

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/36116> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Verhaar, Auke

Title: The development of novel anti-inflammatory drugs for IBD

Issue Date: 2015-11-12

11

Nederlandse Samenvatting van dit proefschrift

Nederlandse samenvatting van dit proefschrift

Hoofdstuk 1

Het eerste hoofdstuk is een eenvoudige introductie op glucocorticoïden (GC) in het algemeen. Hierin worden de voor- en nadelen van behandeling met GC kort opgesomd, een beeld schetsend van de problemen die men kan verwachten bij het ontwikkelen van nieuwe veilige GC.

Hoofdstuk 2

GC afgeleiden zijn al meer dan 50 jaar in omloop. Net als met zoveel medicijnen, zijn GCs niet ontwikkeld met als doel ontsteking te remmen. De isolatie, karakterisatie en verdere ontwikkeling van GCs werden gedurende de WOII aangewakkerd door een gerucht. Om te voorkomen dat de tegenstander een voordeel kreeg werd door de geallieerden op grote schaal onderzoek verricht, hetgeen er uiteindelijk toe leidde dat vlak na de oorlog een eerste batch GCs geïsoleerd werd. Toen bleek dat de geruchten nergens op gebaseerd waren, hadden de GCs ineens geen nut meer. Om de enorme investering te rechtvaardigen werd de paar milligram die er op dat moment was, verdeeld onder de beste wetenschappers om zo alsnog een doel te vinden. Uiteindelijk was het Phillip S. Hench die als eerste GCs testte op patiënten met reumatoïde artritis en zo de ontstekingsremmende werking ontdekte.

Hoofdstuk 3

Het enorme nadeel van GCs als medicijn is het bestaan van de vele bijwerkingen. Was het niet voor deze bijwerkingen dan zou het medicijn bijna ideaal te noemen zijn. De meeste bijwerkingen hebben geen gevolgen voor de lange termijn en kunnen in het algemeen worden genegeerd. Maar bij gebruik in hoge concentraties of voor langere perioden neemt de ernst en het aantal bijwerkingen toe. Als uiteindelijk blijkt dat ontwikkeling van een veilige GC zonder bijwerkingen niet mogelijk is, zal basale kennis over het ontstaan van deze bijwerkingen essentieel zijn. Deze kennis kan vervolgens gebruikt worden om manieren te bedenken om de bijwerkingen zelf te bestrijden.

In de afgelopen jaren heeft biomedische wetenschap veel voordeel behaald uit de ontwikkeling van vele nieuwe onderzoeksmethoden in de verschillende velden zoals genetica en proteomics. Hierdoor is onze kennis

op het gebied van GC werking en bijwerking enorm toegenomen. Dit hoofdstuk is een overzicht van wat bekend is over de onderliggende moleculaire mechanismen van de verschillende bijwerkingen. De verschillende bijwerkingen worden apart besproken waarbij wordt gefocust op de belangrijkste meer algemene bijwerkingen. Daaronder vallen overgewicht, verdunnen van de huid en het ontstaan van striae, spier atrofie, osteoporose, diabetes, hypertensie, staar en glaucoma, en als laatste effecten op het centrale zenuw stelsel. Over het geheel genomen kan worden geconstateerd dat de bijwerkingen het grootst zijn in weefsels waar GCs een rol spelen in de normale homeostase.

Hoofdstuk 4

Vanaf het eerste moment dat GC de kliniek betraden is er aan de moleculen gesleuteld om ze te verbeteren, hetgeen erin heeft geresulteerd dat er tegenwoordig een hele selectie aan GC analogen op de markt is. Aanvankelijk richtte men zich vooral op het vergroten van de ontstekingsremmende werking door de halfwaardetijd te verlengen, gevolgd door een reductie in bijwerkingen middels vergroting van de specificiteit voor de GR en een reductie in binding aan andere nucleaire hormoonreceptoren zoals de mineralocorticoïde receptor. Alhoewel deze aanpak inderdaad meer potente GCs opleverde en een reductie in de bijwerkingen die gerelateerd zijn aan binding en activatie van andere nucleaire hormoonreceptoren, resulteerde het tevens in een toename van GR specifieke bijwerkingen. De laatste jaren zijn we beter gaan begrijpen hoe GCs werken. En met de toename van kennis veranderen ook de zaken waar we rekening mee houden bij de ontwikkeling van nieuwe GCs. Nog maar enkele jaren geleden waren veel wetenschappers van mening dat GCs pro-inflammatoire genen remden terwijl alle bijwerkingen het gevolg waren van activatie van genen en dat dit uitgebuit kon worden om zo een veilig GC te ontwikkelen. Dit hoofdstuk bespreekt kort wat we op dit moment weten over hoe GCs werken en waarmee rekening gehouden moet worden bij ontwikkeling van GCs met betere eigenschappen.

Hoofdstuk 5

Het klassieke beeld van hoe GCs werken is dat ze genen reguleren. Dit mechanisme vereist een zekere hoeveelheid tijd voordat het effect waargenomen kan worden. Maar het is niet ongewoon voor GC effecten om veel eerder waar genomen te kunnen worden. Artrose patiënten

kunnen worden behandeld via een injectie met GCs in het ontstoken gewricht. De pijnverlichting die volgt is vaak onmiddellijk. Dit is slechts één voorbeeld van GC effecten die te snel plaats vinden om te kunnen worden toegeschreven aan genregulatie. Omdat deze effecten ontstaan zonder dat daar transcriptionele regulatie bij betrokken is, worden zij niet-transcriptionele- of niet-genomische effecten genoemd.

Dit hoofdstuk beschrijft de snelle effecten van GC behandeling op T lymfocyten en dan specifiek die effecten die betrekking hebben op een complex van eiwitten dat geassocieerd is met de T cel receptor (TCR). In een vorige studie[1] werd het kinoom van geactiveerde en met GCs behandeld T lymfocyten bestudeerd. Daaruit bleek dat twee kinases LCK en FYN geremd werden in hun activatie door een korte behandeling met GCs. Deze kinases, LCK met name, zijn de eerste boodschappers die het signaal van de TCR door geven. Daardoor is LCK doorslag gevend voor T cel activatie. T cellen die geen LCK tot expressie kunnen brengen, kunnen niet worden geactiveerd via de TCR[2].

Dit hoofdstuk beschrijft hoe, na stimulatie van T cellen, een complex wordt gevormd bij de TCR. In dit complex is LCK geassocieerd met CD4 en FYN met CD3. Beide zijn geassocieerd met het chaperonne eiwit Hsp90 en de GR. Wanneer gestimuleerde T cellen worden behandeld met GCs, worden al deze interacties verbroken. Uitgaande van deze bevindingen wordt een model voorgesteld waarin de GR een essentieel onderdeel vormt van het TCR gerelateerde complex. Wanneer de GR ligand bindt, verbreekt deze zijn verbindingen met de andere eiwitten in het complex en verlaat deze om naar de kern te kunnen. Hierdoor raakt het hele complex gedestabiliseerd, verliezen alle eiwitten hun onderlinge verbindingen en valt het complex uiteen. Het uiteindelijke resultaat is blokkade van TCR signalering.

Hoofdstuk 6

Een ander aspect van GCs dat, naast de bijwerkingen, nadelig is voor het medicijn, is verlies van gevoeligheid van de patiënt voor de behandeling. Deze patiënten groep kan worden onderverdeeld in aparte groepen met verschillende onderliggende mechanismen verantwoordelijk voor dit verlies. De oorzaak kan zijn een verhoogde klaring van GCs, verhoogde expressie van pro-inflammatoire transcriptie factoren, gewijzigde post-translationele modificatie van de GR, defecte histon acetylactie en als

laatste overexpressie van de dominant negatieve beta vorm van de GR. *In vitro* is het mogelijk om steroïde ongevoeligheid te induceren door T lymfocyten te stimuleren met super-antigenen. Dit hoofdstuk beschrijft hoe het super-antigen staphylococcal enterotoxin B (SEB) T cellen stimuleert via een signaal transductie pad dat afwijkt van de normale TCR-LCK gemedieerde activatie. Deze route bevat guanine nucleotide-bindend proteïne Gαq en de fosfolipase PLCβ2 en voegt zich weer bij de TCR-LCK gemedieerde route op het niveau van proteïne kinase C (PKC). Stimulatie van T cellen met SEB resulteert in een celdeling die minder gevoelig is voor behandeling met GC dan wanneer deze cellen met een normaal antigeen gestimuleerd zouden zijn. Directe activatie van PKC met de forbol ester PMA in combinatie met de ionofoor ionomycine resulteert in celdeling die geheel resistent is tegen GC behandeling. Te samen suggereren deze resultaten dat het remmende effect van GC op T lymfocyt deling berust op een niet-transcriptioneel effect van GC behandeling. Dit plaatst de relevantie van de niet-transcriptionele effecten van GC behandeling, voor het gehele anti-inflammatoire effect, in een heel nieuw daglicht.

Hoofdstuk 7

Remming van T lymfocyt deling door GC behandeling is een van de belangrijkste onderdelen van het totale ontstekingsremmende effect van GCs. De bevindingen zoals beschreven in het vorige hoofdstuk suggereren dat dit berust op een niet-genomisch effect. Dit hoofdstuk beschrijft hoe, door een combinatie van *in silico* en *in vitro* screening, twee GR liganden werden gevonden die geen transcriptionele effecten induceren maar wel dissociatie van TCR geassocieerde moleculen leidend tot remming van T lymfocyt deling.

Voor de screening werden potentiële liganden geselecteerd uit een publieke database van commercieel verkrijgbare stoffen. Selectie van de stoffen werd gebaseerd op basis van overeenkomsten met de basale structuur van cortisol ook wel gonane genoemd. Dit resulteerde in een kwart miljoen potentiële kandidaten die in een tweede ronde van selectie werden gepast in een virtuele GR bindingsholte, gebaseerd op vier bekende GR conformaties. De stoffen die het best pasten werden geselecteerd en daarvan werden er 80 gekocht. Elke stof werd vervolgens getest voor de capaciteit om T lymfocyt deling te remmen. Gebruik makend van een cellijn die stabiel getransfecteerd is met een glucocorticoid receptor bindend reporter construct, werden alle stoffen die

transcriptionele regulatie induceerde geëxcludeerd. Met deze strategie werden er twee GR liganden gevonden, S3.1 en S3.4, die in staat waren T lymfocyt deling te remmen met een potentie gelijk aan prednisolon maar zonder de transcriptionele activatie. Verdere studie toonde aan dat dit effect gelijk was aan het effect zoals eerder beschreven bij dexamethason. Maar anders dan dexamethason, induceerde deze stoffen geen vervetting of spier atrofie zoals getest met *in vitro* assays.

Hoofdstuk 8

Op zoek naar een remmer van PLC β (hoofdstuk 5) kwamen we het medicijn miltefosine tegen. Zoals eerder gerapporteerd[3] remde miltefosine PLC β maar niet heel specifiek. Het viel ons echter wel op dat miltefosine een sterk remmend effect op T lymfocyt deling had en vroegen ons af of miltefosine als een ontstekingsremmer gebruikt kon worden. Bij chronische ontstekingsziekten van het maag-darm kanaal spelen T lymfocyten een belangrijke rol[4]. Door middel van een zogenaamd CD4 transfer muizen model werd miltefosine getest als middel om chronische ontsteking te remmen. De SCID muizen in dit model hebben geen T en B cellen en wanneer deze worden vervangen door een repertoire van alleen T effector cellen leidt dit naar verloop van tijd tot een chronische ontsteking van de dikke darm. Het niveau van ontsteking werd bepaald door gewicht en lengte van de dikke darm, toestand van de uitwerpselen, gewicht van de milt, pathologische score, influx in de dikke darm van macrofagen, neutrofielen en T cellen en als laatste de toename van lokale cytokines. Orale behandeling met miltefosine wist de ontsteking significant te remmen.

Hoofdstuk 9

Miltefosine (of hexadecylfosfocholine) werd oorspronkelijk ontwikkeld als behandeling voor kanker maar faalde in de meeste klinische trials door het uitblijven van significante verbetering van de conditie van de patiënten. Uiteindelijk bleek miltefosine alleen geschikt als topicale behandeling voor huid metastasen van patiënten met borstkanker. Maar net toen miltefosine in de vergetelheid dreigde te raken werd ontdekt dat deze stof een uitstekende behandeling is voor patiënten met viscerale Leishmaniasis. Deze parasitaire ziekte is relatief onbekend in de westerse wereld omdat de ziekte alleen financieel minder ontwikkelde gebieden treft rond de evenaar. Dit komt omdat de ziekte verspreidt wordt door een type

zandvlieg die alleen in die gebieden voor komt. Niettemin is Leishmaniasis, op malaria na, de belangrijkste dodelijke parasitaire aandoening wereldwijd met een geschat aantal van 25.000 dodelijke slachtoffers elk jaar. Een effectieve behandeling bestond reeds maar vereiste een arts om het middel toe te dienen. Miltefosine kan oraal worden ingenomen en is relatief goedkoop om te maken.

Dit hoofdstuk zoemt met name in op wat bekend is over miltefosine als remmer van het immuun systeem en de cellen die daartoe behoren. Over het geheel genomen kunnen die publicaties in drie groepen worden verdeeld. Effect op macrofagen, effect op mast cellen en effect op T cellen. Deze data wordt vervolgens gebruikt om het verder testen van miltefosine als ontstekingsremmer te onderbouwen. Als laatste wordt het werkingsmechanisme van miltefosine voor zover bekend besproken.

Referentie lijst

1. Lowenberg, M., et al., *Kinome analysis reveals nongenomic glucocorticoid receptor-dependent inhibition of insulin signaling*. Endocrinology, 2006. **147**(7): p. 3555-62.
2. Wange, R.L. and L.E. Samelson, *Complex complexes: signaling at the TCR*. Immunity, 1996. **5**(3): p. 197-205.
3. Ward, P.D., H. Ouyang, and D.R. Thakker, *Role of phospholipase C-beta in the modulation of epithelial tight junction permeability*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2003. **304**(2): p. 689-98.
4. Funderburg, N.T., et al., *Circulating CD4(+) and CD8(+) T cells are activated in inflammatory bowel disease and are associated with plasma markers of inflammation*. Immunology, 2013. **140**(1): p. 87-97.

