



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Evaluation of molecular profiling platforms in clinical pharmacology

Doorn, M.B.A. van

Citation

Doorn, M. B. A. van. (2007, May 24). *Evaluation of molecular profiling platforms in clinical pharmacology*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/11974>

Version: Corrected Publisher's Version

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/11974>

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

CHAPTER 12

*Nederlandse inleiding, samenvatting
en conclusies*

Sectie 1

Het eerste gedeelte van dit proefschrift bestaat uit twee hoofdstukken. In Hoofdstuk 1 wordt de globale opzet en context van het proefschrift uiteengezet en in Hoofdstuk 2 wordt meer achtergrondinformatie over de twee in dit proefschrift geëvalueerde onderzoeksmethoden (cDNA microarrays en ^1H NMR spectrometrie) gepresenteerd. Hieronder volgt eerst de Nederlandse inleiding van het proefschrift.

Inleiding

Een belangrijk probleem bij het beschikbaar komen van nieuwe of verbeterde geneesmiddelen is de lange tijd die nodig is om een kandidaat-geneesmiddel te ontwikkelen en te testen. Van een grote hoeveelheid nieuwe chemische verbindingen ('kandidaat-geneesmiddelen'), zal op verschillende punten in het ontwikkelingstraject moeten worden vastgesteld welke van deze de grootste kans lijken te hebben op klinisch succes. Of beter gezegd, er zal bepaald moeten worden welke van deze kandidaat-geneesmiddelen de *minste* kans lijken te hebben op succes. Van deze 'low potential' kandidaat-geneesmiddelen moet de ontwikkeling uiteraard zo snel mogelijk worden gestopt. Hierdoor kunnen veel kosten worden bespaard en kan de blootstelling van deze experimentele middelen aan proefpersonen worden beperkt. Belangrijke vertraging in het ontwikkelingstraject wordt vaak opgelopen tijdens de onderzoeken waarin het kandidaat-geneesmiddel voor het eerst aan de mens wordt toegediend.

Bij de vroege klinische evaluatie van een kandidaat-geneesmiddel is het niet alleen van belang dat er wordt onderzocht of het middel veilig is en hoe het zich in het lichaam gedraagt ('farmacokinetiek'), maar ook of het middel de gewenste effecten in het lichaam heeft ('farmacodynamiek') zonder te veel of ernstige bijwerkingen ('safety'). Deze eerste onderzoeken in de mens hebben dus eigenlijk tot doel zo snel en efficiënt mogelijk het kaf (onwerkzame of onveilige stoffen) van het koren (veelbelovende stoffen) te scheiden.

De beoogde werkzaamheid van een kandidaat-geneesmiddel in de mens, wordt vaak geëvalueerd door de effecten van het middel op een beperkte selectie biochemische merkstoffen of 'biomarkers' te onderzoeken. Voor een geneesmiddel dat bijvoorbeeld bedoeld is om 'ouderdoms-suiker' (Diabetes Mellitus type 2) te behandelen, wordt vaak als maat voor werkzaamheid van het geneesmiddel de mate van

daling van de suiker concentratie (glucose spiegel) in het bloed gemeten. Een van de nadelen van deze methode is de relatief lange tijd die nodig is om een betrouwbare daling van de glucose spiegel te kunnen meten. Dit kan soms wel tussen de 6 en 12 weken duren. Dit betekent dat de patiënten die hun medewerking verlenen aan een dergelijk onderzoek relatief lang aan het experimentele geneesmiddel zullen moeten worden blootgesteld. Een ander nadeel van deze conventionele methode is de relatief beperkte informatie die een enkelvoudige meting van de glucose spiegel verschaft. Het geeft namelijk slechts informatie over het 'eind-effect' maar vertelt ons niet hoe het geneesmiddel dit effect heeft bewerkstelligd. Met andere woorden, het werkingsmechanisme van het geneesmiddel blijft verscholen in de zogenaamde 'black box'.

Daarnaast is het de laatste jaren steeds duidelijker geworden dat veel geneesmiddelen vaak meer dan één effect in het lichaam hebben. Dit is niet alleen af te leiden uit de zogenaamde 'bijwerkingen' die bij het gebruik van een geneesmiddel kunnen optreden, maar ook het beoogde gezondheidseffect blijkt vaak op een combinatie van verschillende heilzame werkingsmechanismen te berusten. Het ligt dan ook voor hand te concluderen dat deze samengestelde effecten moeilijk in kaart kunnen worden gebracht met de huidige 'één geneesmiddel, één merkstof' aanpak.

Een betere uitleesmaat voor de evaluatie van een geneesmiddel zou theoretisch kunnen worden verkregen door een groter aantal snel reagerende 'biomarkers' te meten, die nauw met elkaar samenhangen en waarvan de veranderingen een mechanistische afspiegeling zijn van de samengestelde effecten die het geneesmiddel teweegbrengt.

In de afgelopen jaren zijn er verschillende 'moleculaire technieken' ontwikkeld die het mogelijk maken om deze grote hoeveelheid aan effecten op snelle en efficiënte wijze te kunnen meten. Deze worden ook wel '-omics' technieken genoemd met als meest bekende vertegenwoordigers de 'transcriptomics', 'metabolomics', en 'proteomics' platformen. In dit proefschrift worden twee van deze moleculaire technieken (transcriptomics and metabolomics) getoetst op hun bruikbaarheid voor de uiteindelijke evaluatie van de werkzaamheid van kandidaat-geneesmiddelen bij hun eerste toediening aan de mens.

Voordat de werking van deze technieken kort wordt uitgelegd, volgt eerst een uiteenzetting over de werking van de geneesmiddelen (peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) agonisten) die in dit proefschrift werden gebruikt als 'prototype' voor de desbetreffende geneesmiddelklasse.

In het algemeen wordt een geneesmiddel na inname via de mond, vanuit de darm in het bloed opgenomen en naar het doelweefsel getransporteerd waar het zijn werking uitoefent. In het geval van de geneesmiddelen die in dit proefschrift werden onderzocht zijn dat (voor zover bekend) m.n. het vet-, lever- en spierweefsel. Aangekomen in het doelweefsel zal dit type geneesmiddel een receptor ('aan-knop') in de celkern activeren waardoor verschillende codes (genen) in het erfelijk materiaal (DNA) in meer of mindere mate zullen worden afgelezen. Tijdens dit aflezen wordt er een verscheidenheid aan boodschapperstoffen (mRNA) geproduceerd. Deze boodschapperstoffen worden vervolgens naar de ribosomen (plaats waar eiwitproductie plaatsvindt) getransporteerd waar deze als mal dienen voor het maken van verschillende eiwitten. Deze eiwitten zijn uiteindelijk in staat bepaalde (ziekte-)processen in de doelcellen of cellen elders in het lichaam te beïnvloeden. Dit proces noemt men ook wel 'gen-expressie'. Uiteindelijk zullen de nieuwgevormde eiwitten worden afgebroken tot kleine brokstukken ('metabolieten') die - bij volledige afbraak tot aminozuren - weer als bouwstof voor nieuwe eiwitten kunnen dienen of b.v. via de urine kunnen worden afgevoerd.

CDNA microarray technologie is de eerste techniek die in dit proefschrift werd onderzocht en is ook wel bekend onder de naam 'Gene-Chip' technologie. Deze techniek is in staat in één experiment (in principe) alle boodschapperstoffen (mRNA) in een menselijk cel of weefsel op een bepaald tijdstip te meten. Door het experiment eenmaal vóór en eenmaal na behandeling met een geneesmiddel uit te voeren, kan men dus in theorie vaststellen welke boodschapperstoffen meer of minder worden aangemaakt onder invloed van het geneesmiddel. Omdat te verwachten valt dat het effect op deze boodschapperstoffen zeer snel zal optreden, zou dit een snel reagerende, brede uitleesmaat kunnen opleveren voor de effecten van een kandidaat-geneesmiddel in de mens.

De tweede techniek (^1H NMR metabolomics) kan worden gebruikt om in één experiment een groot aantal metabolieten in de cel of een willekeurige lichaamsvloeistof (b.v. bloed of urine) te meten. Net als bij de microarray techniek kan door het experiment tweemaal (of vaker) uit te voeren worden vastgesteld hoe de hoeveelheid en samenstelling van de verschillende metabolieten in de lichaamsvloeistof verandert onder invloed van een ziekte of geneesmiddel. Daar vrij snel na het 'aanzetten' van de receptor veranderingen in de productie van zowel soort als hoeveelheid eiwit zullen optreden, zullen ook de veranderingen in metaboliet concentraties in theorie snel meetbaar zijn. Een bijkomend

voordeel van deze techniek is dat lichaamsvloeistoffen zoals bloed en met name urine in tegenstelling tot weefselbiopten zeer makkelijk te verkrijgen zijn.

Uiteraard is het ook mogelijk de verschillende soorten en hoeveelheid van de eiwitten zelf te bepalen. De bruikbaarheid van deze techniek ('proteomics') werd echter in dit proefschrift niet onderzocht.

In dit proefschrift werd onderzocht of het met deze nieuwe moleculaire technieken mogelijk is om een groot arsenaal aan snel reagerende 'biomarkers' (boodschapperstoffen en metabolieten) te vinden die zouden kunnen worden gebruikt bij de vroege evaluatie van nieuwe kandidaat-geneesmiddelen in de mens. Een voorwaarde voor de toepasbaarheid van deze methode is wel dat het toekomstige kandidaat-geneesmiddel op een vergelijkbare manier werkt als het prototype geneesmiddel uit een bepaalde klasse. Door dus eerst een prototype te onderzoeken kan een grote verscheidenheid aan biomarkers worden ontdekt ('vingerafdruk' van het geneesmiddel) die uiteindelijk kunnen worden gebruikt om te zien of het nieuwe kandidaat-geneesmiddel de te verwachten werking in de mens heeft.

In dit proefschrift onderzochten wij daarom de effecten van een behandeling met twee prototype geneesmiddelen (rosiglitazone en ciprofibrat) in vergelijking met een placebo ('nep' geneesmiddel) behandeling. Deze prototype middelen behoren tot dezelfde familie (de PPARs), hebben een vergelijkbaar werkingsmechanisme (ze activeren een receptor in de celkern), maar hebben verschillende biologische effecten.

PPAR α agonisten zijn middelen die een heilzaam effect hebben op de samenstelling van de bloedvetten ('lipiden profiel'). Na behandeling met een van deze middelen treedt een verlaging op van de triglyceriden spiegel en het totaal cholesterol ('slechte cholesterol') gehalte in het bloed. Daarnaast zorgen deze middelen voor een verhoging van het HDL-cholesterol ('goede cholesterol') in het bloed.

PPAR γ agonisten zijn middelen die met name de glucosespiegels in het bloed verlagen. Zij doen dit door bij patiënten met Diabetes Mellitus type 2 de aanwezige 'insulineresistentie' in vet- en spierweefsel te verminderen. 'Insulineresistentie' betekent dat het hormoon insuline in de weefsels onvoldoende zijn werk kan doen waardoor glucose niet goed kan worden opgenomen. Naast het verminderen van de insulineresistentie zorgen deze middelen ook voor een vermindering van de glucose productie door lever.

Daar beide geneesmiddelen o.a. hun toepassing vinden bij de behandeling van Diabetes Mellitus type 2 (patiënten met suikerziekte hebben namelijk ook vaak een hoger totaal cholesterol en triglyceriden in combinatie met een verlaagd HDL-cholesterol) werden de beschreven experimenten juist in deze groep verricht. Daarnaast werden de experimenten in een groep gezonde vrijwilligers uitgevoerd, met als belangrijkste doel te onderzoeken of de te verwachten effecten ook in deze makkelijker te rekruteren en te bestuderen groep konden worden gevonden. Omdat er in deze studies twee verschillende groepen parallel werden onderzocht was het ook mogelijk te kijken naar verschillen tussen de twee groepen. M.a.w. het ontwerp van de onderzoeken in dit proefschrift gaf ons de mogelijkheid te zien of er een verschil in hoeveelheid en soort biomarker stoffen kon worden gevonden tussen de Diabetes patiënten en de gezonde vrijwilligers. Dit zou ons mogelijk meer informatie kunnen verschaffen over het ontstaan en de gevolgen van Diabetes Mellitus type 2 ('vingerafdruk' van de ziekte).

Sectie 2

Het tweede gedeelte van het proefschrift (Hoofdstuk 3 en 4) bestaat uit een aantal experimenten dat werd uitgevoerd om de werkzaamheid van de twee prototype geneesmiddelen (de PPAR γ agonist rosiglitazone en de PPAR α agonist ciprofibrat) aan te tonen, door eerst de 'conventionele' biomarkers in het bloed van de patiënten met Diabetes Mellitus type 2 en gezonde vrijwilligers te meten. De resultaten van deze experimenten lieten zien dat beide geneesmiddelen goed door de proefpersonen waren ingenomen. Er waren vergelijkbare spiegels van het geneesmiddel in het bloed van de patiënten en gezonde vrijwilligers. Daarnaast was er een goede response te zien op de (conventionele) biochemische biomarkers. Aan de hand van deze resultaten concludeerden wij dat er voor een valide studieopzet was gekozen.

Sectie 3

Het vierde gedeelte van het proefschrift beschrijft de evaluatie van cDNA microarray technologie ('transcriptomics') als methode om nieuwe biomarkers te vinden voor de twee prototype-geneesmiddelen.

Omdat voor deze onderzoeken bloed (voor witte bloedcellen) en weefselmonsters (vet- en spierweefsel) moesten worden afgenomen

werd eerst een voor-onderzoek ('pilot') uitgevoerd. In dit onderzoek werd de belasting van de biopsie-technieken voor de proefpersonen onderzocht. Daarnaast werd de kwaliteit van de methode om de boodschapperstoffen uit het weefsel en witte bloedcellen te halen onderzocht (Hoofdstuk 5). Vervolgens werd de effectiviteit van onze methode om slechte monsters ('outliers') van goede monsters te onderscheiden geëvalueerd.

De resultaten van dit vooronderzoek lieten zien dat de biopsie-technieken goed werden verdragen door de proefpersonen. Ook konden er voldoende boodschapperstoffen van goede kwaliteit uit de weefselbiopten worden verkregen en bleek onze methode om 'outliers' te detecteren adequaat te werken.

Vervolgens kon het eerste onderzoek worden gestart waarin de effecten van het bloedsuiker verlagende geneesmiddel rosiglitazone (PPAR γ agonist) op de boodschapperstoffen in vet-, spier en witte bloedcellen werden onderzocht (Hoofdstuk 6). Daarnaast werden de verschillen tussen Diabetes patiënten en gezonde vrijwilligers onderzocht. De resultaten van deze studie lieten zien dat met de huidige onderzoeksopzet en techniek geen duidelijke (en dus bruikbare) effecten van rosiglitazone op de boodschapperstoffen in de onderzochte doelweefsels kon worden gevonden. Het was daarentegen wel mogelijk om duidelijke verschillen in boodschapperstoffen tussen de Diabetes patiënten en gezonde vrijwilligers aan te tonen in zowel vet- als spierweefsel. Vervolgens liet een meer uitgebreide analyse ('gene network' en 'biological pathway' analyse) zien dat deze nieuwe ontdekte 'ziekte-gerelateerde' boodschapperstoffen een belangrijke biologische of functionele samenhang met elkaar vertoonden. Sommige van deze stoffen behoorden tot bepaalde biologische processen die mogelijk door of tengevolge van de ziekte meer of minder actief waren geworden.

In het hieropvolgende onderzoek met het cholesterol verlagende geneesmiddel ciprofibrat (PPAR α agonist) werden vergelijkbare resultaten gevonden (Hoofdstuk 7). Ook in deze studie konden geen duidelijke effecten van het geneesmiddel op de hoeveelheid en samenstelling van de boodschapperstoffen in de doelweefsels worden gevonden. Net als in de studie met rosiglitazone konden wel verschillen tussen de Diabetes patiënten en gezonde vrijwilligers worden gevonden. Bij vergelijking van de gevonden ziekte-verschillen tussen de twee studies werden enkele overlappende biologische thema's ontdekt (b.v. het proces van opname van glucose in vetweefsel). Sommige van deze bevindingen werden eerder ook door andere onderzoekers (met

andere onderzoeksmethodes) gedaan. Op het niveau van de individuele boodschapperstoffen werd echter weinig tot geen overlap tussen beide studies gevonden.

Sectie 4

Het vierde gedeelte van het proefschrift beschrijft de evaluatie van ^1H NMR spectrometrie technologie ('metabolomics') als methode om snel reagerende biomarkers in bloed en urine (rosiglitazone studie) of enkel urine (ciprofibrat studie) te vinden voor de twee prototype-geneesmiddelen.

In de eerste studie werden duidelijke effecten gezien op de hoeveelheid en soorten natuurlijk-voorkomende ('endogene') metabolieten na behandeling met het prototype middel rosiglitazone t.o.v. placebo behandeling bij de Diabetes patiënten (Hoofdstuk 8). Er waren echter geen duidelijke geneesmiddeleffecten te zien in de groep gezonde vrijwilligers. Wel werden in zowel urine als bloed, duidelijke verschillen tussen de Diabetes patiënten en gezonde vrijwilligers gevonden. Daarnaast konden in zowel de patiënten als de gezonde vrijwilligers groep verschillen tussen mannen en vrouwen worden gevonden. Ook was het mogelijk om een aantal van de metabolieten te identificeren waarvan de concentratie veranderde onder invloed van rosiglitazone. Daarmee kon een idee worden gevormd hoe het middel deze veranderingen in het ziekteproces teweeg zou kunnen hebben gebracht.

In de tweede studie met ciprofibrat kon op basis van veranderingen in concentratie van de aanwezige metabolieten in urine een duidelijk onderscheid worden gemaakt tussen de met ciprofibrat behandelde en de met placebo behandelde proefpersonen (Hoofdstuk 9). Dit onderscheid was zowel in de groep Diabetes patiënten als in de groep gezonde vrijwilligers te maken. Ook konden gezonde vrijwilligers op basis van verschillen in metabolieten profiel duidelijk worden onderscheiden van de Diabetes patiënten. Helaas was het in deze studie door de minder geavanceerde NMR meetmethode ('bucketing') en statistische analyse, moeilijker de identiteit van de verschillende metabolieten in urine vast te stellen. Om deze reden was het niet mogelijk de veranderingen te spiegelen aan mogelijke veranderingen in het ziekteproces ten gevolge van behandeling met ciprofibrat. Om dezelfde reden kon ook geen goede vergelijking met de gevonden 'ziekte-verschillen' uit de vorige (rosiglitazone) studie worden gemaakt.

Sectie 5

Het vijfde gedeelte van het proefschrift omvat een samenvatting van de verschillende hoofdstukken van dit proefschrift, een algehele discussie en conclusies.

Conclusies

In dit proefschrift zijn een aantal studies beschreven waarin de toepasbaarheid van cDNA microarray en ^1H NMR spectrometrie technieken werd geëvalueerd met als doel het vinden van een breed spectrum aan snel responderende biomarkers voor de effecten van PPAR agonisten in de mens. Hiertoe werden de effecten van de PPAR γ agonist rosiglitazone en de PPAR α agonist ciprofibrat onderzocht in een groep Diabetes patiënten en een groep gezonde vrijwilligers. Daarnaast bood de studie opzet de mogelijkheid om de verschillen tussen de Diabetes patiënten en gezonde vrijwilligers in de doelweefsels (vet, spier en witte bloedcellen) en lichaams-vloeistoffen (bloed en urine) met deze technieken te onderzoeken.

De resultaten van het onderzoek met de cDNA microarrays (transcriptomics) lieten zien dat de techniek in de huidige ontwikkelingsfase en studieopzet niet in staat is een breed spectrum aan snel responderende boodschapperstoffen te vinden voor PPAR agonisten in hun humane doelweefsels. Wel konden verschillen in biomarkers tussen Diabetes patiënten en gezonde vrijwilligers worden gevonden die bij nadere analyse een duidelijke biologische samenhang vertoonden. Deze laatste bevindingen zouden kunnen leiden tot het vormen van nieuwe hypothesen en daarmee een belangrijk startpunt zijn voor toekomstige onderzoeken naar de oorzaken en gevolgen van Diabetes Mellitus type 2.

De evaluatie van de ^1H NMR spectrometrie technologie (metabolomics) die vervolgens in dit proefschrift werd geëvalueerd, bleek in tegenstelling tot cDNA microarray technologie, beter in staat de effecten van beide PPAR agonisten te detecteren. Daarnaast werden ook duidelijke verschillen gevonden in metaboliet concentraties tussen de Diabetes patiënten en de gezonde vrijwilligers, alsook tussen mannelijke en vrouwelijke proefpersonen.

Aan de hand van de resultaten die beschreven staan in dit proefschrift, concluderen wij dat de metabolomics techniek op dit moment de meeste potentie lijkt te hebben voor het vinden van

‘molecular biomarkers’ die uiteindelijk zouden kunnen worden toegepast bij het evalueren van nieuwe PPAR agonisten in de mens. Hoewel deze resultaten bemoedigend zijn, zullen er nog vervolgonderzoeken moeten plaatsvinden om te zien of deze resultaten bij herhaling kunnen worden gevonden.

Toekomstperspectief

Op dit moment is er een voortdurende technologische ontwikkeling gaande op het gebied van ‘molecular profiling’ technieken. Het betreft hier niet alleen een verbetering en verdere verfijning van de technieken, maar ook combinaties met andere technieken worden steeds vaker toegepast. Daarnaast is er een belangrijke impuls gegeven aan innovatie op het gebied van de ondersteunende statistische analyse methoden, patroonherkennings software en databases.

De verwachting voor metabolomics onderzoek is dat in de toekomst de identiteit van steeds meer (responderende) metabolieten kan worden vastgesteld en zo de resultaten makkelijker kunnen worden geïnterpreteerd en vertaald in biologisch relevante, praktisch bruikbare informatie. Wanneer we de potentie voor snelle ontwikkeling en innovatie optellen bij de eenvoudige en non-invasieve manier van monster verzameling, dan is de kans groot dat metabolomics in de toekomst een van de belangrijkste technieken zal worden voor het vinden van nieuwe biomarkers met als toepassing de vroege klinische evaluatie van PPAR agonist kandidaten (en mogelijk ook andere klassen van geneesmiddelen) in de mens.

Echter, totdat deze nieuwe moleculaire technieken en hun statistische analyse methoden zijn geëvolueerd tot meer robuuste en praktisch bruikbare meetinstrumenten, zal het meten van conventionele (biochemische) biomarkers voor veel farmaceutische bedrijven de voorkeur blijven houden om het ‘kaf’ van het ‘koren’ te scheiden.