



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Future drugs in atherosclerotic cardiovascular disease

Poelgeest, E.P. van

Citation

Poelgeest, E. P. van. (2018, April 10). *Future drugs in atherosclerotic cardiovascular disease*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/62060>

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/1887/62060>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/62060> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Poelgeest, Eveline van

Title: Future drugs in atherosclerotic cardiovascular disease

Date: 2018-04-10

8

NEDERLANDSE SAMENVATTING

E.J. VAN POOLGHEEST

SAMENVATTING

Stelt u zich eens voor dat u (of een dierbare van u) een hartaanval of beroerte krijgt. U zult dan een gezonde leefstijl nastreven en medicijnen gebruiken om te voorkomen dat dit in de toekomst nog eens gebeurt. Deze aanpak blijkt echter maar matig succesvol: in ruim 2/3 van de gevallen treed er een recidief op. Daarom wordt er wereldwijd uitgebreid onderzoek gedaan naar nieuwe behandelstrategieën om de prognose voor mensen met een sterk verhoogd risico op hart- en vaatziekten te verbeteren. Helaas hebben deze inspanningen tot op heden nog niet geleid tot een belangrijke doorbraak. Wel werd duidelijk dat van alle strategieën gericht op het terugdringen van het risico medicamenteus ingrijpen het meest effectief is. Daarom is het belangrijk om nieuwe geneesmiddelen voor atherosclerose (slagaderverkalking) te ontwikkelen. Gebaseerd op het onderliggende ziekteproces van atherosclerose kunnen deze middelen op verschillende niveaus aangrijpen: 1) het verlagen van het cholesterol, 2) het verminderen van ontsteking, en/of 3) het verbeteren of beperken van de schadelijke gevolgen van vaatwandprikkeling.

VERHOOGD CHOLESTEROL EN ATHEROSCLEROSE

Het hebben van verhoogde waarden van het LDL-Cholesterol (het 'slechte' cholesterol) is de belangrijkste risicofactor voor het ontstaan van atherosclerotische cardiovasculaire ziekte. Daarom wordt in alle internationale behandelrichtlijnen geadviseerd het LDL-C te verlagen bij patiënten die een verhoogd risico hebben op hart- en vaatziekten. Al ruim dertig jaar zijn statines de krachtigste LDL-C verlagende middelen op de markt. Een groot nadeel van deze middelen is dat ze door een aanzienlijk deel van de patiënten niet verdragen worden, of te weinig effectief zijn om de gewenste LDL-C-waarden in het bloed te bereiken, zelfs in hoge doseringen. Daarom is het belangrijk nieuwe LDL-C-verlagende geneesmiddelen te ontwikkelen die goed verdragen worden, en in staat zijn aanzienlijke LDL-C-verlaging te geven. De ontdekking in 2003 dat een bepaald eiwit, PCSK9, een cruciale rol blijkt te spelen in de LDL-C-huishouding, was de lang nagestreefde doorbraak in de zoektocht naar alternatieve methoden voor LDL-C-verlaging. Verhoogde PCSK9-waarden leiden tot verhoogde LDL-C spiegels en bovendien verminderde werkzaamheid van statines, terwijl (aangeboren) lage PCSK9-waarden resulteren in lage LDL-C-waarden en een verlaagd risico op cardiovasculaire ziekte. Deze ontdekking luidde een tijdperk in met een ware hausse aan onderzoeken gericht op het eiwit en het uitschakelen ervan, om zo verhoogde LDL-C-spiegels in het bloed te verlagen.

ONTSTEKING, DE VAATWAND EN ATHEROSCLEROSE

Maar liefst de helft van de patiënten met atherosclerotische cardiovasculaire ziekte heeft geen verhoogde cholesterolwaarden, maar wel verhoogde ontstekingswaarden in het bloed. Er is dan ook overtuigend bewijs geleverd dat bij het ontstaan van atherosclerose en de verdere ontwikkeling ervan diverse ontstekingsreacties betrokken zijn. Belangrijk in dit kader is de Toll-like receptor type 4 (TLR4), gespecialiseerd in het herkennen van patronen die onder meer voorkomen op verschillende ziekteverwekkers, waarvan lipopolysaccharide (LPS, een bestanddeel van een bepaalde soort bacteriën) de bekendste is. Wanneer een dergelijk patroon herkend wordt door TLR4 op ontstekingscellen, worden er processen in gang gezet die leiden tot een ontstekingsreactie, gericht op het onschadelijk maken van de potentiële ziekteverwekker. Behalve lichaamsvreemde stoffen kunnen ook lichaamseigen stoffen TLR4 activeren. Een voorbeeld hiervan is LDL-C: wanneer er in het bloed verhoogde LDL-C-concentraties zijn, dan accumuleert overtollig LDL-C in de vaatwand, waar het aanleiding geeft tot expressie van TLR4 op vaatcellen. Het patroon van het LDL-C wordt vervolgens herkend door de TLR4, resulterend in een ontstekingsreactie. Deze reactie leidt tot beschadiging en functieverlies van het endotheel, de laag cellen die de binnenkant van een bloedvat bekleedt. Hierdoor verliest het endotheel haar fysiologische barrièrefunctie waarbij zij extra doorlaatbaar wordt voor LDL-C-deeltjes vanuit de bloedbaan. Het gevolg hiervan is dat de ontstekingsreactie onderhouden en versterkt wordt, met als gevolg een vicieuze cirkel van buitensporige schade aan de bloedvaten, het fundament voor het ontstaan van atherosclerotische plaques. Er zijn aanwijzingen dat het tegengaan van endotheel dysfunctie atherosclerose vermindert. Dieronderzoek laat bovendien zien dat medicamenteuze remming van TLR4-activiteit resulteert in een afname van atherosclerotische plaques en de mate van ontsteking in het bloed. Daarom is het van groot belang gedetailleerd inzicht te hebben in de ontstekingseffecten en endotheel activatie ten gevolge van TLR4-activatie in mensen, om zo nieuwe geneesmiddelen voor atherosclerose te kunnen ontwikkelen.

ONDERZOEK NAAR GENEESMIDDELEN VOOR ATHEROSCLEROSE IN GEZONDE MENSEN

Er is momenteel geen relevant model voorhanden om in gezonde mensen atherosclerotische ziekteprocessen te onderzoeken, wat de mogelijkheden beperkt om de werkzaamheid van nieuwe medicijnen in gezonde mensen te testen.



Voor het evalueren van middelen met louter cholesterolverlagende werking is dit geen probleem, aangezien verhoogde cholesterolwaarden ook voorkomen in gezonde mensen. Voor het evalueren van de ontstekingsremmende effecten van geneesmiddelen ligt dit anders, omdat gezonde vrijwilligers geen chronische ontsteking hebben. Om in deze populatie toch ontstekingsremmende medicijnen te kunnen testen is daarom een ziektemodel vereist, waarin een ontstekings situatie nagebootst wordt. In het endotoxemiemodel wordt bij gezonde vrijwilligers LPS in de bloedbaan gespoten om zo een TLR4-gedreven ontstekingsreactie te genereren, die in het bloed gemeten kan worden. De ruime ervaring met dit model is hoofdzakelijk gebaseerd op studies waarin relatief hoge doseringen LPS (4 ng/kg) werden toegediend, die klinische effecten opwekken vergelijkbaar met een ernstige ontsteking, zoals sepsis (bloedvergiftiging). Dergelijke hoge doseringen zijn belastend voor vrijwilligers, en veroorzaken een hevige ontstekingsreactie. Literatuur suggereert dat milde endotoxemie in gezonde vrijwilligers een ontstekingsreactie in het bloed teweeg brengt die lijkt op de ontsteking aanwezig in het bloed van patiënten met atherosclerose. Bovendien zijn er aanwijzingen dat relatief hoge doseringen LPS (meer dan 2 ng/kg) toegediend aan gezonde vrijwilligers endotheelactivatie kan opwekken, zoals ook bij atherosclerose gezien wordt. Over de dosis-effectrelatie van lage doseringen LPS (<2 ng/kg) op ontsteking en endotheel activatie is echter weinig bekend. Kennis hierover is belangrijk, omdat deze als basis kan dienen voor de ontwikkeling van geneesmiddelen gericht op verlaging van de ontstekingscomponent van atherosclerose.

Samengevat is er behoefte aan nieuwe geneesmiddelen die het (herhaald) optreden van hart- en vaatziekten vermindert. Potentiële strategieën hiervoor zijn het verlagen van het LDL-Cholesterol via PCSK9-remming, het verminderen van TLR4-gemedieerde ontsteking, en het verminderen van vaatwandactivatie. In dit proefschrift worden de resultaten beschreven van een tweetal onderzoeken naar de mogelijke toepasbaarheid in mensen van een nieuwe PCSK9-remmer en een nieuw TLR4-blokkerend geneesmiddel. Ook werd onderzocht of de laaggradige endotoxemietest als humaan model gebruikt kan worden voor de inflammatoire component van atherosclerose, om zo de werkzaamheid van toekomstige geneesmiddelen voor atherosclerose in een vroeg klinisch stadium te kunnen testen.

DIT PROEFSCHRIFT

In **hoofdstuk 2** van dit proefschrift beschrijven we de resultaten van een onderzoek waarin we een nieuw PCSK9-verlagend middel voor het eerst aan gezonde proefpersonen met een verhoogd LDL-C hebben toegediend. Al in relatief lage

hoeveelheden (tot 5 mg/kg) verlaagde dit middel het PCSK9 met 50%, en het LDL-C in het bloed met 25%. Vanwege schadelijke effecten op de nieren en op de plaatsen onder de huid waar het middel was toegediend (injectieplaatsreacties) moest dit onderzoek voortijdig worden gestopt. Met name de effecten op de nier waren zorgwekkend, omdat de nieren essentiële lichaamsfuncties vervullen, en omdat dergelijke schadelijke effecten onverwacht waren. Middelen met vergelijkbare chemische structuur (antisense oligonucleotides) waren niet eerder in verband gebracht met negatieve effecten op de nierfunctie, zelfs niet in veel hogere doseringen. In geen van de voorgaande preklinische onderzoeken met het middel zelf (een locked nucleic acid, een subklasse van de antisense oligonucleotides) waren er aanwijzingen geweest dat het middel schadelijk voor de nier zou kunnen zijn. Ook was nooit melding gemaakt van een mogelijk verband tussen lage PCSK9-spiegels en het optreden van nierfunctiestoornissen. Wij hebben uitvoerig onderzocht waarom het middel in ons onderzoek wel schadelijk bleek te zijn voor de nier, en hebben de resultaten beschreven in **hoofdstuk 3**.

In de kliniek is de gouden standaard voor het vaststellen van nierfunctiestoornissen het aantonen van een stijging van bepaalde afvalstoffen in het bloed (creatinine, ureum). Echter, dit schadesignaal openbaart zich pas ongeveer 3 dagen nadat de nier daadwerkelijk beschadigd werd. De opgetreden nierschade kan dan al aanzienlijk zijn. Bovendien vertellen deze afvalstoffen niet wat de precieze oorzaak van de schade is, en welke onderdelen van de nier zijn aangedaan (bijvoorbeeld de nierbuisjes, de tubuli, of de haarvatenkluwen, de glomerulus). De laatste jaren verschijnen er steeds meer onderzoeken over stoffen in de urine die eerder laaggradige schade (prikkeling) zouden kunnen weerspiegelen, en bovendien informatie geven over de locatie van de schade. Om deze reden hebben we een aantal van dergelijke schademarkers gemeten. We toonden aan dat een verhoging van enkele van deze stoffen in de urine voorspellend kan zijn voor het pas dagen later optreden van nierfunctiestoornissen in het bloed, en dat het eerste deel van de nierbuisjes aangedaan was. Onze publicatie, waarin wij waarschuwen voor de potentieel nadelige effecten op de nier van deze subgroep geneesmiddelen (de locked nucleic acids), heeft geleid tot stringenter controle van de nierfunctie in studies met deze groep geneesmiddelen. Dat het middel dat wij in onze studie toedienden te schadelijk was om verdere ontwikkeling ervan te rechtvaardigen, is teleurstellend, aangezien het steeds duidelijker wordt dat de strategie van PCSK9-verlaging op zichzelf de lang nagestreefde doorbraak zou kunnen zijn in de behandeling van verhoogd LDL-C. Verschillende monoclonale antilichamen gericht tegen PCSK9 blijken niet alleen veilig te zijn, maar geven bovendien niet eerder geëvenaarde LDL-C-verlaging van 50-70%, en daling van het risico op hart- en vaatziekten.



Behalve via LDL-C-verlaging kan het risico op hart- en vaatziekten verlaagd worden door het remmen van laaggradige ontsteking. In **hoofdstuk 4** tonen wij aan dat laaggradige ontsteking nagebootst kan worden door gebruik te maken van het humane endotoxemiemodel: het simpelweg toedienen van een lage dosis (0,5, 1 of 2 ng/kg) LPS blijkt een veilige manier om in het bloed van gezonde vrijwilligers een kortdurende en milde ontstekingsreactie teweeg te brengen. We evalueerden niet alleen de ontstekingsreactie in het bloed van de proefpersonen (*in vivo*) die LPS hadden gekregen, maar ook de ontstekingsreactie in een bloedbuisje (*ex vivo*) van de vrijwilligers waaraan we LPS toedienden in het laboratorium. Hoewel de beide LPS-testen natuurlijk wezenlijk verschillen van elkaar, bleek het opgewekte ontstekingseffect tussen beide vergelijkbaar. Hiermee tonen we aan dat de *ex vivo* LPS test een niet-invasief alternatief kan zijn voor de *in vivo* LPS-toediening in vrijwilligers. Onze nauwkeurige beschrijving van de ontstekingseffecten (*in vivo* en *ex vivo*) over de tijd die gezien worden na toediening van deze verschillende doses LPS kan gebruikt worden voor het ontwerpen van toekomstige studies met nieuwe laaggradige ontstekingsremmers. Een belangrijk praktisch aspect om rekening mee te houden hierin is 'LPS hyporesponsiveness', het fenomeen dat de *ex vivo* ontstekingsreactie tijdelijk geremd is na eerdere *in vivo* LPS-toediening. In de literatuur was beschreven dat dit fenomeen binnen een week verdwenen was, een grove schatting van de duur van de hyporesponsiveness die in de praktijk niet erg bruikbaar is voor gecombineerde *in vivo/ex vivo* methodiek. Wij lieten zien dat deze remming maximaal was 6 uur na LPS-toediening en al binnen 12 uur verdwenen is. Vervolgens hebben we dit LPS-model toegepast in een klinisch onderzoek naar de werkzaamheid van een nieuw middel, een monoclonaal antilichaam, ontwikkeld om de TLR4-gedreven ontstekingsreactie te remmen (**hoofdstuk 5**). In het eerste deel van het onderzoek dienden we aan gezonde vrijwilligers een enkele dosis van het middel toe en testten we de remming van de ontstekingsreactie in het bloed van proefpersonen, zowel voorafgaand als herhaaldelijk na het toedienen van het middel. Het middel werd goed verdragen in een dosis variërend van 0.001 mg/kg tot 15 mg/kg, was erg potent (al vanaf 1 mg/kg bijna volledige remming van de LPS-geïnduceerde ontstekingsreactie), en werkte langdurig (ongeveer 10 weken bij de hoogste dosering). Een verhoogde infectiegevoeligheid werd niet geobserveerd, waarschijnlijk omdat adequate afweer tegen ziekteverwekkers geborgd wordt door TLR4-onafhankelijke processen. In dit deel van het onderzoek brachten we het ontstekingsremmend effect van oplopende geneesmiddelconcentraties in kaart, tot een concentratie die theoretisch nodig zou zijn om op weefselniveau werkzaam te zijn. In het tweede deel van het onderzoek onderzochten wij of het middel ook daadwerkelijk klinisch in staat was om

de LPS-gemedieerde ontstekingsreactie (snelle hartslag, griepachtige verschijnselen, en temperatuurverhoging) te remmen. Dit evalueerden wij op drie tijdstippen na de toediening van het geneesmiddel, namelijk direct, of na 22 of 40 dagen. We toonden aan dat het experimentele middel al in een lage dosis deze verschijnselen kon voorkomen, en dat dit effect gedurende minimaal 3 weken aanhield. De mate en duur van het effect van het antilichaam was goed vergelijkbaar wanneer het werd vastgesteld aan de hand van een test *in vivo*, en een test *ex vivo*. Dit inzicht is belangrijk aangezien het ontstekingsmodel *in vivo* belastend is voor de vrijwilliger, en bovendien niet frequent herhaald kan worden over de tijd, in tegenstelling tot ontstekings testen *ex vivo*.

In bovenstaand onderzoek hebben we de LPS-stimulatie *in vivo* toegepast om de werkzaamheid van een TLR4-blokker te bestuderen, toegespitst op de ontstekingsreactie. Het effect van LPS op het menselijk lichaam is echter veel breder. Endotoxemie kan niet alleen ontstekingscellen aanzetten tot het uitstoten van ontstekingsmediatoren, maar ook de vaatwand activeren, en misschien zelfs in ernstige gevallen leiden tot nierschade. Gedetailleerde kennis over de relatie tussen LPS-dosis en effect op vaatwand en nier ontbreekt echter. Ook bij atherosclerose wordt endotheelactivatie gezien. De endotoxemietest zou daarom mogelijk ook gebruikt kunnen worden als atherosclerosemodel, om de effectiviteit te testen van nieuwe middelen die de vaatwand moeten beschermen tegen ontstekingsprikkels. De toepasbaarheid van experimentele endotoxemie als model voor endotheelactivatie in gezonde vrijwilligers hebben we onderzocht in **hoofdstuk 6**. Dat LPS-toediening aan gezonde vrijwilligers in relatief hoge doses (2 en 4 ng/kg) leidt tot endotheelactivatie was eerder beschreven, maar systematisch verzamelde informatie met betrekking tot dosis-effectrelaties bij toediening van lagere doses LPS was niet voorhanden. Wij toonden robuuste, dosisafhankelijke endotheelactivatie na toediening van lage doses LPS. Dit is relevante informatie omdat het laaggradige endotoxemiemodel dat wij toepasten hiermee geschikt zou kunnen zijn voor toekomstige onderzoeken met geneesmiddelen gericht op het beschermen van de integriteit van het endotheel.

Veiligheid voor de gezonde vrijwilliger van interventies in onderzoeksverband is vanzelfsprekend van groot belang. Eerdere onderzoeken toonden dat toediening van relatief hoge hoeveelheden LPS (hoger dan 2 ng/kg lichaamsgewicht) aan gezonde vrijwilligers kan resulteren in plotselinge nierschade gemeten met nieuwe en gevoelige urinemarkers. Wij hebben een uitgebreid arsenaal van dergelijke niermarkers gemeten en vonden dat 0.5 en 1 ng/kg LPS geen effect hierop had. Bij de hoogste dosering LPS (2 ng/kg) waren er aanwijzingen dat LPS mogelijk effect op de nierbuisjes begon te krijgen, overigens zonder functionele consequenties. Omdat dit



effect kortstondig was, slechts een halve dag, er geen nierfunctiestoornissen optraden, en de markers bovendien slechts marginaal verhoogd waren vergeleken met patiënten met nierschade, concludeerden wij dat het toedienen van lage doses LPS in experimentele context geen nadelige gevolgen heeft op de nieren van gezonde proefpersonen, en veilig gebruikt kan worden als ziektemodel in geneesmiddelenonderzoek.

CONCLUSIE

De onderzoeken beschreven in dit proefschrift zijn relevant voor toekomstige medicamenteuze interventies gericht op de belangrijkste pathofysiologische aspecten van atherosclerose, namelijk 1) te hoge bloedwaarden van het LDL-C, 2) laaggradige ontsteking, en 3) dysfunctionerend endotheel.

Ten aanzien van het eerste aspect toonden wij dat LDL-C in het bloed effectief verlaagd kan worden door toediening van een PCSK9-remmend 'locked nucleic acid'. Helaas moesten we ook vaststellen dat dit geneesmiddel (ernstige) achteruitgang van de nierfunctie gaf ten gevolge van schade aan de nierbuisjes. Met behulp van nieuwe, gevoelige schademarkers lieten wij zien dat dergelijke schade mogelijk dagen eerder opgespoord kan worden dan met conventionele bloed- en urine-testen. Bovendien leidde de experimentele behandeling tot ongewenste reacties rondom de injectieplaats. Deze bevindingen demonstreren dat effecten van dit PCSK9-remmende middel, of mogelijk van deze klasse geneesmiddelen, in primaten in preklinische toxicologie studies niet betrouwbaar bijwerkingen op de nieren of de huid in mensen voorspellen.

Verder presenteren wij dat laaggradige endotoxemie, geïnduceerd door toediening van een lage dosis LPS (≤ 2 ng/kg), een milde ontstekingsreactie en endotheelactivatie teweeg brengt in gezonde vrijwilligers, en dat dit niet gepaard gaat met schadelijke effecten op de nier. Gebruik makend van deze methodologie toonden wij dat TLR4-gemedieerde ontstekingsreacties met een experimenteel monoclonaal antilichaam gericht tegen TLR4 volledig en langdurig onderdrukt konden worden, zonder indicaties voor een verhoogde infectiegevoeligheid. Vanuit klinisch-farmacologisch oogpunt is dit onderzoek interessant omdat het illustreert hoe op basis van basale moleculaire-celbiologische kennis een relatief simpele bloed-gebaseerde ontstekingstest kon worden toegepast die in gezonde vrijwilligers het gewenste effect van het middel aantoonde. Dit maakte een rationele en veilige onderzoeksopzet mogelijk, omdat de test zowel beschouwd kan worden als farmacodynamische test, maar ook als veiligheidstest: de test verschaft immers een directe kwantitatieve maat voor onderdrukking van het aangeboren immuunsysteem. Op basis van een gecombineerd farmacokinetisch

en farmacodynamisch model werd het mogelijk om efficiënt de optimale toe te dienen doses van het experimentele middel te voorspellen, en het gewenste tijdsinterval tussen de toedieningen. We bevestigden de validiteit van de bloed-gebaseerde ontstekingstest door in een klein aantal vrijwilligers ook een ontstekingsreactie op te wekken *in vivo*, door middel van de eerder genoemde endotoxemietest. Hiermee toonden we de betrouwbaarheid van het geschatte effect van het experimentele middel op basis van de bloed-gebaseerde ontstekings-test. Deze door ons gegenereerde informatie kan als basis dienen voor de verdere ontwikkeling van dit experimentele middel, theoretisch voor iedere pathologische conditie met een belangrijke TLR4-component.

Tenslotte lieten wij zien dat het laaggradige endotoxemiemodel ook gebruikt kan worden om endotheelactivatie te induceren. Aangezien dit een belangrijk pathofysiologisch aspect is van atherosclerose onderstreept dit de relevantie van het model voor toekomstig klinisch-farmacologisch onderzoek met experimentele anti-atherosclerotische middelen, bijvoorbeeld bedoeld om het endotheel te beschermen.

