei en verder specialisatie van B-cellen. IL-6 wordt geproduceerd door diverse cellen, met name door monocyten, maar ook door T-cellen, B-cellen, fibroblasten, endotheelcellen, en epitheelcellen. IL-6 kan binden aan een oplosbare receptor of aan een membraangebonden receptor. Binding resulteert in een homodimerisatie van deze receptor waardoor activatie van een signaaltransductieproces plaatsvindt. IL-6 wordt geproduceerd als reactie op ontsteking, stress, verwonding en infectie, en komt tot overexpressie in diverse soorten kanker. In geval van ontsteking activeert het T-cellen, geeft differentiatie van B-cellen en induceert de productie van acute-fase-eiwitten. In normale omstandigheden is dit een goed gereguleerd proces. In gezonde mensen komt IL-6 zeer laag tot expressie. In geval van kanker is de productie van IL-6 ontregeld en heeft IL-6 een rol in (zie ook figuur 9):

- proliferatie, differentiatie en overleving van tumorcellen;
- angiogenese;
- inductie van resistentie tegen chemotherapie.



Figuur 9. Bronnen en biologische activiteit van interleukine-6 (bron: Nishimoto et al, 2003).

Verhoogde IL-6-niveaus komen voor in diverse solide tumoren, zoals melanomen en tumoren van, borst, colon, rectum, nier, long, ovarium, pancreas, prostaat, en maag. Overproductie van IL-6 speelt mogelijk ook een rol bij kankers van het bloed- en afweersysteem, zoals het B-cel-lymfoom, multiple myeloom (ziekte van Kahler), T-cel lymfoom en de ziekte van Hodgkin. Ook is van een aantal vormen van kanker, zoals leukemie, prostaatkanker en borstkanker aangetoond dat IL-6 de tumorgroei en het invasief en metastaserend gedrag bevordert, en angiogenese kan stimuleren. IL-6-expressieniveaus correleren met tumorhoeveelheid en -overleving. Bovendien lijkt IL-6 ook aan kankergerelateerde aspecten bij te dragen, zoals cachexie, vermoeidheid en koortsachtige symptomen, die nadelig zijn voor de patiënt en voor de werking van tumortherapieën. Dit heeft ertoe geleid dat men heeft gekeken of het blokkeren van IL-6 de tumorgroei doet stoppen of kan verminderen. Dit bleek inderdaad het geval te zijn. Er is in fase-I studies gekeken of anti-IL-6 werkt bij patiënten met verschillende typen bloedcelkanker en nierkanker. Op dit moment zijn er ook studies gaande op het gebied van onder andere multiple myeloom, non-Hodgkin lymfoom, ziekte van Castleman (een lymfklieraandoening) en prostaatkanker. In sommige studies wordt anti-IL-6 alleen

geg
voc
CN
al, 2
Eer
en l
te v
tegr
reu
een
son
ster
een
ant
psc
ant
IL-

ant
Inte
tra
bes
en t
vor
(EC
en l
oste
enc
vas
stof
α) ε
celk
enc
voc
ang

gegeven, in andere studies wordt het gecombineerd met de standaardbehandeling voor de betreffende ziekte. Momenteel zijn er 2 antilichamen in onderzoek, CNTO328 dat IL-6 herkent, en tocilizumab dat de IL-6-receptor herkent. (Tripathi *et al*, 2003, Barton, 2005).

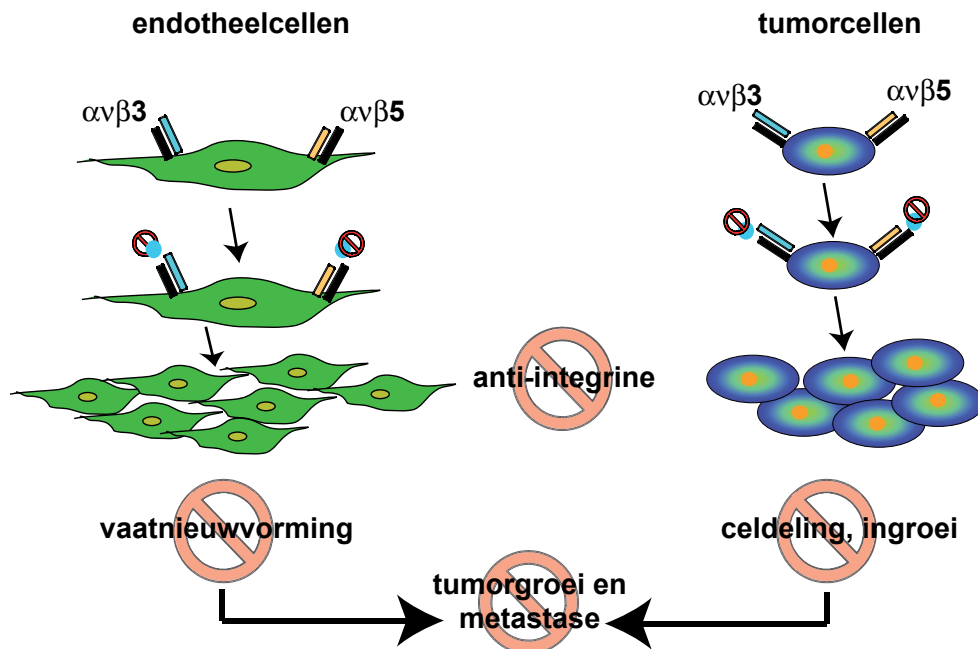
Een ander voorbeeld is IL-12 / IL-23. In een gezond afweersysteem zorgen IL-12 en IL-23 ervoor dat T-cellen zich specialiseren om zeer specifieke afweerfuncties te vervullen. Antilichamen tegen IL-12 en IL-23 zouden kunnen worden ingezet tegen auto-immuunziekten. Voorbeelden hiervan zijn psoriasis, multiple sclerose, reumatoïde artritis en type 1 diabetes. Bij diverse auto-immuunziekten is er een verstoring van IL-12 en IL-23 expressie. Er is inmiddels aangetoond dat bij sommige van deze ziekten het blokkeren van deze interleukines het ziektebeeld sterk doet verbeteren. Psoriasis lijkt de eerste indicatie te worden, waarvoor een anti-IL-12/IL-23 antilichaam op de markt zal komen. Dit anti-IL-12/IL-23 antilichaam wordt ook bij andere ziekten getest, zoals multiple sclerose en artritis psoriatica, een gewrichtsontsteking bij psoriasispatiënten. Momenteel zijn er 2 antilichamen in onderzoek, CNTO1275 dat IL-12 / IL-23 herkent, en ABT-874 dat IL-12 herkent. (Wittig, 2007)

antilichamen tegen integrines

Integrines zijn heterodimere (bestaande uit twee verschillende elementen) transmembraan receptoreiwitten die op normale endotheelcellen voorkomen. Ze bestaan uit een α - en een β -subunit. Er zijn momenteel 18 verschillende α subunits en 8 verschillende β subunits bekend, die meer dan 24 combinaties kunnen vormen. Integrines functioneren als receptoren voor diverse extracellulaire matrix (ECM) componenten, zoals fibronectine, vitronectine, laminine, collageen type I en IV, gedensureerde collageen, *von Willebrand-Factor* (vWF), thrombospondine, osteopontine en fibrinogeen. Ze zijn betrokken bij de adhesie van geactiveerde endotheelcellen aan de ECM en cellen onderling. Bovendien kunnen integrines vasculair-endotheelcellen stimuleren tot het afscheiden van signaaltransductie stoffen, zoals *basic fibroblast growth factor* (Bfgf), *transforming growth factor α* (TGF- α) en *vascular endothelial growth factor* (VEGF). Dit resulteert in een verhoogde celoverleving, stimulatie van celdeling, celdifferentiatie en migratie van endotheelcellen voor angiogenese. In de normale situatie zijn integrines nodig voor wondheling, embryonale implantatie en ontwikkeling, weefselvorming, angiogenese, bloedstolling, trombose en ontsteking (Kerbel, 2008; Nemeth *et al*,

2007; Jubb *et al*, 2006).

In diverse typen kanker, zoals melanomen en tumoren van prostaat, pancreas, borst, long en nier, blijken integrines tot overexpressie te komen. Deze overexpressie is negatief gecorreleerd met overleving en ziekteprogressievrije periode. Het lijkt er zelfs op dat het expressieniveau gebruikt kan worden als prognostische marker voor de diverse typen tumoren. Tumorgroei en metastaserend vermogen zijn afhankelijk van goede bloedvoorziening, namelijk voor aanvoer van zuurstof en voedingsstoffen en voor afvoer van CO₂ en afvalstoffen. Tumorcellen zijn zelf in staat groeifactoren af te scheiden, waardoor integrines tot overexpressie komen, en daardoor celdeling, invasie en migratie, metastasering en angiogenese voor de overleving van de tumor wordt gestimuleerd. Met name αv -integrine speelt hierbij een grote rol. Blokkering van αv -integrine leidt tot inductie van apoptose (actieve celdood), en remming van celadhesie, migratie, invasie, en proliferatie van zowel endotheel als tumor cellen. Proefdieronderzoek heeft aangetoond dat blokkering van αv -integrine leidt tot remming van angiogenese en direct tumorceldood (zie figuur 10; Kerbel, 2008; Nemeth *et al*, 2007; Jubb *et al*, 2006).



Figuur 10. Werking van anti-integrine-antilichamen (bron: Centocor bv).

Als
ant
pri
kur
typ
pro
con
typ
div
anc
nat
 αv
An
ang
ang
toe
EG

ant
An
Ab
ant
bui
bin
bin
ver
en
op
coa
vaa
blo
pla
is g
en
(Ma

Als men tumoren die αv -integrine tot overexpressie brengen, behandelt met een antilichaam tegen αv -integrine, groeit de tumor minder snel of verdwijnt zelfs. In principe zijn er heel veel vormen van kanker waar dit anti- αv -integrine tegen zou kunnen werken. Er is in een fase-1-studie gekeken bij patiënten met verschillende typen tumoren, en er zijn studies gaande op het gebied van melanoom en prostaatkanker. Anti- αv -integrine wordt getest door het alleen te geven, of te combineren met een chemotherapie, de standaard behandeling voor die specifieke type tumoren. Er zijn diverse anti-integrine antilichamen in ontwikkeling in diverse therapeutische indicaties, maar deze zijn nog niet geregistreerd. Onder andere CNTO95 (pan αv), etaracizumab (AbegrinTM; $\alpha v\beta 3$), volociximab ($\alpha 5\beta 1$), natalizumab (Tysabri[®]; $\alpha 4\beta 1$) en cilentigide (klein chemisch molecuul tegen $\alpha v\beta 3 / \alpha v\beta 5$) (Nemeth *et al*, 2007, Jubb *et al*, 2006).

Angiogenese kan ook geremd worden door de signaaltransductiepaden die bij angiogenese betrokken zijn te blokkeren met antilichamen. Voorbeelden van deze angiogeneseremmers die inmiddels geregistreerd zijn voor diverse therapeutische toepassingen zijn Avastin[®] (bevacizumab, remt VEGF), Erbitux[®] (cetuximab, remt EGFR), Herceptin[®] (trastuzumab, anti-HER2) (Yan *et al*, 2006).

antilichamen bij bloedstolling

Antilichamen kunnen ook worden ingezet ter voorkoming van bloedstolling. Abciximab (of ReoPro[®]) is het Fab-fragment van het chimere monoclonale antilichaam 7E3, dat zich bindt aan glycoproteïne IIb/IIIa-receptor op de buitenkant van bloedplaatjes. Door deze receptoren te blokkeren, wordt de binding van fibrinogeen, von Willebrand-factor en andere moleculen die zich binden aan de GPIIb/IIIa-receptorbindingsplaatsen van geactiveerde trombocyten, verhinderd. Zo wordt voorkomen dat de bloedplaatjes met elkaar verkleven en een bloedprop vormen. Abciximab bindt ook aan de vitronectinereceptor op plaatjes en endotheelcellen. De vitronectinereceptor medieert de pro-coagulante eigenschappen van plaatjes en proliferatieve eigenschappen van vaatwandendotheel en gladde spiercellen. Vanwege deze tweeledige specificiteit blokkeert abciximab de uitbarsting van trombinevorming die volgt op plaatjesaktivatie effectiever dan stoffen die alleen de GPIIb/IIIa blokkeren. ReoPro[®] is geregistreerd (niet in EU) als een aanvullende behandeling naast heparine en acetylsalicylzuur voor percutane coronaire interventie en instabiele angina (Mazzaferrri en Young, 2008).

Toekomstverwachting

Vanwege hun hoge specificiteit en affiniteit ten aanzien van hun doelwitantigeen en hun unieke effectormechanismen kunnen antilichamen diverse voordelen bieden boven chemisch geproduceerde middelen. Antilichamen worden in de regel goed verdragen en hebben een goed veiligheidsprofiel, met over het algemeen lage en behandelbare toxiciteit. Er zullen in de toekomst steeds meer antilichamen op de markt komen die in diverse indicaties worden gebruikt. Wellicht is er ook een rol weggelegd voor antilichamen die voor zowel een immunologische toepassing als ook een oncologische toepassing hebben.

De verwachting is echter wel dat men met antilichaamtherapie tot in lengte der levensdagen moet doorgaan om het effect te behouden, zoals bij autoimmuunziekten. Zolang de veroorzaker niet bekend is en/of weggehaald kan worden, zal stoppen met antilichaamtherapie resulteren in het terugkomen van de ziekte. In de immunologische toepassingen, bijvoorbeeld bij auto-immuunziekten, zijn er nog steeds patiënten die niet op antilichaamtherapie reageren, of die na verloop van tijd een terugval krijgen in hun ziekte. Er is veel onderzoek nodig om uit te vinden wat daarvan de oorzaak is en hoe men dat kan ondervangen.

Bij oncologische indicaties zou men verwachten dat als de tumor en metastasen eenmaal weg zijn, de behandeling gestopt kan worden. Dat wordt ook wel gedaan, maar het blijft een risico. Er kan nog steeds minimale resterende ziekte (*minimal residual disease*; MRD) aanwezig zijn, die zeer moeilijk detecteerbaar is. Men kiest dan ook meestal voor een *wait & see*-beleid: de behandeling wordt gestopt en men wacht af wat er gebeurt. Echter, de antilichamen die nu in ontwikkeling zijn voor oncologische indicaties worden voornamelijk toegepast in latere stadia van de ziekte, dus dan is stoppen meestal geen optie. Over het algemeen zijn antigenen in oncologie tumor-geassocieerd, en niet zozeer tumor-specifiek. Het verschil met normale cellen is dat het expressieniveau van het doelwit antigeen velen malen hoger is dan op normale cellen. In de oncologie

is één van de doelen het verhogen van effectiviteit door middel van het verbeteren van antitumoractiviteit van het antilichaam, om daarmee de algehele overleving en ziekteprogressievrije periode van de patiënt te verhogen. Nieuwe middelen voor oncologie worden in de regel getest in de meer vergevorderde stadia van kanker, in patiënten die vaak al meerdere behandelingen hebben gehad. Antilichamen kunnen wellicht al in vroege stadia toegepast worden, en een toegevoegde waarde laten zien in combinatie met chemotherapie of radiotherapie, en wellicht een betere respons laten zien bij kleine metastasen en/of MRD.

Goede selectie van patiënten is nodig. Welke patiënt reageert het beste? Zijn er patiënt- of tumorcel-specifieke kenmerken die gebruikt kunnen worden om de respons als het ware te voorspellen. Welke auto-immuunziekte of tumorspecifieke biomarker in het bloed kan worden gebruikt om tijdens de behandeling de respons te volgen? Er is meer kennis nodig omtrent de relatie tussen respons, biomarkers and toxiciteit.

De focus is op de ontwikkeling van humane antilichamen, omdat deze minder bijwerkingen veroorzaken. De kans op therapeutisch succes is zeer hoog als men een uniek antilichaam heeft weten te identificeren.

Desalniettemin is de ontwikkeling van een antilichaam tot een therapeuticum een kostbare aangelegenheid. Het vergt vrij veel tijd voordat een uniek antilichaam is gevonden dat werkt tegen een antigeen in het bloed of op de cel die specifiek is voor die bepaalde ziekte. Er gaat een heel selectieproces in celkweek en proefdiermodellen aan vooraf voordat men het beste antilichaam heeft gevonden. Vervolgens moet men het antilichaam op veiligheid en effectiviteit testen in de mens, wat weer een aantal jaren duurt. Het modificeren van de al bestaande antilichamen is naast het ontwikkelen van nieuwe antilichamen een goed alternatief voor het uitbreiden van antilichaam therapie en toepassingsgebieden. Men kan dan denken aan het koppelen van toxines, radio-isotopen, of het verpakken van het antilichaam in bijvoorbeeld liposomen.

Net als voor alle andere therapeutische middelen geldt ook voor antilichamen dat er drie drempels overwonnen moeten worden voordat een antilichaam de markt haalt - veiligheid, effectiviteit en kwaliteit. Kortom, er ligt een uitdagende toekomst in het verschiet.

Referenties

- Alkan SS.** Monoclonal antibodies: the story of a discovery that revolutionized science and medicine. *Nat Rev Immunol.* 2004; 2: 153-6.
- Almagro JC en Fransson J.** Humanization of antibodies. *Front Biosc* 2008; 13: 1619-33.
- Anderson GM, Nakada MT en DeWitte M.** Tumor necrosis factor-alpha in the pathogenesis and treatment of cancer. *Curr Opin Pharmacol* 2004; 4: 314-20.
- Barton BE.** Interleukin-6 and new strategies for the treatment of cancer, hyperproliferative diseases and paraneoplastic syndromes. *Expert Opin Ther Targ* 2005; 4: 737-52.
- Brekke OH en Sandlie I.** Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century. *Nat Rev Drug Discov.* 2003; 1: 52-62.
- Carter PJ.** Potent antibody therapeutics by design. *Nat Rev Immunol* 2006; 5: 343-57.
- Harrison ML, Obermueller E, Maisey NR, Hoare S, Edmonds K, Li NF, Chao D, Hall K, Lee C, Timotheadou E, Charles K, Ahern R, King DM, Eisen T, Corringham R, DeWitte M, Balkwill F en Gore M.** Tumor necrosis factor alpha as a new target for renal cell carcinoma: two sequential phase II trials of infliximab at standard and high dose. *J Clin Oncol* 2007; 29: 4542-9.
- Jubb AM, Oates AJ, Holden S en Koeppen H.** Predicting benefit from anti-angiogenic agents in malignancy. *Nat Rev Canc* 2006; 8 :626-35.
- Kerbel RS.** Tumor angiogenesis. *N Engl J Med* 2008; 19: 2039-49.
- Köhler G en Milstein C.** Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975; 5517: 495-7.
- Mazzafferri EL Jr en Young JJ.** Abciximab: a review and update for clinicians. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2008; 5: 609-18.
- Mocellin S, Rossi CR, Pilati P en Nitti D.** Tumor necrosis factor, cancer and anticancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005; 1: 35-53.
- Nemeth JA, Nakada MT, Trikha M, Lang Z, Gordon MS, Jayson GC, Corringham R, Prabhakar U, Davis HM en Beckman RA.** Alpha-v integrins as therapeutic targets in oncology. *Cancer Invest.* 2007; 7: 632-46.
- Nishimoto N, Yoshizaki K en Kishimoto K.** Interleukin 6. In: *Targeted Therapies in Rheumatology.* Smolen JS en Lipsky PE (Eds) (2003).

Reichert JM en Valge-Archer VE. Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2007; 5: 349-56.

Scallion BJ, Snyder LA, Anderson GM, Chen Q, Yan L, Weiner LM en Nakada MT. A review of antibody therapeutics and antibody-related technologies for oncology. *J Immunother* 2006; 4: 351-64.

Schrama D, Reisfeld RA en Becker JC. Antibody targeted drugs as cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 2: 147-59.

Strome SE, Sausville EA en Mann D. A mechanistic perspective of monoclonal antibodies in cancer therapy beyond target-related effects. *Oncologist* 2007; 9: 1084-95.

Szlosarek PW en Balkwill FR. Tumour necrosis factor alpha: a potential target for the therapy of solid tumours. *Lancet Oncol* 2003; 9: 565-73.

Taberno J en Vanhöfer U. The promise of monoclonal antibodies for cancer treatment. *Oncology Biother* 2003, Volume 2, Number 2.

Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG en Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther* 2008; 2: 244-79.

Trikha M, Corringham R, Klein B en Rossi JF. Targeted anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for cancer: a review of the rationale and clinical evidence. *Clin Cancer Res* 2003; 13: 4653-65.

Veale DJ, Ritchlin C. en FitzGerald, O. Immunopathology of psoriasis and psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: Suppl 2:ii26-9.

Wittig BM. Drug evaluation: CNTO-1275, a mAb against IL-12/IL-23p40 for the potential treatment of inflammatory diseases. *Curr Opin Investig Drugs* 2007; 11: 947-54.

Wu AM en Senter PD. Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates. *Nat Biotechnol* 2005; 9: 1137-46.

Yan L, Anderson GM, DeWitte M en Nakada MT. Therapeutics potential of cytokine and chemokine antagonists in cancer therapy. *Eur J Cancer* 2006; 42: 793-802.

Yan L en Zhu Z. Development of Antibody-Based Therapeutics for Oncology Indications. *Drug Development Research.* 2006; 67: 699-728.

Zafir-Lavie I, Michaeli Y en Reiter Y. Novel antibodies as anticancer agents, *Oncogene* 2007; 26: 3714-373.

DR RM SCHIFFELERS



Raymond Schiffelers studeerde Bio-Farmaceutische Wetenschappen aan de Universiteit van Leiden. Na een korte periode bij het toenmalige SmithKline & Beecham Pharmaceuticals (Welwyn, UK) studeerde hij af in 1995. Zijn promotie volgde in 2001 op een onderzoek naar het gericht afleveren van antibiotica bij bacteriële infecties met behulp van liposomen, uitgevoerd aan het Erasmus Universitair Medisch Centrum en de Universiteit Utrecht.

Vervolgens werd hij post-doctoraal onderzoeker in Utrecht op een project van KFW-Kankerbestrijding gericht op het targeten naar tumorendothel. In het kader van dit onderzoek werkte hij bij Intradigm Co (Rockville, USA) in samenwerking met de University of Tennessee en de University of Maryland aan het afleveren van siRNA tegen vascular endothelial growth factor receptor 2 voor het remmen van angiogenese.

Inmiddels is hij universitair hoofddocent aan de Universiteit Utrecht. Zijn onderzoek richt zich op de ontwikkeling van geavanceerde drug delivery systemen voor toepassing bij ontstekingsziekten en kanker. In 2007 ontving hij van NWO-STW een Vidi-beurs om de komende vijf jaar zijn onderzoek op de relatie tussen ontsteking en kanker en de toepassing van getargete ontstekingsremmende therapie te onderzoeken.

VA
NU

RM

Inl

Nu

is d

nuc

aan

de t

in t

wo:

Ger

ger

bas

gec

de l

bas

aan

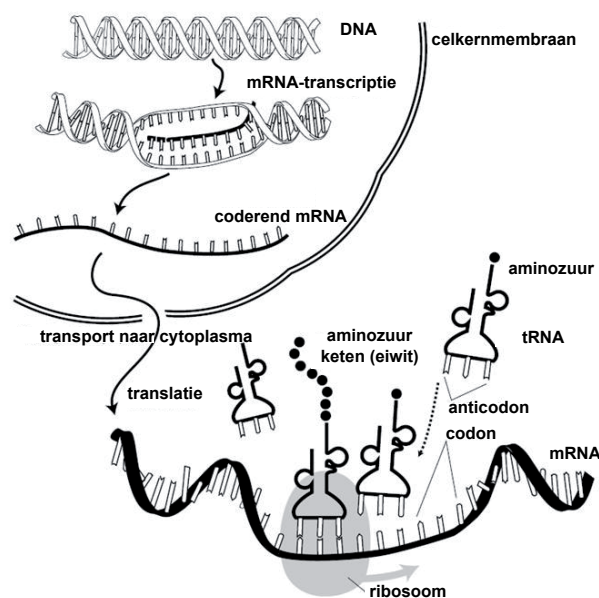
tot

VAN PATHOFYSIOLOGIE NAAR THERAPIE MET..... NUCLEÏEZUREN

RM Schiffelers

Inleiding

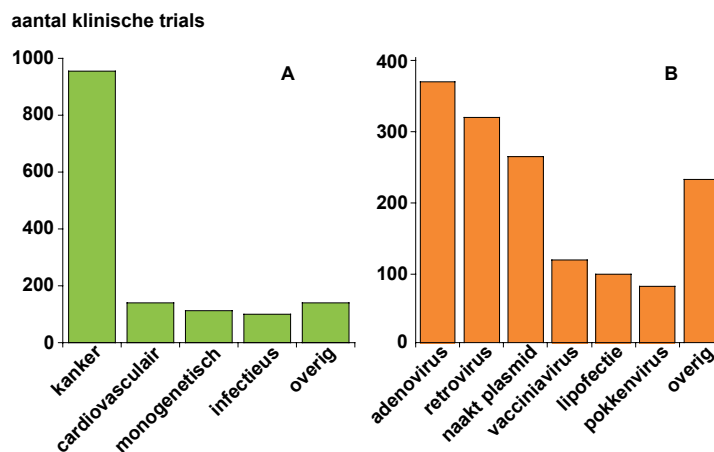
Nucleïezuren vormen een veelbelovende klasse van therapeutica. Het probleem is dat ze al 30 tot 40 jaar veelbelovend zijn. Hoewel de eerste producten met nucleïezuren op de markt zijn, blijft een echte doorbraak tot nu toe uit. Dit geeft aan dat het concept van het gebruik van nucleïezuren aantrekkelijk is, maar dat de toepassing niet eenvoudig is. Nucleïezuren kunnen worden onderverdeeld in twee categorieën: die waarbij een compleet gen wordt toegevoegd of wordt vervangen (gentherapeutica), en de categorie van de oligonucleotiden. Gentherapeutica bestaan uit DNA en bevatten de informatie voor een compleet gen. Hierdoor zijn gentherapeutica groot (meestal honderden tot duizenden basenparen) en moeten zij afgeleverd worden tot in de celkern. De grootte gecombineerd met de noodzaak de kernmembraan te passeren maakt deze klasse de lastigste om toe te passen. Oligonucleotiden zijn veel korter (enkele tientallen basen of basenparen) en bestaan uit DNA of RNA. De meeste hebben een aangrijpingspunt in de transcriptie van DNA tot mRNA of de translatie van mRNA tot eiwit (figuur 1).



Figuur 1. Schematisch overzicht van het proces van transcriptie en translatie in de eukaryote cel.

Gentherapie

In de jaren '60-70 van de vorige eeuw werden de eerste toespelingen gemaakt op een therapeutisch gebruik van nucleïnezuren (Tatume 1966; Osterman *et al*, 1971). In 1971 werden genen door middel van virussen overgebracht naar zoogdiercellen *in vitro*. Deze cellen kregen hierdoor een nieuw fenotype omdat het nieuwe gen leidde tot de vorming van een nieuw eiwit dat tot dan toe ontbrak. In 1990 werd de eerste klinische gentherapie-trial uitgevoerd en met succes. Een meisje van vier jaar met adenosine deaminase (ADA) deficiëntie werd genezen. Haar witte bloedcellen werden *ex vivo* behandeld waarbij ze het normale adenosinedeaminasegen kregen ingebouwd. Vervolgens werden de cellen weer teruggeplaatst (Blease *et al*, 1993). Bij een ander meisje faalde de therapie omdat het virus, dat gebruikt was om het DNA in de cellen te krijgen, leidde tot een afweerreactie waardoor de gemodificeerde cellen werden vernietigd. In een soortgelijke trial in 1999 werd de aandoening *X-linked severe combined immunodeficiency disease* (X-SCID) eveneens *ex vivo* behandeld door beenmergcellen te corrigeren en terug te plaatsen. Het aanvankelijke succes werd overschaduwde doordat in 2002 enkele kinderen leukemie ontwikkelden als gevolg van de virale vector (Haceion-Bey-Abina *et al*, 2003). Op dit moment zijn er ruim 1200 klinische trials met gentherapie uitgevoerd (J Gene Medicine Clinical Trial Site) en tot nog toe heeft dit niet geleid tot een product dat op de markt is. Een overzicht van de verschillende trials uitgesplitst naar indicatie en gebruikte vector staat in figuur 2.



Figuur 2. Wereldwijd aantal uitgevoerde klinische trials op het gebied van gentherapie uitgesplitst naar ziekte (A) en gebruikte vector (B); het aantal klinische trials is cumulatief weergegeven tot het jaar 2008.

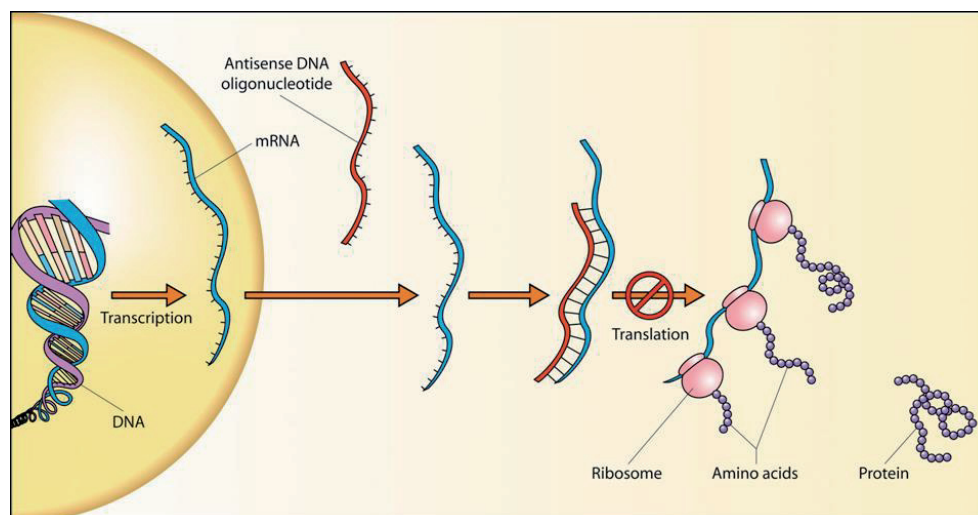


De belangrijkste hindernissen liggen in de veiligheid en efficiëntie van de genoverdracht. Hoewel virussen vaak prima in staat zijn efficiënt genen af te leveren, zijn hun veiligheid, immunogeniciteit, specificiteit voor de targetcel en productie op industriële schaal problematisch (Bouard *et al*, 2008; Rätty *et al*, 2008). Voor de niet-virale vectoren is met name de efficiëntie een groot probleem omdat zij na intracellulaire opname niet goed in staat zijn het gen tot in de kern te transporteren (Kodama *et al*, 2006).

Oligonucleotiden

De therapeutische mogelijkheden van oligonucleotiden werden 30 jaar geleden voor het eerst onderkend door Stephenson en Zamecnik. In 1978 publiceerden zij een tweetal artikelen waarin een oligonucleotide werd gebruikt om de replicatie van het Rous sarcoma virus te remmen *in vitro* (Stephenson en Zamecnik, 1978; Zamecnik en Stephenson, 1978). Deze geboorte van de antisense-therapeutica opende een heel nieuw vakgebied en industrie.

De basis wordt gevormd door de natuurlijke Watson-Crick-baseparing tussen guanosine en cytosine enerzijds en adenosine en thymidine/uracil anderzijds.



Figuur 3. Werkingsmechanisme van antisense oligonucleotiden. Hybridisatie van antisense en mRNA verstoort de translatie waardoor eiwitproductie wordt geremd.

Bij de antisense strategie wordt een oligonucleotide gesynthetiseerd met een complementaire sequentie aan die van een mRNA dat codeert voor een eiwit dat de ziekte veroorzaakt. Door de natuurlijke hybridisatie tussen het oligonucleotide en het mRNA wordt het aflezen van de sequentie verstoord en kan het mRNA zelfs worden gedegradeerd (figuur 3).

De Watson-Crick-hybridisatie vormt vaak de basis voor het werkingsmechanisme van oligonucleotiden. Een overzicht van de verschillende strategieën met oligonucleotiden staat weergegeven in tabel 1.

Tabel 1. Werkingsmechanismen van oligonucleotiden

oligonucleotide	effect
triple helix-vormende oligonucleotiden (TFO)	verstoort mRNA transcriptie door vorming van drie samengevlochten DNA-ketens ('triple helix') en kan ook specifieke DNA mutaties induceren door deze binding tussen de ketens.
transcriptiefactor lokaas (<i>decoy</i>)	transcriptiefactoren induceren mRNA transcriptie door te binden aan sequenties die tussen verschillende genen weinig of niet verschillen ('consensus' sequenties). Oligonucleotiden met dezelfde sequenties kunnen transcriptiefactoren wegvangen.
antisense	verstoort translatie door binding aan mRNA. Hierdoor kan het ribosoom problemen ondervinden bij de translatie of kan het mRNA worden afgebroken door het endonuclease Ribonuclease H (RnaseH)
exon-skipping	verstoort splicing van het mRNA, waardoor bijvoorbeeld premature stop-codon mutaties zoals bij Duchenne's ziekte kunnen worden vermeden.
siRNA/miRNA	natuurlijk voorkomend, op antisense gelijkend mechanisme, waarbij dubbelstrengs RNA de trigger vormt voor binding aan mRNA en verstoring van translatie. Translatie wordt verstoord door remming van de ribosoompassage of door afbraak van het mRNA.
CpG ⁺ -oligonucleotiden	stimuleren immuunrespons via ongemethyleerde CpG-motieven die veel voorkomen in het DNA van pathogenen.
aptameren*	verstoring van interacties tussen moleculen via een directe binding van het oligonucleotide aan het molecuul, overeenkomend met de binding van een antilichaam aan een antigeen.

* De CpG-oligonucleotiden en aptameren hoeven niet noodzakelijkerwijs intracellulair te worden afgeleverd om toch actief te zijn. De receptoren voor CpG-bevattende nucleïne-zuren bevinden zich ook op het celoppervlak. Aptameren zijn vergelijkbaar met antilichamen. Zij binden hun targetmolecuul dankzij een speciale 3-dimensionale structuur. Aflevering is afhankelijk van de locatie van het doelmolecuul.

De
mo
ant
Vit
cyt
200
wo:
dez
net
recl
pla
de
Ma
zijn
bep
bin
ord
en
is d
vor
ang
wo:
aan

Dertig jaar onderzoek heeft twee oligonucleotide preparaten opgeleverd die op dit moment via de ziekenhuisapotheek verkrijgbaar zijn in Nederland: Vitravene[®] (een antisense preparaat) en Macugen[®] (een aptameer).

Vitravene[®] is een antisense antiviraal geneesmiddel dat de replicatie van cytomegalovirus (CMV) blokkeert (Fattal en Bochot, 2006; Mercorelli *et al*, 2008). Het bindt aan een viraal mRNA en tast geen menselijk mRNA aan. Het wordt toegepast in de behandeling van CMV-retinitis in AIDS-patiënten. In deze patiënten kan CMV een ontsteking van de lichtgevoelige cellen in het netvlies veroorzaken die uiteindelijk kan leiden tot blindheid. Vitravene[®] wordt rechtstreeks in de oogbol in het glasachtig lichaam geïnjecteerd, in de buurt van de plaats van de infectie (intravitreale injectie). De aanbevolen dosis bedraagt tussen de 165 en 300 µgram/oog (25 – 50 µl/oog).

Macugen[®] is een aptameer (Bennet *et al*, 2008; Pieramici *et al*, 2008). Aptameren zijn nucleïnezuren die zich door intramoleculaire basenparing vouwen in een bepaalde structuur (figuur 4). Aptameren kunnen worden geselecteerd op hun binding aan een targetmolecuul en zij kunnen affiniteiten bereiken van dezelfde orde grootte als antilichamen. Macugen[®] is een gePEGyleerd aptameer dat specifiek en met hoge affiniteit bindt aan vasculair-endotheel groeifactor (VEGF). Daardoor is deze groeifactor niet langer actief. VEGF is een eiwit dat bij de neovasculaire vorm van age-related macular degeneration (AMD; netvliesveroudering) de angiogenese, vasculaire permeabiliteit en ontsteking bevordert. Bij de behandeling wordt Macugen[®] in een dosis van 0,3 mg in 9 injecties per jaar geïnjecteerd in het aangetaste oog, ook hier vindt injectie lokaal plaats in het glasachtig lichaam.

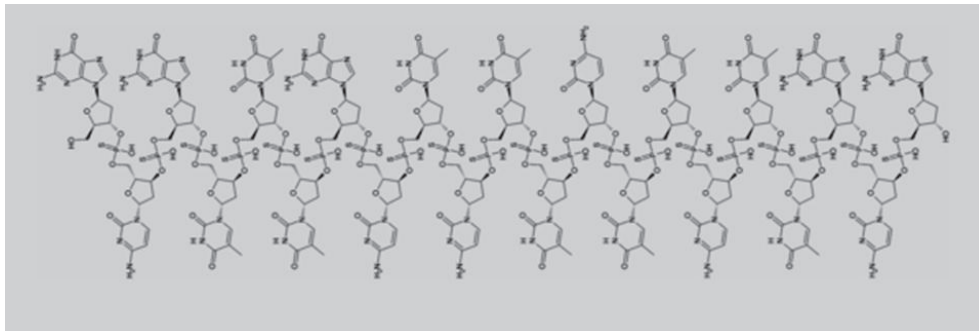


Figuur 4. Ruimtelijke structuur van een oligonucleotide door intramoleculaire basenparing.

Hoewel er twee producten op de markt zijn, faalden voor de oligonucleotiden vele klinische trials (Anonymus, 2007; Gewirtz *et al*, 2001). De moeilijkheden die komen kijken bij het toepassen van oligonucleotiden -of nucleïnezuren in het algemeen- als farmacon, zijn legio.

30 jaar antisense – de problemen in kaart

Nucleïnezuren hebben niet bepaald, of beter gezegd bepaald niet, de juiste karakteristieken om toegepast te worden als farmacon. In figuur 5 staan de twee- en driedimensionale structuur weergegeven van Vitravene[®], een oligonucleotide bestaande uit 21 basen.



Figuur 5. Structuur van Vitravene[®].

Iedere base draagt een negatieve lading, het totale molecuulgewicht bedraagt ≈ 7500 Da, en het molecuul bevat ongeveer 100 waterstofbrugdonoren en -acceptoren.

Indicaties over de eigenschappen waaraan een verbinding moet voldoen om membranen te passeren, worden gegeven in Lipinski's regel van vijf (Lipinski 2000), die luidt als volgt:

- niet meer dan 5 waterstofbrug-donoren;
- niet meer dan 10 waterstofbrug-acceptoren;
- een molecuulgewicht onder de 500 Da;
- een log P-waarde tussen de 0 en 5.

Op
mo
ger
acc
olig
neg
nuc
Da
nuc
intr
mir
in c
200
Box
aan
lich
kar
Jud

De

Bij
olig
kar
wel
bij

De
uit.
nie
gev
var
cel.
bas

GRO

Op al deze punten falen oligonucleotiden - laat staan genterapeutica. Het molecuulgewicht van oligonucleotiden loopt van 5000 tot 25000 Da, en voor genterapeutica tot in de miljoenen. Het aantal waterstofbrugdonoren en acceptoren kan tientallen tot duizenden bedragen en doordat iedere base in het oligonucleotide verbonden is via een negatief geladen fosfaatgroep is de logP negatief. Tegelijkertijd moet (op de aptameren en CpG-oligonucleotiden na) het nucleïnezuur wél intracellulair worden afgeleverd.

Daarnaast zijn ook de biologische karakteristieken lastig. De aanwezigheid van nucleases kan zorgen voor degradatie van het oligonucleotide. Daarnaast is na intraveneuze injectie in het algemeen >90% van de geïnjecteerde dosis binnen 5 minuten uitgescheiden via de nieren (voor de oligonucleotiden) of opgenomen in de lever (voor de genterapeutica) (Healy *et al*, 2004; Ogris 2006; de Wolf *et al*, 2007).

Bovendien leidt de toediening van therapeutische nucleïnezuren tot de aanwezigheid van nucleïnezuren op onverwachte plaatsen in de cel en in het lichaam. Omdat dit meestal een signaal is voor het binnendringen van pathogenen, kan dit leiden tot sterke immuunreacties (Sioud 2008; Takaoka en Taniguchi 2008; Judge en MacLachlan, 2008; Kumagai *et al*, 2008).

De Toekomst

Bij de nucleïnezuren die op de markt zijn, wordt een grote hoeveelheid oligonucleotide lokaal aangeboden, waardoor de slechte weefselverdelingskarakteristieken kunnen worden ondervangen. Blijkbaar kan daarbij zelfs een, weliswaar zeer beperkt, percentage toch spontaan het cytoplasma bereiken, zoals bij Vitravene®.

De echte doorbraak van deze klasse van geneesmiddelen blijft tot nu toe echter uit. Oligonucleotiden zijn relatief duur om te synthetiseren en ze hebben bepaald niet ideale eigenschappen als farmacon, zoals slechte orale biobeschikbaarheid, gevoeligheid voor degradatie, snelle klaring, en beperkte lokalisatie op de plaats van de ziekte, zowel op het niveau van het weefsel als op het niveau binnen de cel. Daar staat tegenover dat alleen de sequentie het geneesmiddel bepaalt. De basale fysisch-chemische karakteristieken blijven gelijk. Dat betekent dat het

weliswaar heel lastig is om de eerste producten op de markt te brengen, maar dat dit voor volgende producten makkelijker zou moeten kunnen zijn omdat de karakteristieken van het molecuul niets essentieel veranderen; alleen de sequentie wordt aangepast aan de behoefte van de ziekte. Dat maakt verdere ontwikkeling van oligonucleotide-therapeutica voor de farmaceutische industrie nog steeds zeer aantrekkelijk omdat het vroege ontwikkelingsprogramma sterk wordt vereenvoudigd. De belangrijkste uitdagingen lijken te liggen op het terrein van verbetering van weefselverdeling en intracellulaire opname.

Referenties

- Anonymus.** Acadesine: AICA riboside, ARA 100, arasine, GP 1 110. *Drugs RD* 2007; 8: 321-334.
- Bennett MD, Yee W en Bryan JS.** Pegaptanib combined with intravitreal injection of moxifloxacin as treatment of wet macular degeneration. *Retina* 2008; 28: 976-980.
- Blaese RM, Culver KW, Chang L, Anderson WF, Mullen C, Nienhuis A, Carter C, Dunbar C, Leitman S, Berger M, et al.** Treatment of severe combined immunodeficiency disease (SCID) due to adenosine deaminase deficiency with CD34+ selected autologous peripheral blood cells transduced with a human ADA gene. Amendment to clinical research project, Project 90-C-195, January 10, 1992. *Hum Gene Ther.* 1993; 4: 521-527.
- Bouard D, Alazard-Dany N en Cosset FL.** Viral vectors: from virology to transgene expression. *Br J Pharmacol* 2008; advance online publication 8 September 2008; doi: 10.1038/bjpp.2008.349.
- Fattal E en Bochot A.** Ocular delivery of nucleic acids: antisense oligonucleotides, aptamers and siRNA. *Adv Drug Deliv Rev* 2006; 58: 1203-1223.
- Gewirtz AT en Sitaraman S.** Alicaforsen. Isis Pharmaceuticals. *Curr Opin Investig Drugs.* 2001; 2: 1401-1406.
- Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, et al.** LMO2-associated clonal T-cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 2003; 302: 415-419.
- Healy JM, Lewis SD, Kurz M, Boomer RM, Thompson KM, Wilson C en McCauley TG.** Pharmacokinetics and biodistribution of novel aptamer compositions. *Pharm Res* 2004; 21: 2234-2246.

J Gene Medicine Clinical Trial Site, Gene Therapy Trials Worldwide <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>

Judge A en MacLachlan I. Overcoming the innate immune response to small interfering RNA. *Hum Gene Ther* 2008; 19: 111-124.

Kodama K, Katayama Y, Shoji Y en Nakashima H. The features and shortcomings for gene delivery of current non-viral carriers. *Curr Med Chem* 2006; 13: 2155-2161.

Kumagai Y, Takeuchi O en Akira S. TLR9 as a key receptor for the recognition of DNA. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60: 795-804.

Lipinski CA. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2000; 44: 235-249.

Mercorelli B, Sinigalia E, Loregian A en Palù G. Human cytomegalovirus DNA replication: antiviral targets and drugs. *Rev Med Virol* 2008; 18: 177-210.

Ogris M. Nucleic acid based therapeutics for tumor therapy. *Anticancer Agents Med Chem* 2006; 6: 563-570.

Osterman JV, Waddell A en Aposhian HV. Gene therapy systems: the need, experimental approach, and implications. *Ann N Y Acad Sci.* 1971; 179: 514-519.

Pieramici DJ en Rabena MD. Anti-VEGF therapy: comparison of current and future agents. *Eye* 2008; 22: 1330-1336.

Räty JK, Lesch HP, Wirth T en Ylä-Herttua S. Improving safety of gene therapy. *Curr Drug Saf* 2008; 3: 46-53.

Sioud M. Does the understanding of immune activation by RNA predict the design of safe siRNAs? *Front Biosci* 2008; 13: 4379-4392.

Stephenson ML en Zamecnik PC. Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75: 285-288.

Tatume L. Molecular biology, nucleic acids, and the future of medicine. *Perspect. Biol. Med.* 1966; 10: 19.

Takaoka A en Taniguchi T. Cytosolic DNA recognition for triggering innate immune responses. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60: 847-57.

Wolf HK de, Snel CJ, Verbaan FJ, Schiffelers RM, Hennink WE en Storm G. Effect of cationic carriers on the pharmacokinetics and tumor localization of nucleic acids after intravenous administration. *Int J Pharm* 2007; 331: 167-175.

Zamecnik PC en Stephenson ML. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75: 280-284.

PROF. DR W JISKOOT



Wim Jiskoot studeerde farmacie aan de Universiteit Utrecht (doctoraalexamen in 1987 en apothekersdiploma in 1991). In 1991 promoveerde hij aan de Universiteit Utrecht op het proefschrift 'Pharmaceutical Aspects of Monoclonal Antibodies'. Als post-doc aan de University of Utah (USA) bestudeerde hij eiwitligandinteracties met biofysische technieken (1991-1993). Na zijn terugkeer naar Nederland in 1994 werd hij hoofd van de afdeling Bacteriële

Vaccin Ontwikkeling aan het RIVM in Bilthoven. Hier was hij verantwoordelijk voor de ontwikkeling van productieprocessen voor bacteriële vaccins. In 1998 vertrok hij naar de Universiteit Utrecht, waar hij als stafid van de afdeling *Pharmaceutics* onderzoek deed naar formulering, toediening en fysisch-chemische karakterisatie van therapeutische eiwitten en vaccins. In maart 2006 werd hij aangesteld als hoogleraar bij de divisie *Drug Delivery Technology* van het Leiden/Amsterdam Center for Drug Research (LACDR), Leiden Universiteit. Hij doet voornamelijk onderzoek naar de ontwikkeling van vaccinformuleringen en naar ongewenste immunogeniciteit van therapeutische eiwitten in relatie tot eiwitstructuur en formuleringsvariabelen.

FORMULERING VAN BIOFARMACA: SIMPELE OPLOSSINGEN, COMPLEXE ANALYSES

W Jiskoot en KH Hoogendoorn

Inleiding

Vrijwel alle momenteel geregistreerde biofarmaca zijn therapeutische eiwitten en vaccins (vaak ook gebaseerd op eiwitten). Dit hoofdstuk gaat over de formulering en karakterisering van eiwitten, met de nadruk op de huidige generatie therapeutische eiwitten. Vaccins zijn in een eerder Anselmus colloquium aan de orde gekomen (Jiskoot, 2000).

Eiwitgeneesmiddelen moeten net als ander medicijnen veilig en effectief zijn. Uitzonderingen daargelaten, worden eiwitten via de naald toegediend. Subcutane, intramusculaire en intraveneuze injecties danwel intraveneuze infusies, zijn de meest gangbare toedieningsroutes. Eiwitgeneesmiddelen worden bij voorkeur met zo min mogelijk pijn door medisch getraind personeel of door de patiënt zelf toegediend. Verder moet gestreefd worden naar een houdbaarheidstermijn van het product van minimaal 12-24 maanden, vanuit kosten- en distributietechnische overwegingen. De kwaliteit en de stabiliteit van eiwitten wordt in hoge mate bepaald door de formulering.

Eiwitstabiliteit behelst meer dan het behoud van de chemische structuur. Een eiwit is een groot molecuul met een gedefinieerde natieve ruimtelijke structuur (conformatie). De aminozuurvolgorde (primaire structuur) is georganiseerd in secundaire structurelementen zoals alfa-helices en bèta-sheets. De wijze waarop de secundaire structuren ten opzichte van elkaar zijn gevouwen wordt de tertiaire structuur van het eiwit genoemd. De secundaire en tertiaire structuren van het eiwit worden in stand gehouden door relatief zwakke fysische krachten (waterstofbruggen, van der Waals-interacties en hydrofobe interacties) en labiele cystinebruggen. Sommige eiwitten zijn samengesteld uit meer dan één al dan niet covalent gebonden polypeptideketens; voorbeelden hiervan zijn insulinehexameren en monoklonale antistoffen (bestaand uit vier covalent gebonden ketens). Bovendien ondergaan veel eiwitten zogeheten translationele modificaties, zoals glycosylering en fosforylering. Alle onderdelen van de eiwitstructuur dragen bij aan de therapeutische werking van het molecuul. De kwaliteit en stabiliteit van eiwitgeneesmiddelen kan daarom alleen goed in kaart gebracht worden door alle structuurniveaus van een eiwit te karakteriseren. Hierbij wordt gebruikgemaakt van een groot arsenaal aan moderne analytische

technieken, waarover later meer.

De complexiteit van eiwitten maakt ze tot delicate moleculen om mee te werken en heeft tot gevolg dat het productieproces, de formulering, de opslag, het transport en het gebruik in de kliniek of bij de patiënt thuis van het eiwitproduct zorgvuldig gekozen dienen te worden. Aan deze keuzes ligt een lang en kostbaar ontwikkelingstraject ten grondslag.

Formulering van therapeutische eiwitten

Het is cruciaal om therapeutische eiwitten in de juiste 'omgeving' te bewaren. De omgeving wordt enerzijds bepaald door de formulering (= werkzame stof + hulpstoffen + primaire verpakking) en anderzijds door de opslag- (bijvoorbeeld blootstelling aan licht en hoge temperatuur) en gebruikscondities (Jiskoot, 2008).

Omdat de meeste eiwitten via de parenterale route worden toegediend, moeten de hulpstoffen van de goede, constante farmaceutische kwaliteit zijn, waar mogelijk van Ph. Eur/USP kwaliteit, een laag kiemgetal hebben en endotoxinevrij zijn. Bij voorkeur dienen de hulpstoffen van synthetische origine te zijn of uit planten geïsoleerd en niet van menselijke (bijvoorbeeld humaan serumalbumine (HSA)) of dierlijke oorsprong. De laatstgenoemde hulpstoffen kunnen onder andere virussen in het proces introduceren. Overigens worden diverse eiwitgeneesmiddelen die nu op de markt zijn nog steeds gestabiliseerd met HSA.

Sommige therapeutische eiwitten zijn slecht oplosbaar in de formuleringsbuffers die voor parenterale toediening geschikt zijn. De oplosbaarheid wordt sterk bepaald door de pH van het medium, omdat eiwitten zure en basische aminozuurresiduën bevatten. Een pH waarbij het eiwit geladen is wordt meestal geprefereerd boven een pH waarbij het eiwit dicht bij het isoelektrisch punt is, omdat de netto lading van het eiwit dan bijna nul is en daardoor de oplosbaarheid in waterige media minimaal. Echter, een pH ver verwijderd van het isoelektrisch punt kan ontvouwing van het eiwit induceren omdat hooggeladen structuren binnen een eiwit elkaar afstoten. De keuze van de pH van een eiwitformulering is dus vaak een compromis.

De

Er v
deg
en v
tege
eiw

d.

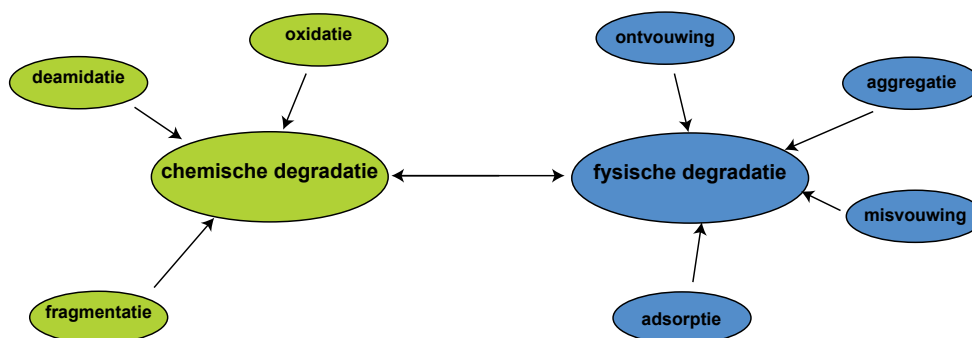
Fig

Fig

De stabiliteit van een eiwitgeneesmiddel hangt af van de vele factoren, waaronder:

- het type eiwit
- de eiwitconcentratie
- de formulering:
 - oplosmiddel (meestal water)
 - hulpstoffen (bijvoorbeeld surfactants, zouten, suikers)
 - pH
 - primaire verpakking (afmetingen en materiaal)
- opslagtemperatuur
- licht
- zuurstof
- metalen
- afschuifkrachten (bijvoorbeeld bij de productie of transport van het eiwit in vloeibare vorm)
- grensvlakken: vast-vloeibaar-gas

Er worden twee typen degradatie onderscheiden, te weten fysische en chemische degradatie (zie figuur 1). Fysische degradatie kan chemische degradatie induceren, en vice versa. In de praktijk treden combinaties van beide typen degradatie tegelijkertijd op, met als gevolg dat een eiwitformulering een heel scala aan eiwitdegradatieproducten kan bevatten.



Figuur 1. Eiwitdegradatie: chemische degradatie kan fysische instabiliteit induceren, en vice versa.

Een belangrijke categorie ontledingsproducten zijn eiwitaggregaten, zoals dimeren, oligomeren en grote, soms zichtbare aggregaten. Eiwitaggregatie is een verzamelnaam van processen die kunnen leiden tot de vorming van (on)oplosbare, (ir)reversibele, of (non-)covalente aggregaten. Binnen deze categorieën kan een aggregaat variëren in grootte (van oplosbare dimeren tot zichtbare fibrillen) en kan bestaan uit eiwitmoleculen in hun oorspronkelijke driedimensionale structuur of in een ontvouwen/misgevouwen structuur. Aggregaten zijn zeer ongewenst in het eindproduct, daar ze kunnen leiden tot afname van de effectiviteit, gewijzigde kinetiek, obstructie van bloedvaten en immunogeniciteit (Hermeling *et al.*, 2004).

Aggregatie is een ongecontroleerd proces dat tijdens de formulering, de opslag en/of het gebruik van het product kan optreden. Het kan onder andere veroorzaakt worden door pH-veranderingen (bijv. bij toevoeging van een eiwitformulering aan een infusievloeistof), fysieke krachten die op de eiwitmoleculen worden uitgeoefend (bijvoorbeeld schudden van het product), door interacties met de primaire verpakking (stopper, glaswand) en/of substanties (*leachables*) die daarvanuit in de formuleringsooplossing terechtkomen. Aggregatie begint veelal met de vorming van enkele kleine aggregaten, die als zogenaamde kernen (*nuclei*) fungeren voor de vorming van vele, grotere aggregaten. Verwoede pogingen worden er binnen de academische wereld en de farmaceutische industrie ondernomen om aggregatieprocessen te leren begrijpen, detecteren en voorkomen.

Keuze aan hulpstoffen

Men kan verschillende soorten hulpstoffen met ieder een eigen functie in eiwitformuleringen tegenkomen (zie tabel 1). Om de pH in de eiwitformulering op de gewenste waarde te behouden, worden buffers toegevoegd. Suikers en polymeren worden vaak toegevoegd ter stabilisatie van de natieve structuur van het eiwitmolecuul. Ook aminozuren zijn stabilisatoren van eiwitten, onder andere door verhoging van de oplosbaarheid. Om de eiwitformulering op de gewenste toniciteit te krijgen, vaak isotoon, kunnen zouten worden gebruikt. Ook suikers kunnen hiervoor worden ingezet.

Tabe

tyf
but

zo
ant
che
ine
det

sui

am
cor
eiv

Eiw
mo
de
inf
ver
(< 1
opp
bev
dez
wei
effe
Che
effe
var
con
neg
naa

Tabel 1. Gangbare hulpstoffen voor eiwitformuleringen

type hulpstof	functie van de hulpstof	voorbeelden
buffer	stabilisatie pH	Na/K-fosfaat, TRIS, histidine, NA-acetaat, Na-citraat, Na-carbonaat
zout	stabilisatie, toxiciteit	NaCl, KCl, MgCl ₂
antioxidant	voorkomen van oxidatie	methionine
chelator	wegvangen van metaalionen	EDTA
inert gas	voorkomen van oxidatie	stikstof, argon
detergens	verhoging oplosbaarheid; voorkomen adsorptie	polysorbaat 20, polysorbaat 80, Pluronic-KF-68, natriumlaurylsulfaat
suiker	stabilisatie (zowel voor eiwitten in oplossing als gevriesdroogd; bulking agent; toniciteit)	saccharose, mannitol, trehalose, maltose, hydroxyethylcellulose
aminozuur	stabilisatie	lysine, arginine
conserveermiddel	behoud van steriliteit	benzylalcohol, fenolen
eiwit	voorkomen van adsorptie	HSA

Eiwitten worden veelal in lage doses (0.1-100 mg/dosis) toegediend. Deze moleculen hebben de neiging om te adsorberen aan contactoppervlakken, zoals de wand van de primaire container of het toedieningssysteem (injectiespuit, infusielijn, catheter, en/of in-line filter). Adsorptie kan leiden tot een onacceptabel verlies van de toe te dienen dosis, met name als het gaat om laaggedoseerde (< 1 mg) eiwitten (bijvoorbeeld epoëtine, interferon, antigenen). Adsorptie aan oppervlakken kan tevens de trigger zijn voor aggregaatvorming. Om die reden bevatten sommige eiwitformuleringen surfactantia (bijvoorbeeld polysorbaat): deze adsorberen zelf aan grensvlakken en inhiberen zodoende de adsorptie van werkzame eiwitmoleculen. Hoge concentraties HSA hebben een vergelijkbaar effect.

Chelatoren worden soms toegepast om metaalionen te binden die een negatief effect kunnen hebben op de stabiliteit van het eiwit (bijvoorbeeld als katalysator van oxidatiereacties). Bij eiwitformuleringen voor meermalig gebruik is een conserveringsmiddel een vereiste. Aangezien veel conserveringsmiddelen een negatief effect hebben op de eiwitstructuur, is de keuze beperkt en is onderzoek naar de invloed van het conserveermiddel op de stabiliteit van het eiwit geboden.

Ditzelfde geldt voor het gebruik van anti-oxidanten in de eiwitformulering. Zo kan ascorbinezuur, een bekend anti-oxidans, in aanwezigheid van minime hoeveelheden metaalionen juist eiwitoxidatie veroorzaken. Om oxidatie tegen te gaan is het belangrijk om de headspace in de primaire verpakking beperkt te houden en te vullen met een inert gas.

Voor de meeste eiwitproducten is het streven om een houdbaarheidstermijn voor het product van minimaal 12-24 maanden in de koelkast te verkrijgen.

Omdat voor een behoorlijk aantal eiwitten een dergelijke termijn niet haalbaar is als vloeibare formulering, zijn voor veel eiwitgeneesmiddelen gevriesdroogde formuleringen ontwikkeld. Hiertoe dienen speciale stabilisatoren, lyoprotectantia, aan de formulering te worden toegevoegd. Deze hulpstoffen zorgen ervoor dat de eiwitstructuur behouden blijft tijdens het vriesdroogproces. Bulking agents worden veelal gebruikt als een kleine hoeveelheid eiwit gevriesdroogd moet worden.

Dergelijke hulpstoffen zorgen ervoor dat een vriesdroogproduct, de zogenaamde cake, wordt gevormd van voldoende grootte. De gevriesdroogde cake kan in een vloeistof (bijvoorbeeld steriel water of fysiologisch zout) gereconstitueerd worden, opdat het als injectie of infusie toegediend kan worden. In de gevriesdroogde toestand is zo'n eiwit vaak wel twee jaar stabiel in de koelkast of soms zelfs bij kamertemperatuur.

Tabel 2 geeft een overzicht van verschillende op de markt zijnde monoklonale antilichamen, een specifieke categorie eiwitproducten (Daugherty en Mrsny, 2006; Wang *et al*, 2007). Uit de tabel blijkt dat de formuleringen op zichzelf niet ingewikkeld zijn, maar elk eiwitproduct zijn eigen formulering behoeft, zelfs als de eiwitten tot dezelfde klasse behoren.

Tab
al, 20

ant
pro
Ort
OK
Sin

Syr

Rer

Hei

Rer

Hei

My

Car
1H;
Mil
Zev

Xol

Bex

Erb

^a voc

^b

^c ge'

^d toe

^e het

^f IV

^g IM

^h SC

Tabel 2. Voorbeelden van op de markt zijnde monoklonale antistoffen (naar Daugherty en Msrny, 2006; Wang et al, 2007)

antilchaam product	generische naam/omschrijving	toedieningsroute	concentratie in formulering	buffer/pH	hulpstoffen
Orthoclone	muronomab-CD3;	iv	1 mg/ml	Na-,K-fosfaat	NaCl, PS ^b -80
OKT3 [®]	muis IgG2a, anti-CD3			pH 7	
Simulect ^c	basiliximab; chimeer IgG, anti-CD25	iv	4 mg/ml	Na-,K-fosfaat glycine	NaCl, saccharose, mannitol, PS-80
Synagis [®]	palivizumab; humaan IgG1, anti-RSV	im	100 mg/ml	histidine; glycine	mannitol
Remicade [®]	infliximab; chimeer IgG1, anti-TNF α	iv	10 mg/ml	Na-fosfaat pH 7.2	saccharose, PS-80
Herceptin [®]	trastuzumab;	iv			
Remicade ^{® c}	infliximab; chimeer IgG1, anti-TNF α	IV	10 mg/ml	Na-fosfaat/pH 7.2	saccharose, PS-80
Herceptin [®]	trastuzumab; gehumaniseerd IgG1, anti-HER2	IV	21 mg/ml	histidine/pH 6	trehalose, PS-20, benzylalcohol ^d
Mylotarg [®]	gemtuzumab ozogamicine; gehumaniseerd IgG4, anti-CD33, immunotoxine	IV	4 mg/ml	Na-fosfaat	NaCl, saccharose, dextraan 40
Campath [®] -1H; Millennium	alemtuzumab; gehumaniseerd IgG1, anti-CD52	IV	onbekend-30 mg/flacon	Na-, K- fosfaat/pH 7	NaCl, KCl, NaEDTA, PS-80
Zevalin [®]	ibritumomab tiuxetan; muis IgG1, anti-CD20; radiogelabeld (⁹⁰ Y of ¹¹¹ In)	IV ^e	1.6 mg/ml	Na-acetaat, Na-, K-fosfaat/pH 7	NaCl, humaan serum albumine
Xolair ^{®c}	omalizumab; gehumaniseerd IgG1, anti-IgE	SC ^h	125 mg/ml	histidine	saccharose, PS-20
Bexxar [®]	tositumomab-I131; muis IgG2a, anti-CD20	IV	14 mg/ml	Na-fosfaat; pH 7.2	NaCl, maltose
Erbitux [®]	cetuximab; chimeer IgG1, anti-EGFR	IV	2 mg/ml	Na-fosfaat/pH 7.2	NaCl

^a voor sommige gevriesdroogde formuleringen wordt geen pH aangegeven na reconstitutie

^b PS = Polysorbaat

^c gevriesdroogd product, concentratie, pH-waarden etc. zijn verkregen na reconstitutie

^d toegevoegd als conserveermiddel bij product voor meermalig gebruik

^e het betreft hier een kit, waarvan de componenten vlak voor toediening met elkaar gemend worden

^f IV = Intraveneus

^g IM = Intramusculair

^h SC = Subcutaan

Zoals uit de bovenstaande opsomming blijkt, is het arsenaal aan de te kiezen hulpstoffen beperkt met als gevolg dat de mogelijkheden om een eiwitformulering te ontwikkelen en te optimaliseren niet onuitputtelijk zijn. Om tot een rationeel ontwerp van een stabiele eiwitformulering te komen, moet allereerst onderzoek worden gedaan naar de karakteristieken van het eiwit zelf, zoals de gevoeligheid voor temperatuur, licht, pH, zuurstof, buffertype, ionsterkte, eiwitconcentratie, schudden en afschuifkrachten, en invriezen. Voorts moeten de volgende zaken in ogenschouw worden genomen:

- gebruik zo min mogelijk verschillende hulpstoffen om tot een stabiele formulering te komen. Voeg niets toe wat niet nodig is;
- selecteer bij voorkeur hulpstoffen die reeds in op de markt zijnde producten verwerkt zijn (zie tabel 2). Immers, deze hulpstoffen zijn goedgekeurd door de autoriteiten. Indien nieuwe hulpstoffen verwerkt worden in het product, dient men een uitgebreid preklinisch onderzoek uit te voeren ter vaststelling van de veiligheid van de hulpstof. Dit kost veel geld en tijd;
- zorg ervoor dat de eindformulering zo mogelijk de vereiste toniciteit heeft;
- adresseer de specifieke eisen van het eiwit (zie hierboven). Zo dient men de pH zodanig te kiezen dat het eiwit geen of zo min mogelijk ontleding vertoont;
- de gekozen hulpstoffen of combinatie van hulpstoffen (bijvoorbeeld kant en klaar medium) moet passen binnen de grenzen van de octrooibeschermtng;
- aangezien men in de vroege fase van de ontwikkeling (pre-fase 1- en fase 1-onderzoek) vaak de exacte dosering(en) van het eiwitproduct nog niet weet, dient men een 'best guess' eiwitconcentratie of -concentraties te kiezen. De vereiste targetdosis wordt berekend op basis van relevant preklinisch/toxicologisch onderzoek;
- bepaal de toedieningsroute zo vroeg mogelijk in het ontwikkelingstraject;
- blijf bij het ontwikkelen van de formulering binnen de in de Ph. Eur. gestelde eisen, welke afhangen van toedieningsroute en toedieningsvorm.

Aangezien de uitkomsten van fase 1 en 2 (en soms zelfs fase 3) klinisch onderzoek kunnen leiden tot wijzigingen in de dosis/doses en/of de toedieningsroute, betekent dit vaak dat een nieuwe formulering ontwikkeld moet worden of dat tenminste de bestaande formulering aangepast dient te worden. Ook wijzigen

bec
Dit
wa:
stal
is. C
wo:
krit

Tabe

int
aa

afs

Or
ont
sta
var
gev
ter
wij

bedrijven soms de primaire verpakking gedurende het ontwikkelingstraject. Dit kan ook (grote) implicaties hebben voor de stabiliteit van het eiwitproduct, waardoor mogelijk de formulering aangepast dient te worden. Bovendien kan stabiliteitsonderzoek uitwijzen dat de gekozen formulering onvoldoende stabiel is. Ook in dat geval zal er uitgebreider formuleringsonderzoek gedaan moeten worden om de stabiliteit van het eiwit te verbeteren. Tabel 3 geeft een overzicht van kritische parameters die betrekking hebben op de stabiliteit van een eiwit.

Tabel 3: Factoren die bijdragen aan de eiwitstabiliteit

intramoleculair	omgeving
aantrekkingskrachten	oplosmiddel (water)
elektrostatische interacties	
waterstofbruggen	formulering/hulpstoffen
hydrofobe interacties	zie tabel 1
van der Waals interacties	
covalente bindingen (S-S-bruggen)	
afstotingskrachten	onzuiverheden (product en proces gerelateerd)
elektrostatische interacties	
sterische hindering	container/toedieningssysteem
	flacon, injectiespuit
	stopper
	in-line filter
	infuuslijn
	infuuszak
	lucht

Om de gevolgen van mogelijke (formulerings)wijzigingen gedurende het ontwikkelingstraject in te kunnen schatten, is het zaak om in een vroeg stadium zoveel mogelijk informatie over het eiwit te verzamelen door middel van preformuleringsonderzoek. Door een goede kennis van het eiwit en de gevoeligheid voor variatie in bijvoorbeeld pH, concentratie, excipiënten, temperatuurfluctuaties en schudden, kunnen eventueel noodzakelijke latere wijzigingen in de formulering relatief snel doorgevoerd worden.

Tabel 4. Analysemethoden voor biochemische en biofysische karakterisatie, batch- batch vergelijking, vrijgifte en stabiliteitsonderzoek

assay	parameter	karakterisatie ^f	batch vergelijking ^f	vrijgifte analyse ^g	stabiliteitsonderzoek ^g
Bioassay (<i>in-vitro</i> of <i>in-vivo</i>)	potency	+	+	+	+
SDS-PAGE ^a (reduced & non-reduced)	zuiverheid & identiteit	+	+	+	+
SE-HPLC ^b	zuiverheid & identiteit	+	+	+	+
ongewenste eiwitten afkomstig uit cel die therap. eiwit produceert	zuiverheid	+	+		
N-terminal sequencing	primaire structuur	+	+		
peptide mapping	primaire structuur; post translatie modificaties	+	+		
oligosaccharide mapping	oligosaccharide heterogeniteit	+	+		
iso electric focusing		+	+	+	+
IE-HPLC ^c		+	+		
moleculaire massa	intacte moleculaire massa heterogeniteit	+	+		
circulair dichroïsme	secundaire en tertiaire structuur	+	+		
DSC ^d		+	+		
SV-AUC ^e	grootte, zelf-associatie van eiwit	+	+		
kiemgetal ^h	"veiligheid" (microbiële contaminatie)				
endotoxine	"veiligheid" (bacteriële endotoxine)			+	+
steriliteit	"veiligheid"			+	+
product specifieke identiteitstest	identiteit			+	
ultra violet absorptie meting bij 280nm	eiwitconcentratie			+	+
visuele inspectie van de primaire verpakking	-			+	+
visuele inspectie van de oplossing (kleur)	-			+	+
pH	-			+	+
omsolaliteit	-			+	
max. volume die uit primaire verpakking kan worden gehaald	-			+	+
turbiditeit	zuiverheid			+	+
partikels ((sub)visueel)	zuiverheid			+	+

^a SD
^b SE
^c IE
^d DS
^e SV
^f ge
^g ge
^h kie

Ka

De

nie

kw

con

kw

var

kar

Voc

het

het

fun

var

doc

nat

aan

dae

Div

info

mo

Doc

wo

exa

te h

chr

^aSDS-PAGE = Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

^bSE-HPLC = Hoge druk gelpermeatiechromatografie

^cIE HPLC = Isoelectrische focussing hoge druk chromatografie

^dDSC = Differentiële Scanning Calorimetrie

^eSV-AUC = Sedimentatie Snelheid Analytische Ultracentrifugatie

^fgemeten op het eiwit als actieve grondstof

^ggemeten op eiwit als vloeibaar eindproduct

^hkiemgetal wordt alleen in-proces getest.

Karakterisatie van therapeutische eiwitten

De complexe structuur van een eiwitmolecuul en de stabiliteit ervan, is helaas niet met één of enkele analysemethoden te 'vangen'. Ter beoordeling van de kwaliteit en stabiliteit van een eiwitgeneesmiddel dient een heel scala aan complementaire analysemethoden te worden toegepast. Bovendien dienen kwaliteitstesten voor parenteralia uitgevoerd te worden. Tabel 4 geeft een overzicht van analysemethoden die worden ingezet voor de verschillende doeleinden: karakterisatie, batch-batch vergelijking, vrijgifte en stabiliteitsonderzoek.

Voor de ontwikkeling van de eerste eiwitgeneesmiddelen werd de kwaliteit van het product bepaald middels *in-vivo* bio-assays (*potency assays*), zoals bijvoorbeeld het verlagen van de bloedsuikerspiegel na inspuiting van insuline bij konijnen. De functionele activiteit van het eiwit kan ook worden bepaald door gebruik te maken van *in-vitro* bio-assays (eveneens *potency assays* genoemd), zoals bijvoorbeeld door het testen van T-cel activatie door cytokines. *Potency assays* zijn echter niet nauwkeurig genoeg om kleine veranderingen in de activiteit van het eiwitproduct aan te geven en verschaffen geen informatie over de ontledingsreacties welke daaraan ten grondslag liggen.

Diverse analysetechnieken (zie tabel 4) worden ingezet om zoveel mogelijk informatie te verkrijgen over de structuur van het eiwit. Zo kan het molecuulgewicht van het eiwit grofweg worden vastgesteld met *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE). Tegenwoordig worden ook gecombineerde technieken, zoals HPLC-MS, gebruikt om het exacte molecuulgewicht en andere structureigenschappen van eiwitten op te helderen. Hoge druk gelpermeatiechromatografie (ook wel *size-exclusion chromatography*, SE-HPLC) is een methode die gebruikt wordt om de grootte van

het eiwit (hydrodynamische straal) te bepalen. Isoelectrische focussing (IEF) wordt toegepast voor de bepaling van het iso-elektrische punt van het eiwit. Reversed Phase Hoge Druk Vloeistof Chromatografie (RP-HPLC) wordt toegepast voor concentratiebepaling en vaststelling van chemische ontleding (bijvoorbeeld deamidatie en oxidatie). Bepaling van de eiwitconcentratie wordt ook vaak met Ultra-Violet (UV) absorptiemetingen gedaan. Informatie over de driedimensionale structuur van een eiwit wordt verkregen met behulp van spectroscopische technieken zoals fluorescentie, infrarood spectroscopie en circulair dichroïsme (CD). Een andere relevante test is de test op mogelijk aanwezige (visuele en subvisuele) partikels in het product. Dergelijke partikels kunnen afkomstig zijn uit het proces (glas- of metaaldeeltjes bijvoorbeeld) of product (grote aggregaten). Voor het bepalen van de eventueel aanwezige visuele partikels wordt een visuele inspectie uitgevoerd (kijken naar container tegen een zwarte of witte achtergrond onder fluorescerend licht). Voor de subvisuele inspectie wordt een licht-obscuratiemethode toegepast, waarbij het aantal deeltjes $\geq 10 \mu\text{m}$ en $\geq 25 \mu\text{m}$ wordt geteld (zie Ph. Eur.). Ook wordt de turbiditeit van een eiwitoplossing bepaald met behulp van een turbidimeter (zie Ph. Eur.). Een hoge turbiditeit kan een aanwijzing zijn voor de aanwezigheid van aggregaten in het eiwitproduct.

Naast analysemethodes die gericht zijn op de karakterisering van de eiwitstructuur, wordt het eiwit als actieve grondstof uitgebreid getest op onzuiverheden. Afhankelijk van de gebruikte cellijn voor de productie van het eiwit alsmede grondstoffen van humane of dierlijke oorsprong (bijvoorbeeld HSA (excipiënt), foetaal kalfserum (gebruikt in celkweekmedium)), worden er assays ingezet om verschillende type virussen te testen. Ook wordt de actieve grondstof getest op andere onzuiverheden die gerelateerd zijn aan het productieproces, zoals eiwit en DNA, afkomstig uit de cel waarin het eiwit gemaakt is. Tevens wordt het eiwit als active grondstof getest op de aanwezigheid van mycoplasma. Het eindproduct wordt getest op steriliteit en afwezigheid van endotoxinen (lipopolysacchariden ; LPS).

Mag het analyseren van een intact eiwit al geen sinecure zijn, zodra het eiwit begint te ontleden neemt de complexiteit enorm toe. Neem bijvoorbeeld het analyseren van eiwitaggregaten, een subcategorie van ontledingsproducten. Er kunnen verschillende soorten aggregaten, vaak in zeer lage concentraties, in het product aanwezig zijn, wat het product heterogeen maakt. Tevens kunnen

de l
het
zee
ana
mo
con
HP
ma
slec
(FF
tegi
te k
bep
var
ges
Het
wo:
doe
me
ing
Ecl
kar

Tot
All
aan
stru
me
afw
hoe
De:
in c
bre

de hulpstoffen in het eiwitproduct de detectie van aggregaten verstoren. Indien het eiwit 'verpakt' is in een 'controlled' of 'sustained' afgiftesysteem, of in een zeer lage concentratie in een infusiepreparaat zit (0.01-1 mg/ml), wordt de analyse van de aggregaten nog moeilijker. Daar geen enkele analysetechniek alle mogelijke aggregaten kan detecteren, dienen voor de detectie van aggregaten complementaire technieken ingezet te worden. Bijvoorbeeld, SDS-PAGE en SE-HPLC zijn weliswaar waardevolle technieken voor de analyse van aggregaten, maar SDS-PAGE detecteert alleen covalente aggregaten en SE-HPLC meet slechts oplosbare aggregaten. Andere technieken zoals field-flow-fractionering (FFF), analytische ultracentrifugatie en lichtverstrooiingstechnieken worden tegenwoordig steeds vaker gebruikt als additionele methoden om aggregaten te karakteriseren. Echter, ook deze methoden hebben allemaal hun specifieke beperkingen, zijn duur in de aanschaf en vereisen specialisten voor de bediening van de apparatuur en interpretatie van de data. Derhalve zijn ze vooralsnog niet geschikt voor routine-analyses (vrijgifte van batches en stabiliteitsstudies). Het moge duidelijk zijn dat een heel palet aan analysetechnieken ingezet dient te worden om biofarmaca te kunnen karakteriseren, de vrijgifteanalyse te kunnen doen en om batches die wijzigingen in het productieproces hebben ondergaan, met elkaar te kunnen vergelijken. Een subset aan vrijgifteanalysetechnieken wordt ingezet om de stabiliteit van het eiwitproduct gedurende opslag te kunnen meten. Echter, het is nog steeds niet mogelijk om complexe eiwitmoleculen volledig te karakteriseren.

Tot slot

Alhoewel het tegenwoordig mogelijk is om met een uitgebreid pakket aan analysetechnieken eiwitten te kunnen analyseren op verschillende structuurniveau's, blijft de hamvraag: welke aspecten van het eiwit zijn het meest relevant voor de veiligheid en effectiviteit van het eindproduct? Welke afwijkingen van de *native* eiwitstructuur hebben klinische consequenties? Welke hoeveelheden aan proces- en product-gerelateerde onzuiverheden zijn acceptabel? Deze en andere vragen zijn moeilijk te beantwoorden, maar uiterst relevant in de beslissingsprocessen tijdens de ontwikkeling van een eiwitproduct in de breedste zin van het woord: de farmaceutische ontwikkeling van het eiwit vanaf

cellijnniveau tot en met toediening van het eiwitproduct aan de mens, de te kiezen diermodellen en de opzet van klinische studies en interpretatie van de uitkomsten. Men dient zich te realiseren dat allerlei beslissingen worden genomen op basis van wat men meet, dus weet. Zo worden productspecificaties (bijvoorbeeld acceptabel aggregatieniveau in het eindproduct) hoofdzakelijk bepaald door de haalbaarheid in het productie/zuiveringsproces en enigszins door de technische mogelijkheden van de gebruikte analyseapparatuur, maar niet door klinische relevantie, dat wil zeggen de biologische effecten en bijwerkingen. Het blijft dan ook voorsnog een enorme uitdaging om bijvoorbeeld relevante verschillen tussen productbatches te kunnen identificeren, door de analytische parameters te correleren aan de biologische effecten in diermodellen die een voorspellende waarde hebben voor de mens.

Een andere zeer relevante maar nog steeds onbeantwoorde vraag is: wat gebeurt er met het eiwit in het lichaam, na toediening? Men kan een perfecte eiwitformulering hebben ontwikkeld die stabiel is in de flacon of spuit, maar na toediening tot aggregatie leidt, omdat het eiwit daar in een ander milieu terecht komt.

De huidige eiwitproducten bestaan vrijwel allemaal uit een waterige oplossing met wat hulpstoffen (of een gevriesdroogde versie daarvan). Dit zou kunnen suggereren dat het formuleren van eiwitten weinig voorstelt, maar niets is minder waar: elk eiwit behoeft een specifieke formulering. De weg hiernaartoe vereist uitgebreid formuleringsonderzoek dat alleen kan plaatsvinden op geleide van een gedetailleerde structurele analyse van eiwitten. Op deze manier kan er inzicht verkregen worden in de karakteristieken van het eiwitproduct, zodat een rationele keuze van de formulering kan worden gemaakt, om daarmee de stabiliteit van het product gedurende de productie, opslag, transport en het gebruik te kunnen garanderen.

Rel
Da
the
He
imr
Jisl
Col
Jisl
29.
Wa
anc

Acl
Crc
Shi
Pha

Crc
con
16.

Jisl
Pha

Crc
con
Sin

Referenties

- Daugherty AL en Mersny R.** Formulation and delivery for monoclonal antibody therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 2006; 58: 686-706.
- Hermeling S, Crommelin DJA, Schellekens H, en Jiskoot W.** Structure-immunogenicity relationships of therapeutic proteins. *Pharm Res* 2004; 21: 897-903.
- Jiskoot W.** Presentatievormen en Toedieningsroutes voor vaccins. Anselmus Colloquium Vaccins in Beweging ISBN 90-73520-12-6 2000; 32-52.
- Jiskoot W.** Biofarmaca niet schudden voor gebruik. *Pharm Weekbl* 2008; 143(4): 26-29.
- Wang W, Singh S, Zeng DL, King K en Nema S.** Antibody structure, instability, and formulation. *J Pharm Sci* 2007; 96: 1-26.

Achtergrondliteratuur

- Crommelin DJA, Storm G, Verrijck R, de Leede L, Jiskoot W, en Hennink WE.** Shifting paradigms: biopharmaceuticals versus low molecular weight drugs. *Int J Pharm* 2003; 266: 3-16.
- Crommelin, DJA en Jiskoot W.** What makes protein drugs different? Some considerations on shifting paradigms in pharmac. *Eur J Hosp Pharm* 2006; 12: 14-16.
- Jiskoot W en Crommelin DJA.** What makes protein drugs different? Pharmaceutical aspects. *Eur J Hosp Pharm* 2006; 12: 20-21-1.
- Crommelin DJA.** Formulation of biotech products, including biopharmaceutical considerations. In: *Pharmaceutical Biotechnology*, 3rd edition (DJA Crommelin, RD Sindelar, and B Meibohm, Eds.), Informa Healthcare, London, 2007; 67-94.

DR R VERRIJK



Ruud Verrijk is meer dan 20 jaar werkzaam in de ontwikkeling van geneesmiddelen. De farmaceutische analyse loopt als een rode draad door zijn carrière. Bij de Universiteit van Amsterdam zijn in samenwerking met de Jellinek-kliniek en het RIVM immunochemische methoden voor de detectie van drugs in verslaafden opgezet. Het promotieonderzoek naar cardiovasculaire eigenschappen van PDE-remmers werd uitgevoerd in Amsterdam en Utrecht en afgerond in 1989. In de vijf volgende jaren deed hij onderzoek naar targetingsystemen voor cytostatica en radiochemische precursors in samenwerking met ECN in Petten. Na een tweejarig dienstverband met Solvay in Weesp bij Farmaceutische Analyse is hij in 1995 gaan werken bij OctoPlus als manager analytische chemie. Sinds 2001 richt hij zich bij OctoPlus als principal scientist op de ontwikkeling van biotech producten met een gecontroleerde afgifte op basis van polymere systemen.

TO
sli

R V

Inl

Bio
gro
ont
en t
kor
me
Tot
toe

Ins

Bij
toe
op
nas
200
Beg
doc
ver
slec
de
Het
de
ten
te g
van
bov
Clin
mo
kos

TOEDIENING VAN BIOFARMACA slikken, snuiven of toch maar spuiten?

R Verrijck (presentatie), D Deken en B Kremer

Inleiding

Biofarmaca, zoals eiwitten, antilichamen en vaccins zijn complexe moleculen met grote uitdagingen op het gebied van de toedieningsvorm. In dit artikel zullen de ontwikkelingen rondom insuline en vaccins op het gebied van toedieningsvorm en toedieningsroute worden besproken. Vervolgens zullen polymeren aan de orde komen die de toepassing van biofarmaca kunnen helpen door het gebruik van meer geavanceerde toedieningsvormen gebaseerd op micro- en nanotechnologie. Tot slot wordt de productontwikkeling van een geavanceerde nieuwe toedieningsvorm behandeld.

Insuline

Bij eiwitten is veel onderzoek gedaan naar het vervangen van een injectie door het toedienen via andere wegen dan injectie. Een van de eiwitten waarbij veel onderzoek op dit gebied is gedaan is insuline. Zo kijkt men onder andere naar het oraal, buccaal, nasaal, pulmonaal, rectaal en transdermaal toedienen van insuline (Khafagy *et al* 2007).

Begin 2006 werd Exubera[®], een pulmonale versie van insuline, op de markt gebracht door Pfizer. Echter, in oktober 2007 werd besloten alweer te stoppen met het vermarkten van dit produkt. In de eerste 9 maanden van 2007 genereerde het product slechts 12 miljoen dollar aan inkomsten. De verwachting voordat het product op de markt kwam, was dat de piekinkomsten \approx 2 miljard dollar per jaar zouden zijn. Het commercieel falen van het product heeft verschillende oorzaken. Zo bleken de patiënten de inhalator te groot te vinden (ongeveer de afmetingen van een blik tennisballen), waardoor ze zich niet comfortabel voelden om deze in het openbaar te gebruiken. Daarnaast wordt Exubera[®] in verband gebracht met een kleine afname van de longfunctie, een verhoogde incidentie van longkanker en was het product bovendien twee keer zo duur als een injectie. Het *National Institute for Health and Clinical Excellence* (NICE), verantwoordelijk voor het bepalen of medicijnen vergoed moeten worden in Engeland en Wales, bepaalde dat het gebruik van Exubera[®] niet kosten-effectief was en dat daarom Exubera[®] alleen werd vergoed aan patiënten bij

wie door een psychiater of psycholoog injectie-angst was vastgesteld. Daarnaast moesten de meeste gebruikers nog steeds basaal insuline blijven spuiten. Doordat Pfizer is gestopt met het vermarkten van Exubera[®], zijn patiënten met type I-diabetes nog steeds aangewezen op het injecteren van insuline. Naast Exubera[®] waren er nog meer inhaleerbare versies van insuline in ontwikkeling. Echter, ondanks dat deze bedrijven (Aradigm in samenwerking met Novo Nordisk en Alkermes in samenwerking met Eli Lilly) kleinere, simpelere inhalatoren in ontwikkeling hadden, werd de ontwikkeling van deze producten ook vanwege commerciële redenen gestopt. Mannkind is op dit moment nog het enige bedrijf met een inhaleerbare versie van insuline in een fase 3 klinische ontwikkeling.

Twee alternatieve toedieningswegen van insuline die in vergevorderde klinische ontwikkeling zijn, zijn de orale en intranasale toediening. Een orale/buccale versie van insuline, Oral-lyn[®], is momenteel op de markt in India en Ecuador en is in fase 3 klinisch onderzoek in Europa en de Verenigde Staten. Bij Oral-lyn[®] wordt insuline als een aerosol in de mond gespoten.

Het verst gevorderde intranasale product is het product van Nastech dat momenteel in fase 2 klinische ontwikkeling is. Nastech heeft echter besloten om zich volledig op het ontwikkelen van producten op basis van RNA-interference (RNAi) te richten en te stoppen met de verdere ontwikkeling van de intranasale producten.

Ondanks dat er een paar producten die niet geïnjecteerd hoeven te worden op de markt of in late fase klinische ontwikkeling zijn, lijkt het dat de meeste diabetespatiënten voorlopig nog niet onder het injecteren uitkomen.

Vaccins

Een ideaal vaccin is veilig, kosten-effectief en biedt bescherming na één enkele dosis. De manier waarop een vaccin wordt gepresenteerd en toegediend kan aanzienlijke invloed hebben vanwege de efficiëntie van de procedure, de benodigde dosis, compliance en veiligheid. Nagenoeg alle huidige vaccins op de markt worden via injectie, (intramusculair, subcutaan of intradermaal) toegediend, en de vaccinatie bestaat uit meerdere doses. Uitzonderingen hierop zijn het intranasale influenzavaccin FluMist[®], en de orale vaccins voor polio (Orimune[®]), cholera (Orochol[®]/Dukoral[®]), gastro-enteritis (Rotarix[®]/Rotateq[®]) en buiktyfus (Vivotif[®]). De bovengenoemde mucosale vaccins zijn gebaseerd op levende verzwakte ('geattenueerde') organismen,

met uitzondering van Dukoral[®], dat gebaseerd is op gedode bacteriën.

De orale producten worden op verschillende manieren toegediend. Rotarix[®] en Rotateq[®] worden via een injectiespuitje oraal gegeven, Dukoral[®] wordt in een glas water klaargemaakt en kan vervolgens opgedronken worden en Vivotif[®] wordt als capsule geslikt. Het via een verstuiver intranasaal toegediende FluMist[®] kwam in 2003 in de Verenigde Staten op de markt. Ondanks hoge verwachtingen heeft dit vaccin tot op heden nog geen groot aandeel op de vaccinmarkt kunnen veroveren. Aanwijsbare oorzaken waren de logistieke uitdaging van transport en opslag bij -15°C en de relatief hoge prijs. Bovendien was het tot voor kort alleen goedgekeurd voor personen in de leeftijdscategorie 5-49 jaar, terwijl juist jonge kinderen en ouderen de grootste markt vormen. Recent heeft de fabrikant de formulering veranderd, waardoor het tegenwoordig in de koelkast bewaard kan worden. Bovendien is FluMist[®] sinds september vorig jaar ook goedgekeurd voor kinderen tussen 2 en 4 jaar en is de prijs van FluMist[®] sterk gereduceerd, waardoor het nu nog maar weinig duurder is dan een injectie. FluMist[®] zal mogelijk volgend jaar ook in Europa op de markt komen.

Als we de verschillende toedieningsroutes van vaccins met elkaar vergelijken, levert dat geen absolute winnaar op (zie tabel 1).

Tabel 1. Voor- en nadelen van nasale en orale toediening versus parenterale toediening van vaccins (op basis van Ryan et al, 2001).

	parenteraal	nasaal	oraal
toediening	injectie-geschoold personeel nodig	toedieningsapparaat en instructie noodzakelijk	drank/capsule
risico toediening	besmetting met bloed-overdraagbare ziekten	minimaal	minimaal
afgiftesysteem/ adjuvant	alum adjuvant	mucosaal adjuvant	sterk mucosaal adjuvant
antigeen dosis	laag	medium - door korte interactietijd	hoog - door afbraak en slechte absorptie
immuun respons	systemisch	mucosaal, systemisch	mucosaal, systemisch
bescherming	bewezen in dier en mens	bewezen in diermodellen en geregistreerd product	bewezen voor geregistreerde vaccins
klinisch gebruik	veel toegepast	beperkt aantal klinische trials- 1 geregistreerd produkt	beperkt aantal klinische trials- enkele geregistreerde produkten
veiligheid	beperkte bijwerkingen met name bij geattenueerde en geïnactiveerde vaccins	associatie met transport naar zenuwstelsel	veilig

Vaccinatie via de mucosale route heeft als voordeel ten opzichte van een injectie, dat niet alleen een systemische maar ook mucosale immuunrespons wordt opgewekt, die de eerstelijnsbescherming kan bieden tegen ziekten die via de mucosale oppervlakten het lichaam binnenkomen (Neutra en Kozlowski, 2006). Bovendien is er minimaal risico voor patiënt en behandelaar op prikongelukken en besmetting met bloedoverdraagbare infectieziekten als AIDS en hepatitis, en kan de immunisatie worden uitgevoerd door beperkt getraind medisch personeel. Dit geeft praktische en kostentechnische voordelen, met name bij massavaccinatie in ontwikkelingslanden. Anderzijds kleven er ook nadelen aan deze toedieningsroutes. De levende vaccins hebben als risico dat ze reverteren naar ziekteverwekkers, zoals is aangetoond voor het orale poliovaccin. Bovendien zijn er verschillende uitdagingen, zoals voor de orale toedieningsroute vanwege slechte absorptie, en afbraak in het maagdarmkanaal, en bij intranasale toediening vanwege de snelle klaring. Hierdoor is de benodigde antigeendosis om tot bescherming te komen veel hoger dan voor geïnjecteerde vaccins (Mitragotri, 2005). Daarnaast zijn er nog geen goedgekeurde, sterke adjuvantia voor toepassing in combinatie met deze vaccins. Tot slot zijn de vaccins die via alternatieve toedieningsroutes worden gegeven vaak duurder dan vaccins die via injecties worden gegeven. Er zal daarom door middel van kosteneffectiviteitsstudies bepaald moeten worden of met deze extra kosten de baten nog wel tegen de kosten opwegen. Hoewel er vanuit de WHO hoge prioriteit aan de ontwikkeling van niet-invasieve toedieningsvormen wordt gegeven, zijn de te nemen obstakels voor alternatieve toedieningsroutes van vaccins nog dermate groot dat de komende jaren niet kan worden verwacht dat vaccinproducenten volledig afstappen van de ontwikkeling van parenterale vaccins (Levine, 2003).

De uitdagingen op vaccingebied

De afgelopen decennia hebben wetenschappelijke ontwikkelingen plaatsgevonden waardoor de komende jaren een groeiend aantal vaccins op de markt verwacht wordt, en die in vaccinatieprogramma's moeten worden ingepast (Plotkin, 2005). Daarbij komt dat door het beschikbaar komen van complete genoomsequenties nieuwe antigeen-targets van micro-organismen kunnen worden geïdentificeerd op basis van *in silico* analyse (Rappuoli, 2004). Het inpassen van nieuwe vaccinaties

in c
mo
10 i
ook

injec
injec
voor
risic
injec

*Fig
Hib:
Pne*

Ver
voc
gev
zoa
vac
het
voc
con
per
inje
zoa
vrij
pol
alte
Het
ste
dre
tege
een
naa
De

in de reeds overvolle vaccinatieprogramma's wordt een grote uitdaging. Op dit moment omvat het Nederlandse Rijks Vaccinatie Programma (RVP) al minimaal 10 injecties gedurende de eerste 14 levensmaanden van een kind (zie figuur 1) (zie ook de RVP-website).

	0-48 uur *	2 maanden	3 maanden	4 maanden	11 maanden	14 maanden	4 jaar	9 jaar
injectie 1		DKTB-Hib	DKTB-Hib	DKTB-Hib	DKTB-Hib	BMR	DKTP	DTP
injectie 1 voor hepatitis B risicokinderen	HepB	DKTB-Hib -HepB	DKTB-Hib -HepB	DKTB-Hib -HepB	DKTB-Hib -HepB	BMR	DKTP	DTP
injectie 2		Pneu	Pneu	Pneu	Pneu	MenC		BMR

Figuur 1. Schematisch overzicht van het huidige RVP in Nederland. DKTP: Difterie-Kinkhoest-Tetanus-Polio; Hib: Haemophilus influenza b; BMR: Bof-Mazelen-Rode Hond; HepB: Hepatitis B; DTP: Difterie- Tetanus-Polio; Pneu: Pneumokokken; MenC: Meningokokken C.

Verdere uitbreiding van het aantal injecties stuit op weerstand door de vrees voor verminderde publieke acceptatie en immunologische 'overbelasting' van de gevaccineerden. Mogelijke oplossingen zijn het ontwikkelen van combinatievaccins zoals de difterie-kinkhoest-tetanus-polio (DKTP)-vaccins, waarin verschillende vaccins in één injectie worden gecombineerd. De grote uitdaging hierbij is het waarborgen van voldoende antilichaamrespons tegen alle vaccins, en het voorkomen van immunodominantie van een of meerder componenten van de combinatie. Een alternatieve oplossing is het reduceren van het aantal injecties per vaccin door het combineren van de prime en booster injecties in één enkele injectie. Hierbij kan gebruik worden gemaakt van vertraagde afgifte systemen, zoals biodegradeerbare microsferen die de *booster* doses na een bepaalde periode vrijgeven (O'Hagan en Rappuoli, 2004; zie ook later in dit hoofdstuk over polymeren). Tot slot kan de oplossing ook worden gezocht in het ontwikkelen van alternatieve, niet-invasieve toedieningsroutes.

Het succes van vaccinatie heeft met zich meegebracht dat de publieke opinie steeds meer gericht is op de veiligheid van vaccins. Met het verminderen van de dreiging van infectieziekten met name in de westerse wereld groeit de weerstand tegen vaccinatie en krijgen aspecten zoals naaldfobie en de veiligheid van vaccins een grotere invloed op de publieke acceptatie. In dit kader is de ontwikkeling van naaldvrije vaccinatiemethoden hoog op de prioriteitenlijst van het WHO geplaatst. De meeste vaccins op de markt zijn op basis van levende geattenueerde

organismen, gedode organismen of geïnactiveerde toxinen, zogenoemde toxoïden. De levende vaccins induceren een sterke antilichaamrespons en cellulaire immuunrespons, en hebben meestal maar één enkele injectie nodig voor een volledige immuunrespons. Het nadeel is het risico van terugkomen van virulentie en de instabiliteit van het product. Vaccins met gedode organismen en toxoïden zijn veiliger, maar ook minder immunogeen, en hebben daarom meerdere doses nodig (Plotkin en Plotkin, 2004). Meer recente ontwikkelingen hebben geleid tot de ontwikkeling van DNA en subunit vaccins, gebaseerd op individuele zuivere antigenen die volledig gescheiden zijn van de oorspronkelijke ziekteverwekker. Deze vaccinkandidaten hebben als voordeel dat ze veilig zijn vanwege het niet-virulent kunnen worden en het afwezig zijn van contaminanten van het originele pathogene organisme. Bovendien kunnen ze in grote, goed gedefinieerde hoeveelheden geproduceerd worden. De zuiverheid van deze vaccins brengt echter met zich mee dat ze zwak immunogeen zijn. Derhalve is er behoefte aan goede immunopotentiators, de adjuvantia, en aan betere afgiftesystemen. Door DNA en subunitvaccins in afgiftesystemen in te kapselen, worden het weer deeltjes die door daarvoor gespecialiseerde cellen kunnen worden opgenomen. Hierdoor kan een immuunrespons worden geïnduceerd (Peek *et al*, 2008).

Vaccininnovatie

Met de renaissance van vaccin-R&D die momenteel plaats vindt, zijn er vele innovaties die een bijdrage leveren aan betere en veiligere vaccins. Hieronder zullen op basis van de huidige status van vaccin-R&D enkele veelbelovende ontwikkelingen op het gebied van microsfeer- en nanopartikel-technologie worden toegelicht die bij kunnen dragen aan het overzien van de verschillende uitdagingen.

Sputen en prikken

Voor geïnjecteerde vaccins (intramusculair, subcutaan of intradermaal), kunnen polymere afgiftesystemen op twee manieren leiden tot verbeterde producten. Allereerst kan door het toepassen van microsfeer-technologie in 'single-shot'-vaccins een reductie van het aantal injecties tot stand worden gebracht. Daarnaast kan de micro- of nanopartikel-technologie gebruikt worden om oplosbare

ant
het

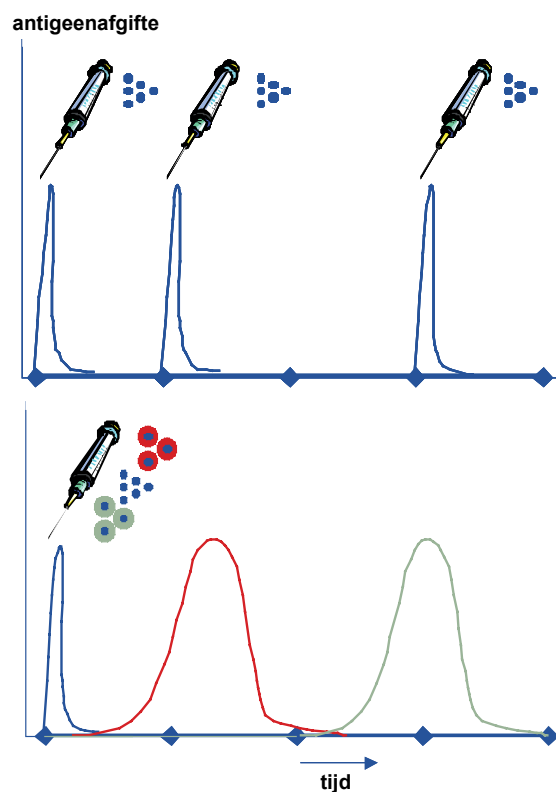
Sin
Het
een
van
boo
Hie
de
de
deg
pri

*Fig
die i
in ée*

antigenen en DNA-vaccins tot deeltjes te maken die herkend kunnen worden door het immuunsysteem.

Single-shot-vaccins

Het terugbrengen van het aantal injecties om tot goede bescherming te komen, is een goede aanpak tegen de drukte in vaccinatieprogramma's en het verbeteren van therapietrouw. Een manier om dat te bereiken is door het nabootsen van *booster*injecties door geprogrammeerde afgifte van antigeen uit micropartikels. Hierbij wordt antigeen ingekapseld in microsferen die als depot fungeren. Tijdens de degradatie van de polymere systemen komt na verloop van tijd antigeen vrij dat de boosterinjectie representeert. Door het mixen van microsferen met verschillende degradatieprofielen met vrij antigeen kunnen meerdere boosterinjecties na de primedosis nagebootst worden (zie figuur 2).

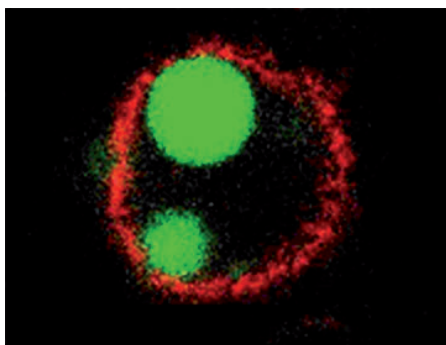


Figuur 2. Schematische presentatie van het principe van een single-shot-vaccin. Door bijmenging van microsferen die in de tijd geprogrammeerd het antigeen afgeven, kunnen twee opeenvolgende boosterinjecties worden gerealiseerd in één injectie.

Dit concept is al begin jaren '90 getest met polymere afgiftesystemen (O'Hagan *et al*, 1991). Echter, de stabiliteit van de antigenen is beperkt door blootstelling aan organische oplosmiddelen tijdens het formuleringsproces en door het optreden van verzuring tijdens de degradatie van de polymere systemen. Deze beperking heeft er toe bijgedragen dat nog geen single-shot vaccins getest zijn in klinische studies. Zeer recent heeft deze aanpak hernieuwde aandacht gekregen door het beschikbaar komen van innovatieve polymere technologieën (zie hoofdstuk polymeren).

Opname door APC

Subunit vaccins op basis van een of enkele eiwitten hebben als nieuwe uitdaging om de van nature zwakke immunogeniciteit van deze antigenen te versterken. Het immuunsysteem is er op gericht om pathogene virussen (50-200 nm) en bacteriën (~1µm) onschadelijk te maken (Peek *et al*, 2008). Een mogelijke toepassing van polymere systemen is dan om het antigeen te presenteren als een deeltje (partikel), door de antigenen in een partikel in te kapselen of door het antigeen aan het oppervlak van partikels te koppelen. Diverse studies hebben laten zien dat specifieke cellen van het immuunsysteem, de antigeen presenterende cellen (APC's) zoals dendritische cellen (DC) en Langerhans-cellen, partikels kleiner dan 5-10 µm opnemen (zie figuur 3), de antigenen verwerken en vervolgens presenteren aan andere cellen van het immuunsysteem voor een adequate bescherming (O'Hagan en Rappuoli, 2004).



Figuur 3. Opname van partikels door een dendritische cel. Groen gelabelde deeltjes met een maximum diameter van 5 µm worden door middel van confocale laser microscopie aangetoond binnen een rood gelabelde dendritische cel.

Een studie met antigenen van *Neisseria meningitidis*, een bacterie die hersenvliesontsteking veroorzaakt, laat zien dat deze aanpak veelbelovend is. Bij dit experiment werd het antigeen geadsorbeerd aan het oppervlak van polymeerpartikels kleiner dan 10 µm (Singh *et al*, 2004).

Sn
Het
wa
tot
ma
Bel
int
opp
en
ge
eiv
toe
om
gea
zoa
bijv
nas
Zw
Als
vee
vel
gev
ver
zur
dar
op
jare
het
rou
et a
toe
Ho
dat
int
het

Snuiven en slikken

Het lichaam kent mucosale oppervlakten via welke immunisatie kan plaatsvinden, waaronder de orale, oculaire, nasale, pulmonale, vaginale en rectale mucosa, maar tot op heden is slechts een klein aantal orale vaccins en één nasaal vaccin op de markt.

Belangrijke obstakels voor het succes van mucosale vaccins zijn de korte interactietijd vanwege hoge verdwijnsnelheid (klaring) aan de diverse oppervlakten en de beperkte absorptie van met name oplosbare antigenen (Neutra en Kozlowski, 2006; Slütter *et al*, 2008). Voor de orale toediening komt daar de gevoeligheid van antigenen voor de blootstelling aan sterk zuur in de maag en eiwitafbrekende enzymen tijdens passage door het darmkanaal bij. De nasale toedieningsroute is vanuit dit oogpunt een aantrekkelijke optie, gezien de mildere omstandigheden en de iets langere interactietijd. Echter, nasale vaccinatie wordt geassocieerd met een verhoogd risico op aandoeningen van het zenuwstelsel, zoals een plotselinge verlamming van het aangezicht (*Bell's palsy*). Deze ernstige bijwerking heeft in 2001 geleid tot het intrekken van de autorisatie van het eerste nasaal toegediende subunit influenzavaccin, Nasalflu[®], dat een jaar eerder in Zwitserland op de markt was gekomen (Mutsch *et al*, 2004).

Als alternatief is vaccinatie onder de tong, via de zogeheten sublinguale mucosa, veelbelovend (Didier, 2006). Deze mucosa is gemakkelijk bereikbaar en wordt al vele jaren gebruikt voor de toediening van geneesmiddelen met laag-moleculair gewicht en van immunogene peptiden. Het voordeel van deze route is het vermogen van snelle absorptie met slechts beperkte blootstelling aan schadelijke zuren en enzymen. Dit kan leiden tot een efficiënter gebruik van de dosis antigeen dan bij andere mucosale toedieningsroutes. Tot op heden zijn er geen bijwerkingen op het centrale zenuwstelsel aangetoond. De sublinguale route wordt sinds enkele jaren met succes gebruikt voor allergeen-specifieke desensitisatie. Zeer recent heeft het Internationale Vaccin Instituut laten zien dat vaccinatie via de sublinguale route in muizen kan leiden tot een effectieve bescherming tegen influenza (Song *et al*, 2008). Studies bij de mens zullen de klinische toepasbaarheid van deze toedieningsroute voor vaccins moeten aantonen.

Hoewel de sublinguale route een veelbelovend alternatief is, geldt ook hiervoor dat het verbeteren van de effectiviteit de grote uitdaging is. Het verlengen van de interactietijd, het verbeteren van de absorptie van antigenen door de mucosa, en het goed activeren van het immuunsysteem zijn daarbij belangrijke punten van

aandacht.

Diverse polymeren kunnen door een interactie aan te gaan met zowel het antigeen als de mucosa bijdragen aan de inductie van een immuunrespons. Met name positief geladen (getrimethyleerd) chitosaan of poly-D, L-lactide-co-glycolide (PLG) partikels hebben in nasale en orale toepassingen veelbelovende resultaten laten zien (Amidi *et al*, 2007; Jaganathan en Vyas 2006). Door gebruik te maken van hydrofiliciteit, lading en functionele groepen kunnen polymeren muco-adhesief gemaakt worden. Dit betekent dat het polymeer hecht aan de mucosa, waardoor de verblijftijd van de vaccins sterk wordt verlengd en de kans op opname door de M-cellen wordt vergroot (Smart, 2005; Neutra en Kozlowski, 2006). Voorbeelden van muco-adhesieve polymeren zijn alginaten (hechten door hydrofiliciteit), chitosanen (hechten door lading en thiomeren (hechten met functionele groepen).

Het ideale vaccin

De afgelopen jaren is er door veel kennis ontwikkeld over succesfactoren voor de verschillende toedieningsroutes, afgiftesystemen en adjuvantia voor vaccins. Voor alle toedieningsroutes geldt dat voor een beschermende en langdurige immuunrespons de volgende componenten essentieel zijn:

- een goed antigeen,
- een geschikt adjuvans
- een geschikt afgiftesysteem.

Om deze kennis ook tot nieuwe en veiligere vaccins te laten leiden, is integratie van immunologie, biotechnologie, microbiologie en farmaceutische wetenschap nodig. Naast de wetenschap moet er ook voor vaccinproducenten voldoende *incentive* zijn om in te springen op de nieuwe ontwikkelingen. Het is een grote uitdaging om een aantrekkelijk veld voor vaccinontwikkeling te creëren waarbij rijke landen, ontwikkelingslanden, farmaceutische industrie, academische R&D-leiders internationale gezondheidsorganisaties en *non-governmental organisations* (NGOs) zoals de *Bill & Melinda Gates Foundation*, een grote rol spelen.

Van oraal naar injectie?

Een opmerkelijke stap van Johnson & Johnson was om van een oraal product dat een- of tweemaal daags gegeven dient te worden, een injectiepreparaat te maken. Risperdal bevat als actieve stof risperidon en wordt gebruikt voor de behandeling van schizofrenie en bipolaire stoornissen. Hoewel de orale formulering commercieel zeer succesvol is met een omzet van drie miljard dollar per jaar, blijkt er voldoende vraag te zijn naar een injectiepreparaat met een verlengde afgifte van risperidon. Risperdal Consta genereerde vorig jaar wereldwijd bijna een miljard dollar aan omzet. Het is ontwikkeld om de therapietrouw te verbeteren en dient iedere twee weken intramusculair gegeven te worden. Een marktaandeel van een kwart voor een injectiepreparaat dat later op de markt komt dan de orale versie is spectaculair, en illustreert dat niet alleen gemak en comfort van de patiënt de keuze van de optimale toedieningsroute bepalen, maar ook het belang van juiste dosis en doseringstijdstip voor het succes van de behandeling.

Polymeren voor *controlled release*-formuleringen van biofarmaca

Op polylactaat-glycolaat (PLG-) gebaseerde *controlled release*-preparaten zoals Lupron® Depot van Abbott hebben hun succes vooral te danken aan de relatieve eenvoud om het werkzame bestanddeel in een polymeer te verwerken. Vergelijken met kleine organische moleculen en korte peptiden is de complexiteit om therapeutische eiwitten en antigenen in een polymeermatrix te verwerken vele keren groter.

Eiwitten hebben een secundaire en delicate tertiäre structuur die belangrijk zijn voor de juiste biologische werking. PLG is hydrofoob, compact, waterarm en breekt af tot melkzuur en glycolzuur, wat een verzuring van de microsfeer veroorzaakt gedurende de afgifteperiode. Eiwitten voelen zich het best in een waterige omgeving zoals in fysiologische omstandigheden. Hydrofobe oppervlakken en pH-verschuivingen kunnen leiden tot een inactivatie of afbraak van het eiwit. Die incompatibiliteit kan voorkomen worden door eiwitten te formuleren in polymeermatrices die hydrofieler zijn dan PLG.

Hydrogelvormende polymeren bevatten veel water, tot wel 70%, waardoor de meer natuurlijke omgeving van het eiwit wordt benaderd. Door de grote porositeit

van het polymeer kunnen buffers, zouten, suikers en stabilisatoren eenvoudig aan het product worden toegevoegd. Daardoor heeft het eiwit voldoende stabiliteit tijdens opslag of na toediening aan de patiënt. Een bijkomend voordeel van hydrogelvormende polymeren ten opzichte van PLG is dat hydrogelpolymeren meer homogeen afbreken, door zogenaamde *bulk degradation*, wat een gelijkmatige afgifte van de werkzame stof bevordert en in veel gevallen een hoge initiële afgifte (*burst release*) voorkomt.

Het nederlandse bedrijf OctoPlus heeft innovatieve polymere hydrogeltechnologieën ontwikkeld die volledig op water gebaseerd zijn en waarbij geen sprake is van verzuring. Hierdoor zijn deze polymeren bij uitstek geschikt om kwetsbare biofarmaca in te kapselen. Een veelbelovend voorbeeld is de door OctoPlus toegepaste OctoVAX™-technologie op basis van gemodificeerde dextraanpolymeren (Stenekes *et al*, 1998). Initiële proeven met een hepatitis B-vaccin laten zien dat deze aanpak goede systemische antilichaamresponsen kan opwekken na een *single shot*-vaccinatie.

Tevens heeft OctoPlus een product in ontwikkeling met gecontroleerde afgifte van interferon alfa 2b voor de behandeling van chronische hepatitis C-infectie. Dit product is gebaseerd een ander hydrogel polymeer, namelijk PolyActive™ (de Leede *et al*, 2008).

Ondanks de voordelen die een hydrogel zoals Polyactive™ heeft, zijn er in het maken van microsferen met therapeutische eiwitten processtappen die een gevaar op kunnen leveren voor de chemisch-fysische integriteit van de werkzame stof, wat gevolgen kan hebben voor de werkzaamheid en veiligheid van het product. Aggregatie van eiwitten kan leiden tot het optreden van immunogeniciteit, wat ongewenst is, in het bijzonder als het therapeutische eiwit ook van nature in het lichaam voorkomt.

Een veel gebruikt proces om eiwitten te encapsuleren in microsferen is de water/olie/water emulsificatie. Noodzakelijkerwijs wordt et eiwit blootgesteld aan stress gerelateerd aan concentrering, verandering van buffer, contact met organisch oplosmiddel, mechanische stress (*shear*) voor de emulsificatie, hoge zoutconcentraties en vriesdrogen. Een amfifiel hydrogelvormend polymeer zoals PolyActive™ kan het eiwit gedurende een groot deel van het productieproces afscheren van het oplosmiddel en het zodoende voldoende stabiliseren. De grote (nano)porositeit van hydrogelen maakt deze polymeren minder geschikt voor produkten met een langdurige afgifte van kleine moleculen.

Mic
stru
diff
de l
stof
eiw
is e
pol
van
vitr
of c
afg
van
dee
zee
pol

Pro

Far
bio
ver
te b
De
pro
hyc
en l
bep
de c
mo
par
om
zek
Eer

Microsferen op basis van OctoVax™ en PolyActive™ hebben een zeer open structuur, waardoor molekulen kleiner dan ongeveer 10 kDa snel in en uit zullen diffunderen. Onder andere de chemische samenstelling van het polymeer bepaalt de balans tussen retentie en transparantie voor een geëncapsuleerde werkzame stof. De gewenste afgifte duur en het molekulgewicht van het therapeutisch eiwit bepalen gezamenlijk de keuze van de polymeercompositie. PolyActive™ is een multiblock copolymeer met polybutyleen-tereftalaat (PBT; hydrofoob) en polyethyleenglycol (PEG; hydrofiel) blokken (van Dijkhuizen *et al*, 2005). De ratio van PBT en PEG bepaalt de hydrofiliciteit en nanoporositeit van het product. *In vitro*- en *in vivo*-evaluaties van het *controlled release*-preparaat moeten uitwijzen of de juiste keuze is gemaakt voor de polymeercompositie. Bijsturingen van de afgifte-eigenschappen zijn mogelijk door aanpassingen in het productieproces van de microsferen. De hoeveelheid water in een hydrogel, de diameter van de deeltjes en de hydrodynamische porositeit (de porositeit die het eiwit ziet), zijn zeer bruikbare parameters om het afgifteprofiel fijner mee af te stemmen zonder de polymeercompositie te hoeven veranderen.

Produktontwikkeling

Farmacokinetische en dynamische gegevens van de werkzame stof zoals biologische beschikbaarheid na subcutane toediening, eliminatiehalfwaardetijd en verdelingsvolume zijn nodig om de benodigde dagelijkse dosis van het farmacon te berekenen, gericht op het bereiken van veilige en therapeutische bloedspiegels. De gewenste toedieningsfrequentie bepaalt vervolgens hoeveel actieve stof het product moet bevatten. Het maximaal haalbare percentage werkzame stof in de hydrogel dicteert vervolgens samen met de microsfeerdiameter, de suspensiedikte en het injectievolume van het uiteindelijke product de injecteerbaarheid door een bepaalde naalddikte. Aangezien een product dat kan worden geïnjecteerd door de dunste naald het grootste competitieve voordeel heeft, zal vaak een compromis moeten worden gevonden tussen deze parameters. Injecteerbaarheid is de parameter waar veel microsfeerproducten tijdens de ontwikkeling over struikelen, omdat er grenzen zijn aan het percentage werkzame stof in de polymeermatrix, zeker zonder de afgifte ongunstig te beïnvloeden.

Een waardevol hulpmiddel tijdens de productontwikkeling van injecteerbare

controlled release-preparaten is kennis over de *in vitro* - *in vivo* correlatie (IVIVC) van het afgifteprofiel. Voor niet alle parenterale *controlled release*-producten is echter een IVIVC vereist of zelfs relevant. Bij Lupron® Depot in de behandeling van prostaatkanker is het de bedoeling dat de GnRH(*gonadotropin-releasing hormone*)-receptoren in de hypofyse zodanig sterk gestimuleerd worden dat ze gedownreguleerd worden, zodat de productie van luteïniserend hormoon (LH) en follikel-stimulerend hormoon (FSH) verlaagd wordt. De therapeutische breedte is hier dusdanig groot dat een IVIVC niet relevant is en dat zelfs een grote initiële afgifte (*burst*) van leuprolide geen probleem vormt. Aan de doseringsnauwkeurigheid van bijvoorbeeld insuline en interferon daarentegen wordt strenge eisen gesteld omdat de therapeutische breedte van deze stoffen klein is. Als de IVIVC onbekend is, dan zijn zorgvuldig en voorzichtig uitgevoerde klinische studies de enige manier van productontwikkeling van een *controlled release*-product. Het is vooral een economisch voordeel om tijdens de productontwikkeling van een *controlled release*-preparaat informatie te hebben over de IVIVC, omdat het risicoverlagend werkt.

Tot slot

Hoewel er veel ontwikkelingen op het gebied van toedieningsroutes van biofarmaca zijn, lijkt het erg optimistisch om aan te nemen dat de naald binnenkort zal verdwijnen als meest gebruikte manier om therapeutische eiwitten en vaccins toe te dienen.

‘Leuker kunnen we het niet maken, wel minder frequent’.

Referenties

Amidi M, Romeijn SG, Verhoef JC, Junginger HE, Bungener L, Huckriede A, Crommelin DJ en Jiskoot W. N-trimethyl chitosan (TMC) nanoparticles loaded with influenza subunit antigen for intranasal vaccination: Biological properties and immunogenicity in a mouse model. *Vaccine*2007; 25: 144-53.

Braiden DJ en Baird AW. Microparticle vaccine approaches to stimulate mucosal immunisation. *Microb Infect* 2001; 3: 867-76.

De Leede LGJ, Humphries JE, Bechet AC, Van Hoogdalem EJ, Verrijk R en Spencer DG. Novel Controlled-release Lemna Derived IFN-alpha2b (Locteron): Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Tolerability in a Phase I Clinical Trial. *J Interf & Cyt Res* 2008; 28: 113-22.

Didier A. Future developments in sublingual immunotherapy. *Allergy* 2006; 61: 29-31.

Jaganathan KS en Vyas SP. Strong systemic and mucosal immune responses to surface-modified PLGA microspheres containing recombinant hepatitis B antigen administered intranasally. *Vaccine* 2006; 24: 4201-11.

Kane A, Lloyd J, Zaffran M, Simonsen L en Kane M. Transmission of hepatitis B, hepatitis C, and human immunodeficiency viruses through unsafe injections in the developing world: model-based regional estimates. *Bull World Health Organ* 1999; 77: 801-7.

Kermode M. Unsafe injections in low-income country health settings: need for injection safety promotion to prevent the spread of blood-borne viruses. *Health Promot Int* 2004; 19: 95-103.

Khafagy E-S, Morishita M, Onuki Y en Takayama K. Current challenges in non-invasive insulin delivery systems: a comparative review. *Adv Drug Del Rev* 2007; 59: 1521-46.

Levine MM. Can needle-free administration of vaccines become the norm in global immunization? *Nat Med* 2003; 9: 99-103.

Mitragotri S. Immunization without needles. *Nat Rev Immunol* 2005; 5:905-16.

Mutsch M, Zhou W, Rhodes P, Bopp M, Chen RT, Linder T, Spyr C en Steffen R. Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland. *N Engl J Med* 2004; 350: 896-903.

Neutra MR en Kozlowski PA. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 148-58.

O'Hagan DT, Rahman D, McGee JP, Jeffery H, Davies MC, Williams P, Davis SS, en Challacombe SJ. Biodegradable microparticles as controlled release antigen delivery systems. *Immunology* 1991; 73: 239-42.

O'Hagan DT en Rappuoli R. Novel approaches to vaccine delivery. *Pharm Res* 2004; 21:1519-30.

Peek LJ, Middaugh CR en Berkland C. Nanotechnology in vaccine delivery. *Adv Drug Del Rev* 2008; 60: 915-28.

Plotkin SA. Vaccine: past, present, and future. *Nat Med* 2005; 11: S5-11.

Plotkin SL en Plotkin SA. A short history of vaccination, in: Plotkin SA, Orenstein WA (Eds). Vaccines. WB Saunders Company, Philadelphia 2004.

Rappuoli R, Miller HI en Falkow S. Medicine: The intangible value of vaccination. Science 2002; 297:937-39.

RVP website: http://www.rivm.nl/rvp/rijks_vp/vac_schema/

Singh M, Kazzaz J, Chesko J, Soenawan E, Ugozzoli M, Giuliani MM, Pizza M, Rappuoli R en O'Hagan D. Anionic microparticles are a potent delivery system for recombinant antigens from Neisseria meningitidis serotype B. J Pharm Sci 2004; 93: 273-82.

Slütter B, Hagens N en Jiskoot W. Rational design of nasal vaccines. J Drug Target 2008; 16: 1-17.

Song J-H, Nguyen HH, Cuburu N, Horimoto T, Ko S-Y, Park S-H, Czerkinsky C en Kweon M-N. Sublingual vaccination with influenza virus protects mice against lethal viral infection. PNAS 2008; 105:1644-49.

Stenekes RJ, Franssen O, van Bommel EM, Crommelin DJA en Hennink WE. The preparation of dextran microspheres in an all-aqueous system: effect of formulation parameters on particle characteristics. Pharm Res 1998; 15: 557-61.

Van Dijkhuizen-Radersma R, Metairie S, Roosma JR, de Groot K en Bezemer JR. Controlled release of proteins from degradable poly(ether-ester) multiblock copolymers. J Control Release 2005; 101: 175-86.

World Health Organization. State of the World's Vaccines and Immunization. Geneva, World Health Organ (1996)

ein

on.

M,

for

93:

rug

y C

nst

The

ion

ner

ock

on.

PROF. DR JHM SCHELLENS



Jan Schellens studeerde geneeskunde aan de Rijksuniversiteit van Utrecht. Na zijn artsexamen in 1984 verrichtte hij aan de Rijksuniversiteit van Leiden een promotie-onderzoek betreffende de karakterisering van de variabiliteit in het metabolisme van geneesmiddelen. Na zijn academische promotie in 1988 specialiseerde hij tot internist en later tot medisch oncoloog tijdens een aanstelling aan de Den Hoed Kliniek in Rotterdam, en hij behaalde zijn aantekening medisch oncoloog in 1998. Op dit moment is hij werkzaam als internist in het Nederlands Kanker Instituut/Antoni van Leeuwenhoek Ziekenhuis te Amsterdam. Daarnaast is hij hoogleraar in de Klinische Geneesmiddelen toxicologie aan de Universiteit van Utrecht. Zijn onderzoeksinteresses liggen op de terreinen van het bevorderen van de orale bio-beschikbaarheid van geneesmiddelen, de farmacologie van nieuwe anti-kanker geneesmiddelen, het verfijnen van de behandeling van kankerpatiënten door gebruik te maken van geavanceerde populatiedata-analyse, *pharmacogenomics*, en eiwitanalyse (*proteomics*).

Jan Schellens heeft een aanzienlijk aantal nevenfuncties. Hij is sinds 1999 lid van het College ter Beoordeling van Geneesmiddelen, en hij is lid van een aantal nationale en internationale organisaties op het gebied van klinische farmacologie en oncologie. Tot op heden publiceerde hij meer dan 350 wetenschappelijke artikelen in *peer reviewed* tijdschriften.

BI
GE

JH

Afl

A

A

B

B

C

C

D

E

F

G

H

H

H

H

H

K

M

M

n

N

o

P

P

R

R

S

V

BIOFARMACON Z.K.M. DIAGNOSTICUM VOOR GEÏNDIVIDUALISEERDE THERAPIE

JHM Schellens

Afkortingen en verklaringen

Akt	serine/threonine kinase betrokken bij de stressrespons van een cel en bij celoverleving
AUC	oppervlak onder de geneesmiddelconcentratie <i>versus</i> tijd curve
BRCA1	borstkankergen 1
BRCA2	borstkankergen 2
CISH	chromogene <i>in situ</i> hybridisatie
CRC	colorectaal carcinoom
DNA	deoxyribonucleinezuur
EGFR	epidermale groeifactorreceptor
FISH	flourescentie <i>in situ</i> hybridisatie
GFR	glomerulaire filtratiesnelheid
Her1	humane epidermale groeifactorreceptor 1
Her2	humane epidermale groeifactorreceptor 2
Her3	humane epidermale groeifactorreceptor 3
Her4	humane epidermale groeifactorreceptor 4
HRD	homologe recombinatiedeficientie
K-ras	Kirsten rat sarcoma oncogen
MAPK	mitogeen-geactiveerd eiwitkinase
MEK	MAPK-kinase
mRNA	boodschapper-ribonucleinezuur
NSCLC	niet-kleincellig longcarcinoom
oncogen	een gen dat oorspronkelijk een normale rol speelde in de cel maar dat door mutatie veranderd is en nu kan bijdragen aan de groei van een tumor
PARP	Poly(ADP-ribose)polymerase
PI3-K	fosfo-inositide 3-kinase
Raf	eiwit in de intracellulaire signaaloverdracht via MAPK
Ras	eiwit in de intracellulaire signaaloverdracht via MAPK
Sos	'son-of-sevenless' eiwit in de intracellulaire signaaloverdracht
VEGF	vasculair endotheel-groeifactor

Inleiding

Individualisatie van therapie met oncolytica is een nieuw toverwoord binnen de oncologie nu nieuwe biofarmaca ons ter beschikking zijn gekomen. In de Engelstalige literatuur wordt hiervoor het woord *personalized medicine*, of *tailor made therapy* gebruikt. Het nieuwe is echter maar schijn. Er wordt namelijk al vele decennia lang individualisatie van therapie bereikt met klassieke behandelingsmethoden, zoals chemotherapie, endocriene therapie en radiotherapie. Individualisatie wordt nagestreefd, omdat er belangrijke verschillen zijn tussen mensen onderling in de dosis-werkingsrelatie van behandelingsmodaliteiten. Deze zijn terug te voeren op de farmacologische begrippen farmacokinetiek en farmacodynamiek. Een klassiek voorbeeld van individualisatie in de oncologie op basis van farmacokinetische verschillen tussen patiënten onderling is de aanpassing van de dosering op geleide van de nier- en leverfunctie. Bijvoorbeeld, carboplatinum wordt gedoseerd op geleide van de glomerulaire filtratiesnelheid (GFR) en de dosis wordt uitgerekend om een bepaalde mate van blootstelling in plasma te bereiken in termen van bijvoorbeeld oppervlakte onder concentratie-tijd curve (AUC). De dosis van docetaxel wordt aangepast op geleide van concentraties van bilirubine en transaminasen in het bloed. Van beide medicamenten is bekend dat zonder deze individualisatie patiënten onnodig risico lopen op bijwerkingen die aan de hoogte van de blootstelling gerelateerd zijn. Individualisatie van hormonale therapie is al decennia de basis voor de behandeling van mammacarcinoom. Bij positieve oestrogeenreceptor heeft therapie met tamoxifen zin, bij negatieve receptor niet. Deze individualisatie is gebaseerd op de expressie van de receptor in het tumorweefsel, dus betreft het individualisatie op basis van een farmacodynamische parameter.

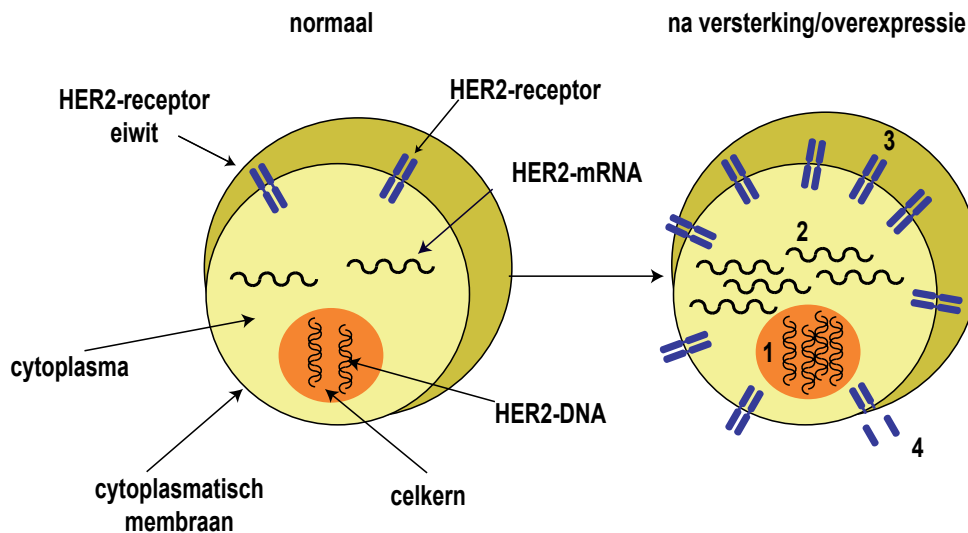
Trastuzumab en expressie van de Her2-receptor

Trastuzumab is een gehumaniseerd monoclonaal antilichaam tegen de Her2-receptor en het product is geregistreerd voor de behandeling van Her2-positief gemetastaseerd mammacarcinoom en voor de adjuvante behandeling bij Her2-positief mammacarcinoom (Whenham *et al*, 2008; figuur 1).

cyt

Figu

De
is k
een
pos
Da
van
wo
is v
der
toe
kar
zog
Het
obs
(flo
Na

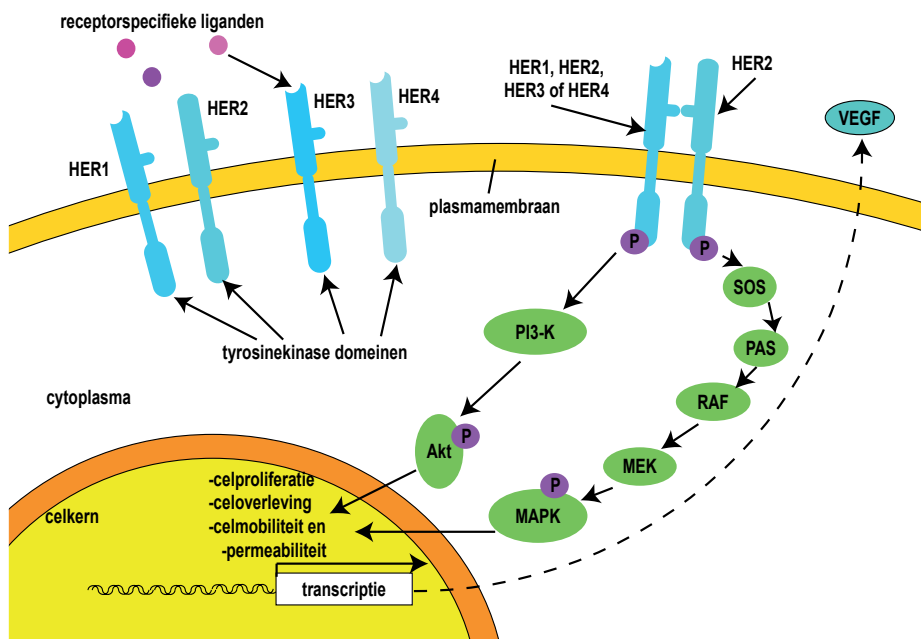


Figuur 1. Her2-overexpressie bij borstkanker. Betekenis van de cijfers in de figuur:

1. aantal gencopieën neemt toe;
2. hoeveelheid mRNA neemt toe;
3. aantal receptoreiwitten en het celoppervlak neemt toe;
4. loslaten van extracellulair eiwit van de receptoren neemt toe.

De therapie is uitsluitend zinvol bij hoge mate van expressie van de receptor. Dit is logisch, want het betreft tenslotte een specifiek antilichaam. Het is belangrijk dat eenduidig de receptorstatus van Her2 wordt vastgesteld in tumorweefsel. Bij vals-positieve uitkomst wordt een patiënt overbehandeld met risico op bijwerkingen. Daarnaast is het middel duur en bij adjuvante behandeling wordt dan een bedrag van ongeveer 35000 euro per patient teveel uitgegeven. Bij een vals-negatieve test wordt de patiënt ten onrechte dit effectieve middel onthouden, wat ongunstig is voor de prognose. Het is dus logisch om bij start van de toepassing van een dergelijk nieuw middel in de algemene praktijk een gevalideerde en eenvoudig toepasbare test beschikbaar te hebben, zodat eenduidig de expressie van Her2 kan worden bepaald. Tot op heden is hier geen optimale situatie bereikt. De zogenaamde Herceptest (FDA-goedgekeurd) is een immunohistochemische test. Het voordeel is dat deze eenvoudig uitvoerbaar is. Het nadeel is dat er *inter-observer* verschillen zijn in de beoordeling van de uitkomst. Beter zijn de FISH (*flourescentie in situ hybridisatie*) en CISH (*chromogene in situ hybridisatie*) testen. Nadeel is dat deze testen veel lastiger uitvoerbaar zijn en alleen toegankelijk zijn

in geavanceerde moleculair pathologische laboratoria (figuur 2). De testen zijn onderling niet gevalideerd.



Figuur 2. Schema van de Her-familie van transmembraanreceptoren en intracellulaire signaaloverdracht.

Cetuximab en panitumumab en K-ras-mutatie

Beide middelen zijn geregistreerd voor de behandeling van colorectaal carcinoom (CRC). Cetuximab is een chimeer en panitumumab is een volledig humaan monoclonaal antilichaam tegen de epidermale groeifactorreceptor (EGFR), ook wel Her1-receptor genoemd (de Castro-Carpeño *et al*, 2008; figuur 2). Beide middelen hebben uitsluitend een kans op werkzaamheid indien de zogenaamde K-ras-receptorstatus *wildtype* is. Bij CRC is echter de receptor in ongeveer 40% van de gevallen gemuteerd en dan is de K-ras-siginaaloverdrachtsroute constant actief. Deze signaaloverdracht gebeurt onafhankelijk van EGFR-siginaaloverdracht en remming van EGFR heeft onder deze omstandigheden geen therapeutisch waarneembaar gunstig effect. In de

productlabeltekst voor gebruik van panitumumab staat dat dit middel alleen bij K-ras-*wildtype* tumoren moet worden toegepast. Dit vloeit voort uit de registratiestudie waarin bij K-ras-mutante tumoren geen antitumor activiteit werd gezien. Dit vereist dus de beschikbaarheid van een gevalideerde test om K-ras-mutatie in de tumor vast te stellen. Deze test is momenteel niet voorhanden. K-ras-mutaties kunnen vrij eenvoudig worden bepaald in een goed geoutilleerd laboratorium voor moleculaire pathologie. Dit is echter geen routine in de algemene ziekenhuizen. Centralisatie van deze bepaling zou een goede oplossing bieden voor dit relevante probleem. Van belang is dat er ook geen vergoedingsstructuur is voor deze test en dat de kosten dus bovenop de kosten van de reguliere zorg komen. Invoering van een vergoeding zal een drempel wegnemen voor het routinematig gebruik van de bepaling bij CRC. Vanuit kosten oogpunt wordt hiermee waarschijnlijk een grote besparing bereikt, omdat cetuzimab en panitumumab dure middelen zijn.

Erlotinib en EGFR en K-ras

Erlotinib is een tyrosinekinase remmer die dagelijks oraal wordt gebruikt bij niet-kleincellig longcarcinoom (NSCLC) in de tweede lijn van behandeling na platinum chemotherapie voorbehandeling (Yamamoto *et al*, 2008). Erlotinib is een zogenaamd klein molecuul, dit ter onderscheid van de hierboven genoemde grote antilichamen. In epidemiologische studies is vastgesteld dat de kans op activiteit van erlotinib hoger is bij niet-rokende vrouwen van Aziatische afkomst en met adenocarcinoom. Moleculair biologisch past dit bij activerende mutaties in EGFR. Dit zijn tumoren die in de regel K-ras-*wildtype* zijn. Voor optimaal gebruik is het nodig om toegang te hebben tot een laboratorium dat in staat is om deze mutaties te bepalen, opdat men de patiënten kan selecteren die de hoogste kans hebben om op dit middel te responderen. Daarnaast kunnen patiënten geselecteerd worden met lage kans op respons. Deze patiënten kunnen behandeling en bijwerkingen bespaard blijven. Ook K-ras-mutante tumoren hebben een kleine kans op respons op erlotinib. Dit vloeit voort uit de parallele signaaloverdracht tussen K-ras en EGFR, zoals bij CRC hierboven uiteengezet. Momenteel wordt slechts in sporadische gevallen de EGFR- en K-rasstatus bepaald en gebruikt om richting te geven aan de therapie met erlotinib.

Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP)-remming, borstkankergenmutatie en homologe recombinatiedeficiëntie (HRD)

Dit is een nieuw, interessant en veelbelovend concept voor tumoren met BRCA1- of BRCA2-mutaties (Drew en Calvert, 2008). Deze komen met name voor bij familiair mammacarcinoom en ovariumcarcinoom, maar ook bij prostaatcarcinoom.

BRCA1/2-mutaties leiden tot gestoorde homologe recombinatie en in dit soort tumoren is er een grote toename aan cytotoxiciteit indien andere DNA-reparatiesystemen worden uitgeschakeld. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) is betrokken bij de reparatie van enkelstrengs DNA schade (*base excision repair*). PARP remming leidt tot lethaliteit van cellen met BRCA1- of BRCA2-mutatie en dit concept is werkzaam gebleken bij mammacarcinoom en ovariumcarcinoom (Fong 2008). PARP remmers zijn op zich weinig toxische middelen en de tolerantie in recente klinische studies op biologisch actieve dosisniveaus is uitstekend.

Op basis van dit werkingsmechanisme is het essentieel om te weten of er een BRCA1- of BRCA2-mutatie in de tumor is, omdat anders behandeling met dit middel geen zin heeft. Preklinisch onderzoek toont aan dat een enkele mutatie (dus in 1 allel) in BRCA1/2 geen verandering geeft in de DNA-reparatiecapaciteit. Patiënten die kandidaat zijn voor deze therapie dienen een mutatie te hebben in beide allelen voor BRCA1 of 2 in tumorweefsel. Ook hier ligt een belangrijke taak weggelegd voor de afdelingen moleculaire pathologie. Families met BRCA1/2-mutatie zijn inmiddels goed bekend, maar bij een *de novo* casus is het vaststellen van BRCA1/2-mutatie een tijdrovende zaak. Het betreft lange genen van ongeveer 80Kb waarin meer dan 600 mutaties aanwezig kunnen zijn en waarvan een groot aantal leidt tot een niet-functioneel eiwit.

De situatie ligt gecompliceerd omdat ook bij niet-familiair voorkomen van mammacarcinoom en waarschijnlijk ook bij diverse andere tumoren gestoorde dubbelstrengs DNA-reparatie kan voorkomen. Dit wordt samengevat onder de noemer 'homologe recombinatiedeficiëntie' (HRD). Bij homologe recombinatie zijn namelijk meer genen betrokken dan alleen BRCA1/2. Het is dus zaak om HRD in de tumor vast te stellen, omdat de patiënten met een dergelijke tumor nuttig behandeld zouden kunnen worden met een PARP-remmer.

Dit is een veld van actief preklinisch en klinisch onderzoek dat naar verwachting op afzienbare termijn zal leiden tot nieuwe geneesmiddelregistraties.

Co

Toe
pat
wij:
ligt
pat

Ref

de '
Fel
Tra
Dre
ova
For
Ca
PA
in p
On
Wh
tras
Yar
sm:

Conclusie

Toepassing van nieuwe middelen die alleen werkzaam zijn bij een subgroep van patiënten vraagt om gevalideerde diagnostiek om die subgroepen op eenduidige wijze te identificeren. Bij de toepassing van de genoemde middelen in de oncologie ligt er een belangrijke taak bij de moleculaire diagnostiek van tumorweefsel van de patient.

Referenties

de Castro-Carpeño J, Belda-Iniesta C, Casado Sáenz E, Hernández Agudo E, Feliu Batlle J en González Barón M. EGFR and colon cancer: a clinical view. *Clin Transl Oncol* 2008; 10: 6-13.

Drew Y en Calvert H. The potential of PARP inhibitors in genetic breast and ovarian cancers. *Ann N Y Acad Sci.* 2008; 1138: 136-45.

Fong PC, Boss DS, Carden C P, Roelvink M, De Greve J, Gourley CM, Carmichael J, De Bono JS, Schellens JH en Kaye SB. AZD2281 (KU-0059436), a PARP (poly ADP-ribose polymerase) inhibitor with single agent anticancer activity in patients with BRCA deficient ovarian cancer: Results from a phase I study. *J Clin Oncol* 2008; 26; abstr 5510.

Whenham N, D'Hondt V en Piccart MJ. HER2-positive breast cancer: from trastuzumab to innovatory anti-HER2 strategies. *Clin Breast Cancer.* 2008; 8: 38-49.

Yamamoto H, Toyooka S, Mitsudomi T. Impact of EGFR mutation analysis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2008, in press.

