

Biomarker-hype

Het idee dat karakteristieke biomoleculen ziekten eerder aan het licht kunnen brengen en de geneesmiddelenontwikkeling versnellen, veroorzaakt een ware hype. Biomarkers worden echter al jaren gebruikt voor de diagnoses van reuma en kanker. Feitelijk draait de hele klinische chemie om biomarkers. Wél nieuw zijn de sterk verbeterde hogedoorvoeranalyses. De hoge kosten daarvan gaan echter voor de baat uit.

Door ziekten zoals kanker, reuma en diabetes wordt de fysiologie van sommige menselijke cellen beïnvloed. Hierdoor veranderen de concentraties van karakteristieke biomoleculen in lichaamsvloeistoffen, zoals bloed of urine. Door de concentraties van deze 'biomarkers' te meten is vroegtijdig vast te stellen of iemand ziek is en of een (nieuw) geneesmiddel het gewenste effect heeft.

Eerder kanker herkennen

Ido Kema, werkzaam in het klinisch-chemische laboratorium van het Academisch Ziekenhuis Groningen, doet onderzoek naar een biomarker-assay voor een vorm van darmkanker. Het gaat om de betrekkelijk zeldzame 'carcinoïd tumoren'. Ze ontwikkelen zich meestal langzaam. Toch blijft het belangrijk om te kunnen vaststellen of iemand carcinoïd tumoren heeft, voordat er uitzaaiingen optreden. "Dit kan, want een carcinoïd tumor produceert serotonine. Deze neurotransmitter dient normaal om de darm aan te zetten tot peristaltische bewegingen, maar bij overmatige serotonine-productie ontstaan klachten variërend van diarree, tot beschadigingen van de hartkleppen. Het teveel aan serotonine en de afbraakproducten daarvan zijn meet-

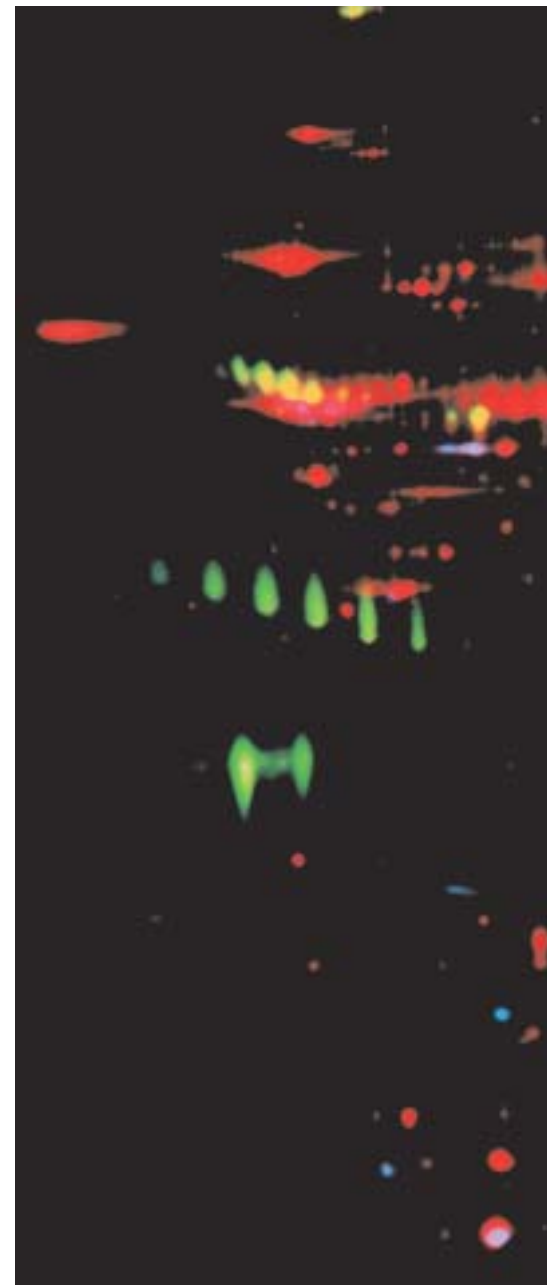
**'Vaststellen
wanneer
een dure
behandeling
het effectiefst
is'**

baar in het bloed en de urine van de patiënt, en zijn dus goede biomarkers."

Nieuw is dat idee niet. Al tientallen jaren wordt de urineconcentratie van 5-hydroxyindolazijnzuur, het afbraakproduct van serotonine, gebruikt als biomarker. "De concentratie van 5-HIAA is soms echter nog niet verhoogd, terwijl je al wel patiënt bent. Bovendien wordt de bepaling beïnvloed door de voeding. Er is dus behoefte aan een biomarker-assay die niet alleen *gevoeliger* is, maar ook *selectiever*. Je wilt immers alleen een positieve uitslag als iemand echt ziek is."

SPE-analyse

Het meten van de concentratie serotonine in de bloedplaatjes biedt uitkomst. Deze biomarker blijkt veel minder gevoelig voor voedingsinvloeden. Bij de nieuwe assay wordt naast het serotoninegehalte ook de concentratie van het afbraakproduct 5-HIAA bepaald. Bovendien wordt gekeken naar de concentratie van tryptofaan, het aminozuur waaruit serotonine wordt gevormd. *Solid phase extraction* (SPE) staat aan de basis van de analyse: "We beschikken



over een volautomatische SPE/HPLC-opstelling, waarmee je deze bepalingen gelijktijdig kunt doen. De ontwikkeling duurde bijna twee jaar, waarbij de meeste tijd ging zitten in het optimaliseren van het SPE-gedeelte.”

Grootste uitdaging bij het optimaliseren van de geautomatiseerde extractietechniek vormde het vinden van een *cartridge*-materiaal dat de analyten selectief absorbeert. “Bij SPE is het belangrijk dat de cartridge in staat is om de te bepalen stoffen goed vast te houden. Aan de andere kant moet je die stoffen er later met een elutiemiddel ook weer gemakkelijk uit kunnen spoelen, om ze vanuit de cartridge op de HPLC-kolom te kun-

nen brengen. Meestal doe je SPE voor één component, maar wij wilden de techniek voor meerdere stoffen tegelijk gaan toepassen. Dit maakte het moeilijker om de juiste cartridge te vinden.”

Slimme bezuigingstruc

Een ander probleem was dat sommige biomoleculen tijdens de meting bleken te oxideren. Dit probleem werd opgelost door het toevoegen van anti-oxidanten. Ten slotte bleek de analyse prijzig. “Eén cartridge kost rond de vijf euro, en in principe heb je voor iedere analyse een nieuwe cartridge nodig. Ik weet niet of de leverancier daar blij mee is, maar wij hebben een manier gevonden om de cartridges tot 30 keer te kunnen gebruiken. We spoelen de cartridges schoon als ze niet worden gebruikt.”

‘Alleen een positieve uitslag, als iemand echt ziek is’

Reumadiagnose

Net als bij carcinoïde tumoren wordt voor het vaststellen van reuma al decennialang een biomarker gebruikt. Bij de bepaling van de reumafactor

Deze 2-D elektroforese gel, een applicatie van het multiplex proteomics platform van Molecular Probes, maakt directe detectie en kwantificering van specifieke proteïnes mogelijk. Dit soort nieuwe technieken, waarmee snel de concentratie van een groot aantal eiwitten kan worden gemeten, brengt de ontwikkeling van nog gevoeliger biomarker-analyses in een stroomversnelling. (foto: Molecular Probes)

Voordelen diagnostische biomarkers

- Vroege diagnose
- Identificatie van subtypes van een aandoening voor gerichtere therapieën.
- Meten van de effectiviteit en bijwerkingen van een therapie.
- Versneld preklinisch traject. Celweken geven vroegtijdig informatie over werking, werkingsmechanisme en toxiciteit.
- Versneld klinisch traject. Kortere trials met beter geselecteerde groepen personen.

(RF) wordt het bloed onderzocht op antilichamen tegen immunoglobuline G. Die antilichamen ontstaan echter ook bij andere ontstekingsprocessen en zijn dus niet selectief genoeg. Recent is daarom een selectievere biomarker-test ontwikkeld, vertelt professor Filip de Keyser. Hij werkt op de afdeling reumatologie van het universitair ziekenhuis te Gent. De test werkt met citrulline. Dat is een gemodificeerde vorm van het aminozuur arginine. “Die stof komt veelvuldig voor in de eiwitten van de gewrichtsmembraan bij patiënten met reumatoïde artritis. Waarom, is nog niet helemaal duidelijk. Wel weten we dat reumapatiënten antistoffen aanmaken tegen gecitrullineerde eiwitten. De aanwezigheid van deze antistoffen in het bloed blijkt een zeer goede biomarker voor reuma. Hiermee kun je 67% van de mensen die deze ziekte heeft opsporen, met een betrouwbaarheid van 99%. Als je diezelfde betrouwbaarheid met de RF-test zou willen halen, dan moet je de grens voor een positieve uitslag zo hoog leggen dat je nog maar 20% van de reuma-patiënten opspoort.”

Effectief

Een vinding van professor Van Venrooij aan de Katholieke Universiteit van Nijmegen borduurt

Knelpunten

De zoektocht naar biomarkers en de bijpassende essays verloopt moeizaam:

- Aan duizenden biomarkers meten, in de hoop de goede te vinden, is erg duur.
- Er is een grote natuurlijke variatie in biomarkerconcentraties, ook als mensen niet ziek zijn.
- Complexe mengsels van bloed, urine of sputum.
- Biologische stoffen zijn gevoelig voor natuurlijke degradatie.
- Standaarden voor de ontwikkeling van biomarker-assays ontbreken.
- Referentiematerialen ontbreken.
- Bij de analyses zijn vaak dure (commerciële) kits nodig.
- De data-evaluatie is ingewikkeld.

hierop voort. Het gaat om een biomarkertest op basis van *cyclish citrullinated peptide* (CCP), een synthetisch peptidensubstraat. “De CCP’s worden gebruikt voor een ELISA-immunoassay. Het bloed van reumapatiënten bevat antistoffen, die zich hechten zich aan de CCP’s.”

De Keyser verwacht dat nieuwe ‘proteomics’-analyses, waarmee de concentratie van een groot aantal eiwitten in lichaamsweefsels kan worden gemeten, binnenkort ideeën voor nog gevoeligere biomarker-analyses opleveren. “Reuma is een ziekte die begint met ontstoken gewrichtsslijmvliezen. Op dat moment wijken de eiwitconcentraties in de slijmvliescellen al duidelijk af van die in gezonde cellen.” Dat is goed nieuws voor de patiënt en de ziektekostenverzekeraar. “Met betere biomarkers kunnen we reuma niet alleen eerder aantonen, maar ook het verloop ervan beter voorspellen. De meest effectieve therapie tegen reuma is een behandeling met TNF-remmers, dit zijn stoffen die de ontstekingsreactie blokkeren. Het probleem is echter dat die behandeling maar liefst 15.000 euro per pati-

ënt per jaar kost. Met nieuwe biomarkers kunnen we wellicht vaststellen wanneer die dure behandeling het meest effectief is.”

Fit for purpose

Biomarkers worden veelvuldig ingezet bij de ontwikkeling van geneesmiddelen om interessante geneesmiddelkandidaten zo vroeg mogelijk te selecteren. Elke test die daarbij (enig) inzicht kan opleveren is nuttig, ook al is die test misschien nog niet volmaakt. Ian James, werkzaam bij Pfizer Global R&D: “Biomarker-analyses passen wij steeds eerder toe in het ontwikkelingstraject. Specificiteit is daarbij belangrijk, maar wij staren ons niet blind op de nauwkeurigheid. Voor ons is het belangrijkste dat een test *fit for purpose* is.”

Wondheling

Soms is de ontwikkeling van biomarker-analyses een bittere noodzaak, omdat er geen andere (snelle) manieren zijn om de werking van geneesmiddelen aan te tonen. “Dat is bijvoorbeeld het geval als je medicijnen wilt ontwikkelen tegen littekenvor-

ming,” legt James uit. “Het is momenteel onduidelijk waarom operatiewonden al dan niet goed helen. Wij zouden graag weten welke factoren van belang zijn voor een goed herstel, en of je die kunt beïnvloeden.”

“Littekenvorming is een soort door-geplagen helingsproces waarbij er te veel bindweefsel wordt gevormd,” vervolgt James. “Het probleem bij het zoeken naar een biomarker voor ‘goede’ wondheling is, dat je niet weet wat je moet meten. In een experiment waarin bij enkele gezonde mannen een kleine snede in de huid werd aangebracht, werd daarom tijdens de wondheling de concentratie van een groot aantal stoffen zoals collageen I, collageen III en elastine in de wond gevolgd, onder meer met SDS-PAGE (*PolyAcrylamide Gel Elektroforese, red.*) en HPLC.” Hierbij bleek dat de concentratie collageen niet veranderde, maar dat elastine, een stof die normaal in de huid voorkomt, heel lang afwezig blijft. De gewenste biomarker heeft dat allemaal nog niet opgeleverd. “Zoals je aan dit voorbeeld ziet, gaan de kosten voor de baat uit. Ik ben er echter van overtuigd, dat biomarker-analyses uiteindelijk de kosten van geneesmiddelenontwikkeling zullen gaan drukken,” besluit James.

Jaap van Ede

Dit artikel is mede ontstaan naar aanleiding van een symposium op 12 november 2003 van FABIAN, de werkgroep Farmaceutische en Biomedische Analyse van de sectie analytische chemie van de Koninklijke Nederlandse Chemische Vereniging (KNCV).

Bezoek ook onze internetsite
www.laboratorium-magazine.nl

Bekijk o.a. de nieuwsflitsen, vorige uitgaven
en raadpleeg de vacatures

