



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Anti sense and sensibility : renal and skin effects of (antisense) oligonucleotides

Meer, L. van

Citation

Meer, L. van. (2017, January 19). *Anti sense and sensibility : renal and skin effects of (antisense) oligonucleotides*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/45389>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/45389>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/45389> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Meer, L. van

Title: Anti sense and sensibility : renal and skin effects of (antisense) oligonucleotides

Issue Date: 2017-01-19

VIII

NEDERLANDSE
SAMENVATTING



In dit proefschrift worden de eerste experimenten in mensen beschreven met een nieuw kandidaat-geneesmiddel, ISIS 388626. Deze experimenten hebben tot doel om te onderzoeken of ISIS 388626 veilig aan mensen kan worden gegeven en de beoogde werking heeft. ISIS 388626 is een antisense oligonucleotide. De werking van traditionele geneesmiddelen berust veelal op remming of stimulatie van bepaalde eiwitten, waardoor de functie ervan wordt beïnvloed. Het werkingsmechanisme van antisense oligonucleotiden is anders, aangezien het de aanmaak van het gehele eiwit tracht te voorkomen. Antisense oligonucleotiden zijn opgebouwd uit een reeks van 12 tot 24 nucleïne zuren, die precies past aan een deel van het mRNA van een eiwit, bijvoorbeeld een enzym, transporteiwit of receptor [1]. Door te binden aan het mRNA, kan de translatie niet plaatsvinden en wordt het eiwit minder geproduceerd. Het concept is veelbelovend omdat het specifieke remming mogelijk maakt van alle eiwitten waarvan de bijbehorende mRNA opbouw bekend is. ISIS 388626 bindt aan het mRNA van het SGLT2 eiwit. SGLT2 is een transporteiwit dat zorgt voor reabsorptie van glucose uit de voorurine in de nier. Remming van SGLT2 leidt tot toegenomen glucose uitscheiding in de urine en is een manier om type 2 diabetes te behandelen [2-4].

In de dieronderzoeken die werden verricht met ISIS 388626 bleek dit een effectieve en veilige strategie [5;6]. In deze proeven werd aangetoond dat bij doseringen van 1-3 mg/kg het SGLT2 mRNA effectief werd geremd, hetgeen leidde tot een aanzienlijke toename van de renale uitscheiding van glucose [5]. Er werden geen tekenen van toxiciteit of achteruitgang van nierfunctie waargenomen [5;7]. Op basis hiervan werd de equivalente dosering voor mensen die veilig en effectief zou zijn geschat te liggen tussen 1 en 3 mg/kg/week [5-7]. Dit vertaalt zich naar doseringen tussen de 50 en 200 mg/week (0.7-2.8 mg/kg uitgaande van 70kg gewicht). Dit is in lijn is met doseringen van vergelijkbare antisense oligonucleotiden die het gewenste effect lieten zien en veilig waren bij mensen [8-10]. Het oorspronkelijke ontwerp voor de klinische studie bestond uit een dubbelblind, placebo-gecontroleerd onderzoek waarbij eerst enkelvoudige doses in opklimmende sterkte (*single ascending doses*; SAD) aan de proefpersonen zouden worden toegediend om de veiligheid van het middel te onderzoeken. Dit werd gevolgd door onderzoek met een meervoudige wekelijkse dosering in opklimmende sterkte, met in de eerste week een oplaaddosis van 3 doseringen (*multiple ascending dose*; MAD). In deze MAD-studie werd naast veiligheid ook gekeken naar het

beoogde effect, door de glucose excretie in de urine te testen en ook de metabole reactie op een grote glucose inname ('orale glucose tolerantie test'). De enkelvoudige doseringen in de SAD studie leidden niet tot veiligheidsproblemen. Echter, in de MAD studie werden stijgingen in serum creatinine opgemerkt bij 50 en 100 mg doseringen, die kunnen wijzen op een nadelig effect op de nier. Om deze reden werd het onderzoek voortijdig gestopt. Ook andere markers voor nierschade waren toegenomen bij deze proefpersonen. Farmacodynamisch effect (toename van glucose in de urine, glucosurie) werd nog niet gezien bij deze doseringen. Deze effecten, die suggestief waren voor nierschade waren in dieren niet opgemerkt. Daarom werd besloten nader onderzoek in dieren te verrichten. Deze onderzoeken toonden aan dat ook in dieren dergelijke effecten ontstonden, die voorbijgaand waren en daardoor in eerdere proeven waren gemist [5;7;11]. Ook bleek in extra onderzoek bij apen dat deze effecten alleen optraden als de oplaaddosis werd toegepast. In de groep proefdieren die alleen wekelijkse doseringen kregen zonder oplaaddosis, werd geen creatinine stijging gezien, terwijl er wel voldoende glucosurie ontstond. De klinische proeven werden herstart om doseringen van 50, 100 en 200 mg ISIS 388626 gedurende 13 weken zonder oplaaddosis te onderzoeken. Niettemin ontstond in de groep met 50 mg dosering een gemiddelde stijging in serum creatinine en urine markers. Deze stijging verdween na het stoppen met doseren. Er werd een extra onderzoek verricht met een wekelijkse dosis van 50 mg gedurende 13 weken om eventuele functionele nierschade bij de mens nader te onderzoeken. De nierfunctie werd bepaald door middel van een meting van de glomerulaire filtratie snelheid en de renale doorbloeding. Dit onderzoek toonde geen functionele achteruitgang van de nier, terwijl er wel creatinine stijgingen optraden. In de groepen behandeld met 50 mg trad de beoogde glucosurie nog niet op. Gezien de milde en volledig omkeerbare effecten en het ontbreken van verlies van nierfunctie, werden vervolgens de doseringen 100 en 200 mg getest, waarbij wel glucosurie ontstond. Echter, het effect was klein; bij een dosering van 200 mg werd maximaal 1.3 g/dag glucose in de urine uitgescheiden, terwijl met andere SGLT2 remmers tot 60-70 g/dag wordt bereikt [12-15]. De biomarkers voor nierschade liepen verder op in de groepen deelnemers die doseringen van 100 of 200 mg kregen toegediend. Als enige andere belangrijke bijwerking werd in 8-19% van alle deelnemers roodheid van de injectieplekken gezien (Injection Site Reactions, ISRS). Het effect van ISIS 388626 op de nier biomarkers

is onbegrepen. Andere SGLT2 remmers geven ook een serum creatinine stijging, maar deze kan plausibel verklaard worden door de natriurese die ontstaat als gevolg van de uitgesproken glucosurie [16] en heeft waarschijnlijk dus een andere origine. De milde glucosurie die ISIS 388626 teweeg bracht kan worden geduid als gewenst farmacodynamisch effect, maar zou ook kunnen passen bij milde tubulaire dysfunctie. Sommige eerder onderzochte oligonucleotiden zijn ook geassocieerd met stijging van nier biomarkers [17-19]. Weer andere vergelijkbare oligonucleotiden geven dergelijke effecten niet [20-22]. De oorzaak van dit verschil is nog onduidelijk. In dat licht is het raadzaam om bij klinische experimenten met oligonucleotiden altijd nier biomarkers en eventueel functionele testen van de nier in te bouwen. Zeker gezien het feit dat effecten op de nier in dieren maar weinig voorspellend zijn voor de effecten in de mens.

De glucosurie die werd bereikt was minimaal en het effect op de nier aanzienlijk en onbegrepen. Daarmee is het therapeutisch venster van ISIS 388626 smal. Mogelijk heeft de beoogde doelgroep meer baat bij deze therapie, omdat patiënten met type 2 diabetes mellitus een hogere SGLT2 expressie hebben. Echter, meer onderzoek naar de effecten op de nier is nodig voordat verdere klinische ontwikkeling van ISIS 388626 verantwoord zou zijn.

De effecten van ISIS 388626 op de nier waren onverwacht, aangezien initieel geen enkel signaal werd gezien gedurende de uitgebreide preklinische studies in verschillende diersoorten. Dit illustreert het belang van het bepalen en volgen van effecten op de nier in zogenaamd *vroege fase* klinisch geneesmiddelonderzoek. Vaak worden bepalingen serum creatinine en ureum ingezet, maar deze markers zijn weinig gevoelig en vroege schade kan worden gemist [23]. Daarom verdient het aanbeveling ook markers te overwegen waarvan in dieronderzoek is aangetoond dat ze potentieel informatiever zijn, zoals KIM1, B2M, AGST en NAG. Van deze markers is beschreven dat ze eerder reageren dan serum creatinine en daarnaast geven deze biomarkers inzicht in de mogelijke aard en plaats van de nierschade. Een belangrijke beperking van nier biomarkers is het ontbreken van validatie voor het klinisch gebruik, aangezien vooral dierstudies beschikbaar zijn in de huidige literatuur. Gedurende de klinische studies met ISIS 388626 correleerde vooral KIM1 en B2M met de creatinine respons, hetgeen het vermoeden van de tubulaire origine van het effect leek te bevestigen. Er zou echter meer informatie beschikbaar moeten zijn over de klinische bruikbaarheid van de markers. Ook zou het

meten van de markers laagdrempeliger en efficiënter moeten worden. Een andere beperking is het ontbreken van een geschikte biomarker die specifiek is voor schade aan de glomeruli van de nier.

De onderhuidse injectie van ISIS 388626 leidde in een aantal proefpersonen tot ISRS. Alle oligonucleotiden die subcutaan worden toegediend geven dergelijke reacties, de mate en ernst van de reacties verschilt per oligonucleotide. Vanuit de literatuur en ervaring binnen CHDR kan worden geconcludeerd dat hoogte van dosis een belangrijke rol speelt. Hogere doses resulteren in hogere lokale blootstelling in de huid en ernstiger reacties. Milde reacties bestaan meestal uit erytheem en ongemak. Er kunnen ook ernstiger reacties optreden die zich manifesteren als induratie, ulceratie en necrose. ISRS veroorzaakt door oligonucleotiden zijn zeer beperkt beschreven in de literatuur en de pathofysiologie is onbekend. Vermoedelijk speelt immunologische activatie via de aangeboren immuunreceptoren zoals *Toll-Like Receptoren* (TLRS) een rol en mogelijk ook complement activatie. Als er oligonucleotiden ontwikkeld zouden kunnen worden die geen ISRS geven, zou dit het potentiële succes van oligonucleotiden aanzienlijk kunnen vergroten. Hiertoe is meer kennis nodig over deze specifieke huidreacties en immuno-stimulatoire eigenschappen van oligonucleotiden in het algemeen. Weefselonderzoek van de laesies met immuun-kleuringen zou mogelijk inzicht bieden. Ook zouden alle klinische studies systematisch en bij voorkeur op een uniforme manier het optreden van ISRS moeten rapporteren om zo de gedeelde kennis te vergroten.

Het gunstige profiel van ISIS 388626 in dierproeven, gecombineerd met de recente succesvolle ontwikkeling van andere SGLT2 remmers, maakte ISIS 388626 een veelbelovend kandidaat-geneesmiddel. De SGLT2 remmers die momenteel op de markt zijn hebben de beperking dat er niet meer dan 50% remming van terug reabsorptie van gefiltreerd glucose wordt bereikt. Mogelijk door een compensatoire toename van SGLT1 activiteit. Het blijft onduidelijk of een maximaal farmacodynamisch effect van antisense remming van SGLT2 dit plafond zou overstijgen. Echter, de onverwachte en onbegrepen effecten op de nier van ISIS 388626, maakt het klinisch testen van hogere doseringen onacceptabel vanuit een veiligheidsperspectief. Om deze reden is de klinische ontwikkeling stopgezet.

In het algemeen zijn antisense oligonucleotiden een aantrekkelijke klasse geneesmiddelen. Ze zijn 'op maat gemaakt', zeer specifiek voor het doeleiwit, en bewerkstelligen remming op een geheel ander niveau dan

klassieke geneesmiddelen door te interfereren met synthese van eiwit. Maar de belofte die uitging van vele kandidaat-geneesmiddelen van deze klasse die klinisch werden getest heeft nog niet tot veel successen geleid. Momenteel is mipomersen het enige geregistreerde oligonucleotide. Dit wordt gebruikt voor de behandeling van patiënten met een homozygote familiale hypercholesterolemie. Er is een aantal belangrijke uitdagingen te overwinnen om bredere implementatie van oligonucleotide therapie in de klinische praktijk te bereiken. Enkele uitdagingen zijn geïllustreerd in dit proefschrift. Accumulatie van oligonucleotiden lijkt een rol te spelen bij zowel de nadelige effecten op nier als bij de huid-effecten. Alternatieve toedieningsroutes worden onderzocht, waarbij bijvoorbeeld ISRs zouden kunnen worden voorkomen door orale toediening [24]. De mate van accumulatie in de nier hangt af van de chemische structuur [5;25;26]. Dit zou meegewogen moeten worden in toekomstige studies met oligonucleotiden. Strategieën om accumulatie te voorkomen zijn bijvoorbeeld het veranderen van de distributie eigenschappen door het gebruik van oligonucleotide conjugaten, zoals peptiden, proteïnes, koolhydraten en aptameren [27]. De nauwe grens tussen accumulatie die nodig is om effect te bewerkstelligen en de accumulatie die toxiciteit geeft zou verder moeten worden bestudeerd. Preklinische en vroege klinische studies zouden zich moeten richten op het vermijden van ongewenste effecten. Dit zou de weg kunnen banen voor oligonucleotiden met een beter profiel, geschikt voor chronisch gebruik en toepasbaar voor brede patiënt groepen.

REFERENCES

- Dias N, Stein CA: Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms. *Mol Cancer Ther* 2002;1:347-355.
- Plosker GL: Dapagliflozin: a review of its use in type 2 diabetes mellitus. *Drugs* 2012;72:2289-2312.
- Sha S, Devineni D, Ghosh A, Polidori D, Hompesch M, Arnolds S, Morrow L, Spitzer H, Demarest K, Rothenberg P: Pharmacodynamic effects of canagliflozin, a sodium glucose co-transporter 2 inhibitor, from a randomized study in patients with type 2 diabetes. *PLoS One* 2014;9:e110069.
- Jahagirdar V, Barnett AH: Empagliflozin for the treatment of type 2 diabetes. *Expert Opin Pharmacother* 2014;15:2429-2441.
- Zanardi TA, Han SC, Jeong EJ, Rime S, Yu RZ, Chakravarty K, Henry SP: Pharmacodynamics and Subchronic Toxicity in Mice and Monkeys of ISIS 388626, a Second Generation Antisense Oligonucleotide that Targets the Human Sodium Glucose Cotransporter 2 (SGLT2). *J Pharmacol Exp Ther* 2012.
- Bhanot Sea: ISIS 388626, an SGLT2 antisense drug, causes robust and sustained glucosuria in multiple species and is safe and well-tolerated.; 2009.
- Wanczewicz E: Long term safety and efficacy of ISIS 388626, an optimized SGLT2 antisense inhibitor, in multiple diabetic and euglycemic species.; 2008.
- Akdim F, Stroes ES, Sijbrands EJ, Tribble DL, Trip MD, Jukema JW, Flaim JD, Su J, Yu R, Baker BF, Wedel MK, Kastelein JJ: Efficacy and safety of mipomersen, an antisense inhibitor of apolipoprotein B, in hypercholesterolemic subjects receiving stable statin therapy. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:1611-1618.
- Visser ME, Kastelein JJ, Stroes ES: Apolipoprotein B synthesis inhibition: results from clinical trials. *Curr Opin Lipidol* 2010;21:319-323.
- McHutchison JG, Patel K, Pockros P, Nyberg L, Pianko S, Yu RZ, Dorr FA, Kwok TJ: A phase I trial of an antisense inhibitor of hepatitis C virus (ISIS 14803), administered to chronic hepatitis C patients. *J Hepatol* 2006;44:88-96.
- Bhanot Sea: ISIS 388626, an SGLT2 antisense drug, causes robust and sustained glucosuria in multiple species and is safe and well-tolerated.; 2009.
- Kasichayanula S, Liu X, Lacreata F, Griffen SC, Boulton DW: Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Dapagliflozin, a Selective Inhibitor of Sodium-Glucose Co-transporter Type 2. *Clin Pharmacokinet* 2013.
- Sha S, Devineni D, Ghosh A, Polidori D, Chien S, Wexler D, Shalayda K, Demarest K, Rothenberg P: Canagliflozin, a novel inhibitor of sodium glucose co-transporter 2, dose dependently reduces calculated renal threshold for glucose excretion and increases urinary glucose excretion in healthy subjects. *Diabetes Obes Metab* 2011;13:669-672.
- Grempler R, Thomas L, Eckhardt M, Himmelsbach F, Sauer A, Sharp DE, Bakker RA, Mark M, Klein T, Eickelmann P: Empagliflozin, a novel selective sodium glucose cotransporter-2 (SGLT-2) inhibitor: characterisation and comparison with other SGLT-2 inhibitors. *Diabetes Obes Metab* 2012;14:83-90.
- Komoroski B, Vachharajani N, Boulton D, Kornhauser D, Galdes M, Li L, Pfister M: Dapagliflozin, a novel SGLT2 inhibitor, induces dose-dependent glucosuria in healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther* 2009;85:520-526.
- Ptaszynska A, Johnsson KM, Parikh SJ, de Bruin TW, Apanovitch AM, List JF: Safety profile of dapagliflozin for type 2 diabetes: pooled analysis of clinical studies for overall safety and rare events. *Drug Saf* 2014;37:815-829.
- Goemans NM, Tulinius M, van den Akker JT, Burm BE, Ekhart PF, Heuvelmans N, Holling T, Janson AA, Platenburg GJ, Sipkens JA, Sitsen JM, Aartsma-Rus A, van Ommen GJ, Buyse G, Darin N, Verschuuren JJ, Campion GV, de Kimpe SJ, van Deutekom JC: Systemic administration of PRO051 in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 2011;364:1513-1522.
- Herrington WG, Talbot DC, Lahn MM, Brandt JT, Callies S, Nagle R, Winearls CG, Roberts IS: Association of long-term administration of the survivin mRNA-targeted antisense oligonucleotide LY2181308 with reversible kidney injury in a patient with metastatic melanoma. *Am J Kidney Dis* 2011;57:300-303.
- van Poelgeest EP, Swart RM, Betjes MG, Moerland M, Weening JJ, Tessier Y, Hodges MR, Levin AA, Burggraaf J: Acute Kidney

- Injury During Therapy With an Antisense Oligonucleotide Directed Against PCSK9. *Am J Kidney Dis* 2013.
- 20 Santos RD, Duell PB, East C, Guyton JR, Moriarty PM, Chin W, Mittleman RS: Long-term efficacy and safety of mipomersen in patients with familial hypercholesterolaemia: 2-year interim results of an open-label extension. *Eur Heart J* 2013.
 - 21 van Dongen MG, Geerts BF, Morgan ES, Brandt TA, de Kam ML, Romijn JA, Cohen AF, Bhanot S, Burggraaf J: First proof of pharmacology in humans of a novel glucagon receptor antisense drug. *J Clin Pharmacol* 2014.
 - 22 Kwoh TJ, Crooke ST: *Antisense Drug Technology: Principles, Strategies, and Applications; An overview of clinical safety experience of first- and second-generation antisense oligonucleotides*. Boca Raton, Taylor & Francis, 2007, pp 365-399.
 - 23 van Meer L, Moerland M, Cohen AF, Burggraaf J: Urinary kidney biomarkers for early detection of nephrotoxicity in clinical drug development. *Br J Clin Pharmacol* 2014;77:947-957.
 - 24 van PM, Young C, van den Berg S, Pronk A, Hulsker M, Karnaoukh TG, Vermue R, van Dijk KW, de KS, Aartsma-Rus A: Preclinical studies on intestinal administration of antisense oligonucleotides as a model for oral delivery for treatment of duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther Nucleic Acids* 2014;3:e211.
 - 25 Monteith DK, Horner MJ, Gillett NA, Butler M, Geary R, Burckin T, Ushiro-Watanabe T, Levin AA: Evaluation of the renal effects of an antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotide in monkeys. *Toxicol Pathol* 1999;27:307-317.
 - 26 Henry SP, Johnson M, Zanardi TA, Fey R, Auyeung D, Lappin PB, Levin AA: Renal uptake and tolerability of a 2'-O-methoxyethyl modified antisense oligonucleotide (1S1S 113715) in monkey. *Toxicology* 2012;301:13-20.
 - 27 Winkler J: Oligonucleotide conjugates for therapeutic applications. *Ther Deliv* 2013;4:791-809.

