



Jill Adler-Moore,
medisch microbioloog
De meerwaarde van liposomen

Koen de Heer, hematoloog
Flevoziekenhuis en AMC
Snuffelen aan de patiënt

JILL ADLER-MOORE, MEDISCH MICROBIOLOOG

DE MEERWAARDE VAN LIPOSOMEN

De Amerikaanse medisch microbiologe Adler-Moore ontdekte, min of meer bij toeval, de gouden formule om het antischimmelmiddel amfotericine B zodanig in vetbolletjes op te sluiten dat het pas vrij komt als de liposomen in contact komen met schimmelcellen. Het werd haar levenswerk om de vinding tot klinische toepassing te brengen en steeds verder te verfijnen. En te begrijpen hoe het mechanisme precies werkt.

DOOR MAARTEN EVENBLIJ



Opgeleid aan de Cornell Universiteit in New York, promoveerde Adler-Moore begin jaren '70 op onderzoek van virussen die schimmels infecteren. Ze wilde onder andere weten of een viraal geïnfecteerde schimmel virulenter is dan een niet geïnfecteerde schimmel. Dat bleek niet zo te zijn, maar de schimmel-virussen beïnvloedden wel de werking van het immuunsysteem. En daarin was Adler-Moore geïnteresseerd. Inmiddels blijken de dubbelstrengs RNA-virussen waarmee de jonge onderzoekster indertijd werkte, goede stimulators te zijn van de specifieke afweer tegen virussen (via activering van de Toll like receptor TLR-3).

Toen dat bekend werd zat Adler-Moore al enkele decennia in Californië, bij de California State Polytechnic University in Pomona, waar ze als hoogleraar bij het Biological Science Department les geeft over het immuunsysteem en schimmels. 'Zo gaan die dingen. Ik had overigens gedacht dat ik voor slechts korte tijd in Pomona zou blijven, maar nu – 39 jaar later – zit ik er nog. Het werk bij Cornell is mij altijd blijven bezighouden, want ik had gezien hoe schimmelinfecties indertijd alleen bestreden konden worden met het middel amfotericine B en dat was zo toxisch dat artsen zeer terughoudend waren om het te gebruiken.'

Sabbatical

Na tien jaar bij Cal Poly, was Adler-Moore toe aan een sabbatical. De biotechindustrie bloeide in Californië en nadat zij een lezing had bijgewoond over liposomen waarin geneesmiddelen naar kankercellen konden worden gebracht, vroeg Adler-Moore zich af of ook antischimmel medicijnen op deze manier naar de plaats van bestemming konden worden getransporteerd. Misschien zouden ze daardoor minder toxisch worden. 'Hierdoor kwam ik voor mijn sabbatical terecht bij het bedrijf Vestar – Vesicle Targetting. Dat richtte zich vooral op liposomen voor kankermedicijnen om tumoren te doden, maar ik mocht het proberen met amfotericine B. Daar leerde ik over liposomen en men vond het interessant genoeg om mij door te laten gaan na mijn sabbatical. Ook mocht ik mijn studenten bij Cal Poly liposomen laten testen. Ik maakte honderden formuleringen van amfotericine B met allerlei verhoudingen van diverse fosfolipiden in de membraan van het liposoom. Het was empirisch onderzoek met veel vallen en opstaan.'

Geen idee van werkingsmechanisme

Uiteindelijk vond Adler-Moore een goede formulering voor die stabiel was en niet toxisch bleek te zijn in muizen. Ze kon de diertjes wel 150 mg per kg lichaamsgewicht voeren zonder dat ze stierven, wat gewoonlijk al bij 1 mg amfotericine B per kg gebeurde. In de reageerbuis bleken

de liposomen na wat knutselen ook diverse soorten schimmels en gisten te doden. En ook in proefdieren verminderden ze schimmelinfecties. Adler-Moore: 'Maar ik had geen idee hoe het werkte. Hoe komt het dat amfotericine B tijdens het transport in de liposomen blijft zitten, maar aangekomen bij de schimmel, wel de schimmelcellen in gaat en deze cellen doodt?' Adler-Moore kreeg drie weken de tijd om uit te zoeken wat er gebeurde, zodat een registratieaanvraag voor humane tests de deur uit kon. 'We hebben wel kunnen uitvinden wat er gebeurt, maar nu – vele decennia later – weten we eigenlijk nog steeds niet precies waarom het gebeurt. Het lijkt erop dat ik toevallig de juiste formulering van het liposoom heb gevonden, die zowel toxiciteit tegen gaat als de schimmelcel penetreert.' De onderzoekers konden met verschillende technieken zien dat de liposomen zich aan de buitenwand van de schimmelcellen hechten en dat ze alleen verder de cel in gaan als er amfotericine B in de liposomen zit. Dan vallen de schimmelcellen uiteen en kan het geneesmiddel zijn werking doen. 'We hebben honderden tests gedaan', verzucht Adler-Moore 'We hebben ontdekt dat door het amfotericine B in de liposomen poriën in de celmembranen ontstaan

Liposomen winnen langzaam terrein

en dat het bij allerlei schimmelstammen werkt. Zelfs schimmelmutanten met afwijkende celwanden gingen dood. De enige mutant waarbij de liposomen niet naar binnen gaan is wanneer onder de celwand zich celmembranen bevinden zonder ergosterol. Het lipide ergosterol lijkt erg op cholesterol, maar is specifiek voor de membraan van schimmels. We weten dat amfotericine B sterk aan ergosterol bindt en dat die binding uiteindelijk tot de dood van de schimmelcel leidt. Maar waarom liposomen met amfotericine B door de celwand kunnen passeren om de membranen met ergosterol te bereiken, is nog altijd een raadsel.'

Vallen en opstaan

Serendipiteit, noemt Adler-Moore het. 'Is het geen wonder dat deze liposomen zowel de toxiciteit van amfotericine B minimaliseren als het middel specifiek naar de schimmelcellen leiden? Noem het geluk, maar we hebben er wel hard voor moeten werken.' Liposomen winnen langzaam terrein als medische behandeling; inmiddels zijn er ongeveer tien andere medicijnen die zijn verpakt in liposomen – voornamelijk antitumor middelen. Die liposomen hebben verschillende samenstellingen, afgestemd op zowel de plek in het lichaam waarheen ze moeten gaan als op het molecuul dat ze transporteren. 'Het is nog steeds veel vallen en opstaan, maar we komen steeds verder', constateert Adler-Moore, die erkent dat de liposomen niet de magic bullet voor het afleveren van medicijnen zijn geworden, zoals in de jaren '70 werd verwacht. 'Wat in het lichaam gebeurt is zeer complex. Sommige liposomen worden

heel snel uit de circulatie gehaald door lever, milt en nieren. We komen steeds verder met het inbouwen van andere moleculen, zoals eiwitten en suikers, die de eigenschappen van liposomen veranderen. Maar ook dat is vallen en opstaan.' Het inbouwen van antilichamen, wat de liposomen naar specifieke cellen stuurt, leidt bijvoorbeeld tot een zeer snelle opname in lever en milt. Als wordt geprobeerd dat tegen te gaan door het inbouwen van PEG (polyethyleenglycol) komen de liposomen niet meer op de juiste plaats terecht. 'We worden steeds beter in het koppelen van lipiden, eiwitten en koolhydraten om zo specifieke signaalstoffen in de liposomen te bouwen die het gewenste gedrag in het lichaam opleveren. Maar elk geneesmiddel vereist een andere samenstelling van het liposoom. Daar weten we nu veel meer van dan 25 jaar geleden.'

Nieuwe toepassingen

Liposomen kunnen in het lichaam worden gevolgd. Daardoor is beter bekend in welke weefsels ze gaan zitten en hoe lang ze daar blijven. 'Bij proefdieren blijven ze wel 2 tot 3 weken in weefsels. Bij mensen is dat zeker 1 tot 2 weken. Dat zou kunnen betekenen dat we met lagere doses hetzelfde effect kunnen bereiken. Die farmacokinetiek en farmacodynamiek van liposomen zijn een nieuw onderzoeksgebied. 'Liposomenformuleringen worden intraveneus gegeven, maar er zijn experimenten met orale en lokale toediening en het gebruik van aerosols. Als aerosol werken liposomen goed in de longen. Er ontstaan druppeltjes van de juiste grootte die diep in de longen dringen en daar dagenlang aanwezig blijven.' Adler-Moore werkt nu aan het toepassen van liposomen bij een griepvaccin, dat zich richt tegen sterk geconserveerde regionen van het virus. Omdat deze regionen niet snel veranderen zou zo'n vaccin geschikt zijn tegen diverse influenzastammen tegelijkertijd. Ook werkt ze aan een liposomaal Herpes-vaccin. 'Dit is een opwindend avontuur en allemaal zeer verrassend. Ik had nooit gedacht dat ik me zo met liposomen zou bezighouden. Die sabbatical heeft mijn leven veranderd.'

Colofon

Deze publicatie is mede mogelijk gemaakt door Gilead Sciences Netherlands B.V., Viñoly Tower, Claude Debussylaan 22, 1082 MD Amsterdam
T +31 (0) 20 718 3650, F +31 (0) 20 718 3651,
E gileadnl@gilead.com, I www.gilead.com

De opgenomen artikelen geven uitsluitend de mening van de auteur(s) weer. De uitgever en sponsor zijn niet verantwoordelijk voor de weergegeven meningen, noch delen zij die noodzakelijkerwijs. Raadpleeg bij het voorschrijven van geneesmiddelen altijd de registratietekst. Reacties kunnen worden gericht aan de uitgever.

Broca & Wernicke B.V.,
Amsterdamsestraatweg 24,
1391 AB Abcoude.
131/NL/14-07/PM/1321



Koen de Heer, hematoloog Flevoziekenhuis en AMC

Snuffelen aan de patiënt

Bij immuungecompromitteerde patiënten heeft een invasieve Aspergillus-infectie vaak een fataal beloop. De mortaliteit is hoog (afhankelijk van de omstandigheden soms >50%) en kan alleen omlaag worden gebracht met een adequate behandeling op basis van tijdige

diagnostiek. In de praktijk is dat niet eenvoudig. De patiënten verkeren vaak in een slechte conditie, de infectie kan zich snel uitbreiden en de diagnostiek is meestal erg belastend. Koen de Heer, hematoloog in het Flevoziekenhuis en het AMC, onderzoekt een nieuwe methode om op snelle en elegante manier de diagnostiek uit te voeren: de eNose.

De diagnostiek van invasieve aspergillose bij neutropene patiënten verschilt per ziekenhuis. In sommige centra wordt behandeld op basis van empirische bevindingen, in andere centra wordt een preëemptieve strategie gehanteerd. Er bestaat geen algemeen aanvaarde richtlijn en dat is niet zo vreemd. Want de symptomen van invasieve aspergillose zijn niet specifiek en de diagnostische methoden zoals een röntgenfoto, CT-scan of BAL zijn dat evenmin. Een galactomannantest op BAL is weliswaar specifiek, maar de procedure is erg belastend voor de patiënt. De infectie wordt pas als bewezen beschouwd als uit een radiologisch afwijkend gebied *Aspergillus* kan worden gekweekt. Maar daarvoor moet een biopt worden genomen (een risicovolle procedure) en verstrikt er kostbare tijd voordat de kweek gereed is. De diagnostiek is dus belastend en tijdrovend en staat op gespannen voet met het gegeven dat het succes van de behandeling in belangrijke mate wordt beïnvloed door de tijd tussen diagnose en therapie. Anders gezegd: wachten op zekerheid rond de diagnostiek leidt tot uitstel van de therapie en vermindert de kans op overleven.

Preëemptieve methode

Vaak wordt hangende de diagnostiek alvast gestart met de therapie. Maar de antimycotische middelen zijn zwaar en kunnen leiden tot ernstige bijwerkingen. Die geef je dus liever niet als het niet nodig is. Daarom heeft Koen de Heer meegeschreven aan het AMC-protocol Aspergillose. Het protocol is van toepassing op patiënten met een langdurige (>10 dagen) chemotherapie-geïnduceerde neutropenie. Als deze patiënten de symptomen van een longontsteking vertonen en koorts krijgen die niet reageert op breed spectrum antibiotica, dan zijn zij verdacht voor aspergillose en moet er aanvullende diagnostiek worden verricht. Dat gaat in het AMC als volgt. Eerst kan een X-thorax worden overwogen. Bij 70% van de patiënten is hierop de afwijking zichtbaar, bij 30% niet. Daarom wordt deze stap vaak overgeslagen en wordt bij een reële verdenking een HR-CTscan verricht. Als de beeldvormende diagnostiek aanwijzingen geeft voor aspergillose, volgt een BAL-procedure. Het daarmee verkregen lavaat wordt gekweekt en er wordt een galactomannan-bepaling van

gedaan. Met deze diagnostiek kan een sensitiviteit van ongeveer 90% en een specificiteit van ongeveer 95% worden bereikt. Maar het kost tijd en de patiënt kan niet lang wachten. Daarom wordt na 4 dagen koorts de therapie gestart.

Snelheid cruciaal

'Omdat invasieve aspergillose zo levensbedreigend is, moeten we zo goed mogelijk en zo snel mogelijk handelen' zegt Koen de Heer. 'Het gaat om ernstig zieke patiënten en die liggen meestal in een academisch of gespecialiseerd perifeer centrum. Daar hebben de röntgenologen, longartsen en microbiologen relatief veel ervaring met deze infecties. Daardoor kunnen zij snel en adequaat handelen. Een gouden standaard ontbreekt immers, dus ervaring is belangrijk. Weliswaar kunnen we niet goed vaststellen hoeveel vals-positieve en vals-negatieve diagnoses we stellen, maar op basis van de preëemptieve strategie kunnen we ver onder de 50% mortaliteit blijven.' Dat neemt niet weg dat er altijd verbeteringen mogelijk zijn. En bij invasieve aspergillose kunnen die verbeteringen vooral worden behaald op een snellere en minder belastende diagnostiek. Daar heeft Koen de Heer een pilot studie naar verricht, te weten: detectie van aspergillose met behulp van een eNose.

eNose

Het principe van de eNose kennen we allemaal van het blaaspipje bij de alcoholcontrole: je blaast in een apparaat en dat herkent een bepaalde stof in de lucht die je uitademt. Koen de Heer: 'Het is een snelle en goedkope manier om gasmengsels te meten. In het geval van onze aspergillose-opstelling zitten er 32 sensoren in het apparaat. Deze geven een profiel van het mengsel dat ze meten. De vraag die ik stelde was: kan de eNose een *Aspergillus*-infectie ruiken? In de pilot hebben we 46 personen geïnccludeerd. Bij 11 van hen ontstond een indicatie voor een volledig diagnostisch protocol, waaruit kon worden vastgesteld dat 6 patiënten zeer waarschijnlijk een *Aspergillus*-infectie hadden en 5 patiënten met zekerheid niet waren geïnfecteerd. De eNose kon met 100% sensitiviteit en 83% specificiteit het onderscheid tussen deze twee groepen maken.' Dat is een bemoedigend resultaat, maar de aantallen waren klein, dus vervolgonderzoek is noodzakelijk. Momenteel wordt dat door Marije Gerritsen uitgevoerd in het AMC en het UMCU. Koen de Heer: 'Als de eNose werkelijk aspergillose blijkt te kunnen detecteren, dan zou op termijn de belastende BAL-procedure overbodig kunnen worden. Misschien zou de infectie eerder en nauwkeuriger kunnen worden vastgesteld. Dat is goed nieuws voor de patiënten omdat de prognose dan zou kunnen verbeteren. Aspergillose ontwikkelt zich meestal in de loop van vele dagen en met de eNose zou je daarvoor al aanwijzingen kunnen krijgen nog voordat de patiënt klachten krijgt. De kans op detectie neemt toe, als je de patiënt tweemaal per week zou screenen. De diagnostische procedure zou dan worden: eNose en CT-scan. Sneller, goedkoper en minder belastend.'