

1

# Nephrology

up-date

januari 2009

from science to clinical practice

in dit nummer

## Erytropoëse-stimulerende middelen en de erythopoëtinereceptor: werkingsmechanisme

*Dr. Christophe Bovy, afdeling Nefrologie,  
Academisch Ziekenhuis Sart Tilman, Luik, België*

review door

Dr. A.B.M. Geers, Internist-Nefroloog & Opleider Interne Geneeskunde  
St. Antonius Ziekenhuis  
Koekoekslaan 1, 3435 CM Nieuwegein





## Samenvatting

De biologische effecten van endogene EPO, rHuEPO en andere ESP's hangen af van een cascade van cellulaire activeringen die optreedt door binding van deze ESP's aan de EPOR. Activering van de EPOR is het gemeenschappelijke mechanisme waardoor endogene EPO en alle andere ESP's de erythropoëse op het oppervlak van de voorlopercellen in het beenmerg stimuleren.

Uit vroege experimenten is gebleken dat de fysiologische kenmerken die de wisselwerking tussen de diverse rHuEPO-isovormen en de EPOR regelen, worden bepaald door de hoeveelheid siaalzuurresiduen. Natieve erythropoëtine en rHuEPO kunnen maximaal veertien siaalzuurresiduen bevatten. Verhoging van de glycosylering van het erythropoëtine-molecuul leidt tot een lagere affiniteit voor de receptor, maar een langere halfwaardetijd en een krachtigere biologische activiteit. Dit leidde tot het idee dat het creëren van een erythropoëtine-molecuul dat meer siaalzuurresiduen kan binden, de biologische activiteit zou kunnen verbeteren. Studies bevestigden dat darbepoëtine alfa (met maximaal tweeëntwintig siaalzuurresiduen) een langere halfwaardetijd, een grotere potentie en een lagere affiniteit voor de receptor heeft.

Er is aangetoond dat de potentie of biologische activiteit van ESP's rechtstreeks evenredig is met de serumhalfwaardetijd, omdat de stimulering van de erythropoëse alleen afhangt van de tijdsduur dat de concentratie van de ESP's boven de drempelwaarde blijft die voor de erythropoëse nodig is. Deze drempelwaarde komt overeen met de definitie van receptoraffiniteit. Een lage receptoraffiniteit vereist een hogere drempelwaarde om hetzelfde effect te verkrijgen. Een hogere mate van glycosylering van rHuEPO zou theoretisch tot een lagere werkzaamheid kunnen leiden (hogere drempelconcentratie), maar de langere halfwaardetijd biedt meer dan compensatie voor de lagere bindingsaffiniteit voor de receptor (zoals bij darbepoëtine alfa is te zien). Hoewel in-vitro-experimenten hebben aangetoond dat de ESP-klaring EPOR-afhankelijk zou kunnen zijn, blijkt uit in-vivo-experimenten met gentechnologisch gemaakte rHuEPO-analogen zonder resterende affiniteit voor de EPOR dat EPOR-onafhankelijke eliminatiemechanismen een belangrijke rol spelen in de klaring van ESP's.

## Inleiding

In de jaren tachtig van de vorige eeuw heeft zich een revolutie voltrokken in de behandeling van anemie bij nier- en kankerpatiënten door de introductie van recombinante humane erythropoëtine (rHuEPO). Dit molecuul heeft in de nefrologie niet alleen het aantal benodigde rodebloedceltransfusies (die met een verhoogd risico van virale infecties en allo-immunisatie gepaard gaan) drastisch verminderd, maar ook de kwaliteit van leven van deze patiënten significant verbeterd.

Vanuit kosten-batengezichtspunt moeten alle aspecten van de prescriptie worden meegewogen. Zo zou bijvoorbeeld intraveneuze in plaats van subcutane toediening, of een lagere toedieningsfrequentie ertoe kunnen leiden dat een hogere rHuEPO-dosis nodig is.

Vanuit klinisch gezichtspunt heeft de potentie van erythropoëse-stimulerende proteïnen (ESP's) betrekking op de doeltreffendheid waarmee ze proliferatie en differentiatie van de erytroïde kolonievormende eenheid (CFU-E) teweegbrengen, hetgeen leidt tot de productie van erythrocyten en een toename van de hemoglobinespiegel van het bloed. De werking van ESP's berust op hun binding aan de EPO-receptor (EPOR) op de erytroïde voorlopercellen en in een cascade van cellulaire activeringen resulteert. Het is daarom van belang om de mechanismen te begrijpen die bepalend zijn voor de interactie tussen ESP's en hun EPO-receptor. Het doel van dit review is het verduidelijken van de wisselwerking tussen ESP's en de EPO-receptor en de fysiologische en klinische implicaties hiervan.

## EPO-receptor en celactivering

De EPO-receptor (EPOR) is een transmembraanproteïne met een cytosolair en een extracellulair domein, die beide 230 aminozuren bevatten. Het extracellulaire domein heeft twee regio's - D1 en D2 - die een hoek van 90° met elkaar vormen. Het intracellulaire domein is samengesteld uit box 1 en box 2, en de regio die zich daartussen bevindt. Het intracellulaire domein is verantwoordelijk voor de interactie tussen de EPOR en proteïne-tyrosinekinasen van de janusfamilie (JAK-2) enerzijds, en de tyrosinekinasereceptor (KIT) anderzijds. Beide zijn van essentieel belang voor de functionele interacties tussen ESP's en de EPOR.<sup>1</sup>

EPO moet twee bindingsplaatsen hebben, omdat men ervan uitgaat dat EPO in een oplossing als monomeer aanwezig is. Philo et al. (1996) hebben ondubbelzinnig aangetoond dat het extracellulaire domein van de EPO-receptor dimerisatie van de receptor kan veroorzaken in aanwezigheid van EPO.<sup>2</sup> Deze resultaten zijn consistent met het denkbeeld dat dimerisatie noodzakelijk en voldoende is om de signaaltransductieroute in gang te zetten. Twee moleculen EPOR kunnen aan een enkele EPO-monomeer binden, maar de binding van de tweede EPOR-bindingsplaats ( $K_d \approx 1 \mu\text{M}$ ) is ongeveer duizendmaal zwakker dan die van de eerste ( $K_d \approx 1 \text{ nM}$ ). Dit leidt tot een relatief onstabiel complex in de oplossing. Daarom wordt het 2:1-complex alleen bij een relatief hoge proteïneconcentratie in beduidende hoeveelheden gevormd.<sup>2</sup>

Bij afwezigheid van EPO kunnen uitsluitend tweewaardige, monoklonale anti-EPOR-antilichamen aan de EPOR binden en deze activeren, hetgeen erop wijst dat voor de active-

ring twee antilichaambindingsplaat-  
sen noodzakelijk zijn. Het bevestigt  
dat homodimerisatie van de EPOR  
nodig is voor de activering ervan en  
toont aan dat er geen strikte voor-  
waarde is dat de receptoren in een  
alignment moeten worden gebracht  
die voor activering geschikt is.<sup>3</sup>  
Uit onderzoek naar plaatsgerichte  
mutagenese blijkt dat EPO - een  
bundel van vier helices - twee  
domeinen bezit die noodzakelijk zijn  
voor de binding aan de EPOR. Deze  
domeinen bevinden zich hoofdzake-  
lijk op helix C en helix D.<sup>4,5</sup> Mutaties  
in basische residuen van EPO ver-  
laagden de biologische activiteit, ter-  
wijl mutaties in zure residuen dit niet  
deden. Dit maakt het aannemelijk  
dat voor de elektrostatistische interac-  
tie tussen EPO en de humane EPOR  
een positieve lading op EPO noodza-  
kelijk is.<sup>4</sup>  
De EPOR kan door moleculen van  
diverse vormen en groottes worden  
gedimeriseerd op voorwaarde dat  
twee herkenningsmotieven (bin-  
dingsplaatsen) in hetzelfde monome-

re molecuul aanwezig zijn dan wel  
één motief in beide subunits van een  
dimeer molecuul.<sup>5</sup>  
Voor de activering van de EPOR door  
ESP's is dimerisatie van de receptor  
nodig. Eén enkel EPO-molecuul  
brengt twee EPOR-moleculen in  
nauw contact met elkaar, evenals de  
JAK-2-moleculen die aan het intracel-  
lulaire domein van de EPOR zijn  
gebonden (figuur 1). Door deze  
nabijheid kan JAK-2 transfosforyle-  
ring teweegbrengen. Ook het cytop-  
lasmatische domein van de EPOR  
wordt onder invloed van geactiveerd  
JAK-2 gefosforyleerd.<sup>1</sup> Het complexe  
netwerk van post-EPO-receptorsig-  
nalering bestaat uit (1) toegenomen  
expressie van anti-apoptotische pro-  
teïnen (bijv. BCL-2, BCL-XL) en ver-  
minderde expressie van pro-apopto-  
tische moleculen (zoals Bax, Bak);<sup>6</sup>  
(2) activering van mitogeengeacti-  
veerd proteïnekinase (MAPK) en fos-  
fatidylinositol 3-kinase (PI-3K/Akt);  
en (3) homodimerisatie van de  
STAT5 (signaaltransducer en -activa-

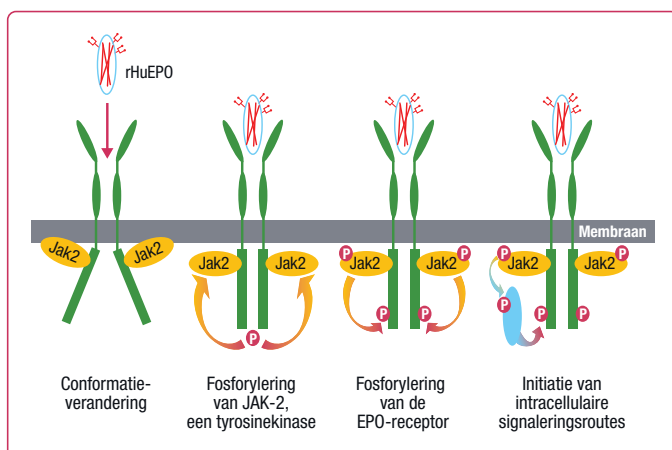
tor van transcriptie).<sup>7</sup> Activering van  
deze routes stimuleert de proliferatie  
en remt de apoptose van de erytroï-  
de voorlopercellen (figuur 2).  
Activering van de EPO-receptor is  
het gemeenschappelijke mechanis-  
me waardoor endogene EPO en alle  
ESP's de erythropoëse stimuleren op  
het oppervlak van de voorlopercellen  
in het beenmerg.  
De binding van ESP's aan de EPOR  
is de sleutel tot activering van de  
cellen. Alle ESP's hebben hetzelfde  
werkingsmechanisme, maar ver-  
schillen wat hun affiniteit voor de  
receptor, de ESP-halfwaardetijd (of  
klaring) en de biologische beschik-  
baarheid van de ESP betreft. Deze  
factoren en hun mogelijke fysiolo-  
gische en klinische implicaties, als-  
mede de veronderstelde interacties  
tussen deze factoren worden hier  
nader besproken.

## Erythropoëtine

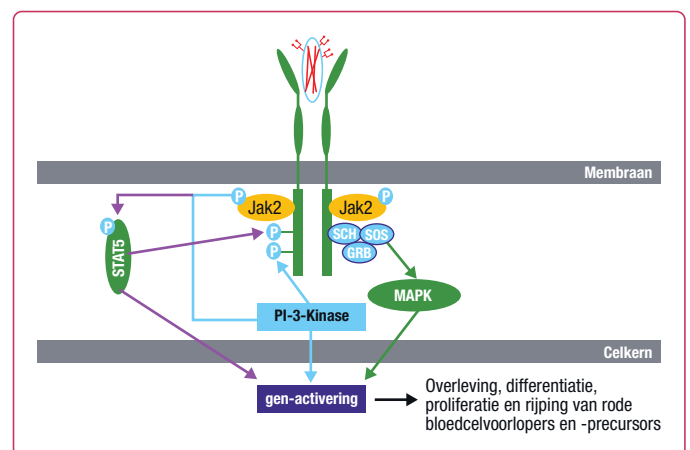
### a. Structuur en glycosylering van EPO

Humane erythropoëtine is een gegly-  
cosyleerd proteïnehormoon van  
30.400 Da dat 165 aminozuren  
bevat. De peptidenketen maakt 60%  
van het molecuulgewicht uit. De res-  
terende 40% van de massa van het  
molecuul wordt door koolhydraten  
gevormd. Toevoeging van koolhydra-  
ten is een fenomeen dat na de tran-  
scriptie plaatsvindt. Aan de polypep-  
tidenketen worden drie N-gebonden  
asparagine- en een O-gebonden  
serine-koolhydraatketen gehecht.  
Aan de N-gebonden ketens kunnen  
vier en aan de O-gebonden keten  
kunnen twee siaalzuurresiduen wor-  
den gebonden. Natieve erythropoëtine  
kan in totaal vier tot veertien siaal-  
zuurresiduen bevatten (figuur 3). De  
verschillende isovormen zijn in de  
circulatie aanwezig. Recombinante  
humane erythropoëtine bevat negen  
tot maximaal veertien siaalzuurresi-  
duen.<sup>8</sup>

**Figuur 1:** Model van activering van de erythropoëtine-receptor (EPOR). Binding van EPO leidt tot dimerisatie van de receptor en transfosforylering van JAK-2. JAK-2 of een ander kinase fosforyleert vervolgens verscheidene tyrosine-residuen van de EPOR, waarbij aanhechtingsplaatsen voor signaaltransductieproteïnen - zoals STAT5 - worden gevormd. Na binding aan de EPOR worden deze signaaltransductieproteïnen gefosforyleerd en geactiveerd (Rossert and Eckardt. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20:1025-1028).



**Figuur 2:** Activering van de EPO-receptor leidt tot activering van de genen die de erythropoëse stimuleren (Constantinescu et al. *TEM*. 1999; 10:18-23. Miura et al. *J Biol Chem* 1994;269:29962-29969. Rossert and Eckardt. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20:1025-1028).





## b. In-vivopotentie, farmacokinetiek en glycosylering

Het wisselende aantal negatief geladen siaalzuurresiduen dat aan het hormoon is gebonden, is verantwoordelijk voor het verschil in elektrische lading van het molecuul waaraan ze worden gebonden. Na scheiding met een gel met iso-elektrische focusering kunnen de verschillende isovormen experimenteel worden gebruikt. In een studie werd onderzocht welke invloed de koolhydraten op de biologische werkzaamheid van rHuEPO hebben.<sup>9</sup> Driemaal per week intraperitoneale toediening van specifieke isovormen aan muizen toonde aan dat de in-vivopotentie rechtstreeks was gecorreleerd met het aantal siaalzuurresiduen dat aan de rHuEPO-keten is gebonden. Isoform 14 laat een grotere hematocrietrespons zien dan de minder gesialyleerde rHuEPO-isovormen (figuur 4) – dit ondanks het feit dat isoform 14 een geringere affiniteit voor de EPOR heeft dan de kleinere rHuEPO-isovormen.

Met deze techniek toonden de auteurs tevens aan dat er na intraveneuze toediening van de rHuEPO-isovormen aan ratten een omgekeerde relatie bestaat tussen de glycosylering en de klaring van rHuEPO. Isoform 14 werd veel langzamer uit de circulatie geklaard dan de minder gesialyleerde rHuEPO-isovormen. Dat wil zeggen dat de halfwaardetijd rechtstreeks was gerelateerd aan de hoeveelheid siaalzuur.<sup>8</sup>

## c. Glycosylering en affiniteit voor de receptor

Op basis van eerdere gegevens die aantoonde dat desialylering (verwijdering van siaalzuren van het N-gebonden koolhydraat) van rHuEPO tot een grotere affiniteit voor de receptor leidt, onderzochten Darling et al. het effect van glycosylering op de receptorbindingsactiviteit.<sup>10</sup> Zij gebruikten drie varianten van rHuEPO: EPO-IRS (internationale referentiestandaard, die overeenkomt met rHuEPO), door neuraminidase gedesiaalyleerde rHuEPO en door 293EBNA-cellen geproduceerde

rHuEPO met een mate van sialylering die tussen die van EPO-IRS en gedesiaalyleerde rHuEPO in ligt.

Bepaling van de associatiesnelheidsconstante  $k_{on}$  van de varianten met de EPOR liet zien dat de affiniteit voor de receptor omgekeerd evenredig was aan de glycosylering en sialylering van het molecuul. Door bestudering van de  $k_{on}$ -verschillen die door toenemende NaCl-concentraties teweeg werden gebracht, konden de auteurs aantonen dat de lagere receptoraffiniteit die met een hogere hoeveelheid siaalzuur verband houdt, hoofdzakelijk het gevolg is van verschillen in elektrische lading en niet van het gewicht of de structuur van het molecuul.

Concluderend: Een grotere hoeveelheid siaalzuur in de rHuEPO-isovormen is gecorreleerd met een lagere affiniteit voor de EPO-receptor, een langere halfwaardetijd (verminderde klaring) en een hogere in-vivopotentie. Glycosylering en sialylering van rHuEPO verlagen de affiniteit voor de

EPO-receptor, die door verschillen in elektrostatistische krachten worden veroorzaakt.

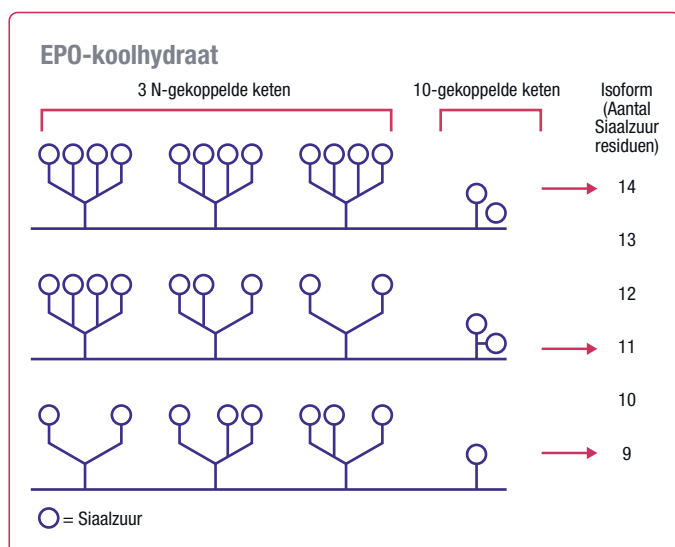
## Darbepoëtine alfa

### a. Ontwikkeling van darbepoëtine alfa

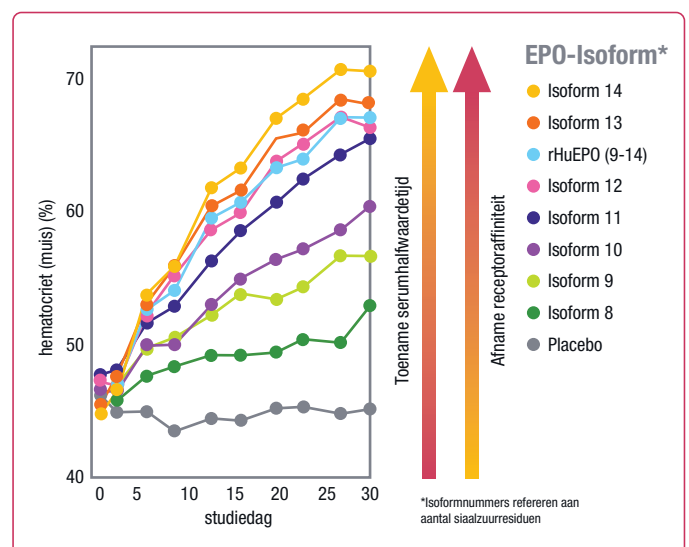
De fysiologische kenmerken die met een toename van de glycosylering van de rHuEPO-keten verband houden, leidden tot het idee dat het creëren van een rHuEPO-molecuul dat meer siaalzuurresiduen kan binden dan de native proteïne, de halfwaardetijd zou verlengen en de biologische werkzaamheid verbeteren. Dit molecuul zou minder vaak hoeven worden toegediend, wat tevens een substantieel voordeel voor de patiënten en hun verzorgers zou betekenen.

Om nieuwe aanhechtingsplaatsen voor koolhydraten in de peptidenketen van EPO in te brengen, moest de DNA-sequentie van het EPO-gen zo worden gemodificeerd dat deze zou coderen voor extra reeksen voor

Figuur 3: Schematische structuur van EPO, sialylering en weergave van EPO-isovormen (Egrie and Browne. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16 (Suppl 3:3-13)



Figuur 4: In-vivoactiviteit van geïsoleerde rHuEPO-isovormen, driemaal per week intraperitoneaal toegediend aan muizen (Egrie and Browne. *Glycoconjugate J* 1993;10:263. Macdougall. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17(Suppl 5):66-70).



koolhydraattoevoeging. Met gentech-nologie werden twee extra N-gebonden glycosyleringsketens ingebracht aan de asparagineresiduen 30 en 88. Deze twee extra N-gebonden ketens verhoogde de potentiële silylering in NESP (nieuwe erythropoëse-stimulerende proteïne; darbepoë-tine alfa) van veertien tot maximaal tweeëntwintig siaalzuuresiduen (figuur 5).<sup>11</sup> Op deze plaatsen had-den de reeksen voor de koolhydraat-hechting geen negatieve invloed op de receptorbinding en veranderden ze de structuur of de stabiliteit van het molecuul niet. De extra kool-hydraten verhoogden het molecuul-gewicht van 30.400 Da voor rHuEPO tot 37.100 Da voor darbepoëtine alfa.

**b. Fysiologische eigenschappen van darbepoëtine alfa in vergelijking met die van rHuEPO**

*Klaring en halfwaardetijd*

In een dubbelblinde, gerandomiseerde, gekruiste studie werden de farmacokinetiek van een enkelvoudige dosis rHuEPO (100 E/kg) en een equivalente peptidenmassa van NESP vergeleken na intraveneuze toediening aan elf stabiele peritoneale-dialysepatiënten. Deze studie werd gevolgd door een open-label-studie waarin de farmacokinetiek van een enkelvoudige dosis NESP

werd bepaald door subcutane toe-diening aan zes van deze patiënten. Na intraveneuze injectie had NESP een ongeveer driemaal langere half-waardetijd dan rHuEPO (gemiddeld 25,3 uur versus 8,5 uur) en een twee- tot driemaal lagere klaring ( $1,6 \pm 0,3$  versus  $4,0 \pm 0,3$  ml/uur per kg).<sup>12</sup>

Egrie et al. onderzochten de serum-halfwaardetijd van overmatig geglycosyleerde, recombinante humane erythropoëtine-analogen.<sup>11,13</sup> Bij rat-ten en honden werden experimenten gedaan om de vergelijkende farma-cokinetische profielen vast te stellen van rHuEPO en NESP.<sup>13</sup>

Intraveneus werden aan de dieren geïodeerde moleculen (<sup>125</sup>I-NESP of <sup>125</sup>I-rHuEPO) in dezelfde doses toe-gediend, en er werden verdwijnings-curves gemaakt. Bij ratten verliep de klaring van rHuEPO 3,7 keer sneller dan van NESP, terwijl de halfwaarde-tijd van darbepoëtine alfa driemaal zo hoog was (respectievelijk 6,9 en 2,5 uur). Bij honden was de half-waardetijd van NESP 3,5 keer langer dan die welke voor rHuEPO werd berekend (respectievelijk 25 en 7,2 uur).

*Affiniteit voor de receptor en binding*

De relatieve binding van NESP en rHuEPO werd gemeten met een koude radioreceptorassay op basis

van verdringing.<sup>13</sup> Toenemende con-centraties van ongelabelde molecu-len (NESP of rHuEPO) werden met een vaste concentratie <sup>125</sup>I-NESP of <sup>125</sup>I-rHuEPO geïncubeerd. Voor elke tracer werd de relatieve binding aan de receptor berekend door de con-centratie te vergelijken waarbij 50% van de geïodeerde moleculen van de EPO-receptor werd verdrongen. De concentratie darbepoëtine alfa die nodig was om met 50% van de bin-ding van <sup>125</sup>I-rHuEPO aan de recep-tor te concurreren, was 4,3 keer hoger dan de voor rHuEPO benodig-de concentratie. Evenzo was de con-centratie darbepoëtine alfa die nodig was om het 50%-punt van de verdringingscurve van <sup>125</sup>I-NESP te verkrijgen 4,8 keer hoger dan voor rHuEPO. Dit bevestigt eerdere expe-rimenten met geïsoleerde rHuEPO-isovormen, die een omgekeerde relatie lieten zien tussen de sialyle-

ring van het EPO-molecuul en de affiniteit voor de EPO-receptor.

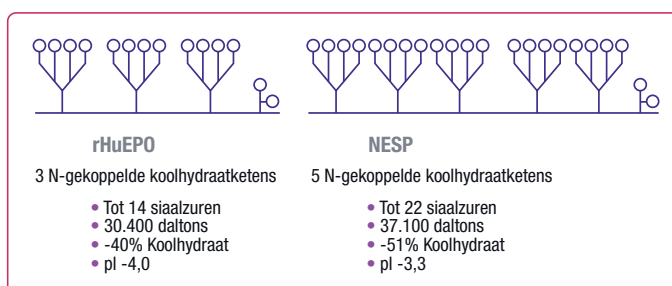
**c. In-vivopotentie van NESP en rHuEPO (dierstudies)**

De in-vivopotentie of -activiteit kan worden afgemeten aan de toename van de hematocriet na de toediening van rHuEPO of NESP.

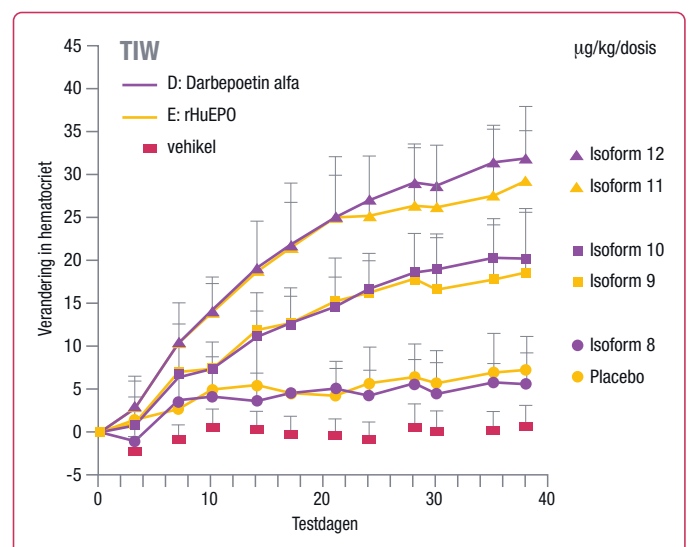
Bij muizen werden dosis-responscurves gegenereerd. Omdat de klaring-snelheid van NESP en rHuEPO ver-schillend is, werd de potentie van deze moleculen bij twee toedienings-frequenties onderzocht: één keer en drie keer per week. Bij een toe-dieningsfrequentie van drie keer per week leidde een rHuEPO-dosis van 0,625 µg/kg na 38 behandelings-weeken tot een toename van de hematocriet van gemiddeld zeven punten, terwijl dezelfde dosis NESP in hetzelfde tijdsbestek tot een toe-name van de hematocriet van

**Figuur 5:** Schematische structuur en sialyleringspotentieel van darbepoëtine alfa in vergelijking met rHuEPO

(Egrie and Browne. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16(Suppl) 3:3-13)



**Figuur 6:** Darbepoëtine alfa is krachtiger dan rHuEPO. Aan groepen CD-1-muizen werd driemaal per week (TIW) intraperitoneaal vehikelcontrole of de aangegeven doses darbepoëtine alfa of rHuEPO toegediend gedurende 38 dagen. De hematocriet werd bij aanvang en daarna tweemaal per week bepaald. De gegevens die worden getoond, zijn de groepsgemiddelde verandering van de hematocriet (± SD). Zij zijn afkomstig van een representatief experiment waarbij 10-13 dieren/groep voor elke dosisniveau van darbepoëtine alfa en rHuEPO werden gebruikt en tien muizen/groep voor de vehikelcontrole (Egrie et al. *Exp Hematol* 2003;31:290-299).





gemiddeld 20 punten leidde. Er was een viermaal zo hoge rHuEPO-dosis nodig - 2,5 µg/kg - om eenzelfde erythropoëtische stimulering te bereiken als met een NESP-dosis van 0,625 µg/kg (figuur 6).<sup>13</sup> Bij een toedieningsfrequentie van één keer per week was een rHuEPO-dosis van 100 tot 200 µg/kg/week nodig om de hematocriet in dezelfde mate te verhogen als met een NESP-dosis van 6,25 µg/kg/week.

Eenmaal weekse toediening van 7,5 µg/kg NESP leidde echter tot dezelfde biologische reacties als een driemaal per week toegediende rHuEPO-dosis van 2,5 µg/kg (totale wekelijkse dosis: 7,5 µg/kg) (figuur 7). Dit maakt het aannemelijk dat de halfwaardetijd - en niet de concentratie - de belangrijkste factor is in de verklaring van de verschillende potenties van deze ESP's. De studies

toonden tevens aan de potentie van darbepoëtine ten opzichte van die van rHuEPO des te groter is naarmate het interval tussen de herhaalde toedieningen langer is. Bij een langer toedieningsinterval moet de geneesmiddelspiegel hoger zijn om eenzelfde biologische reactie te verkrijgen. Echter, hoe langer de halfwaardetijd van een molecuul is, des te kleiner is de dosisverhoging die nodig is om een minder frequent toedienings-schema in stand te houden.<sup>13</sup>

In een andere studie werden muizen met 180 µg/kg rHuEPO of 100 µg/kg darbepoëtine alfa behandeld. De hemoglobinespiegel was gedurende een langere tijdsduur verhoogd en bereikte een hoger niveau bij muizen die darbepoëtine alfa kregen dan bij muizen die rHuEPO kregen. Zelfs tienmaal hogere doses van rHuEPO (1.800 µg/kg) leidden

niet tot een even grote respons als met 100 µg/kg darbepoëtine alfa werd verkregen. De grotere in-vivo-activiteit van darbepoëtine alfa was waarschijnlijk het gevolg van de twee extra siaalzuurbevattende N-gebonden koolhydraten. De driemaal langere halfwaardetijd wijst erop dat de hogere in-vivo-activiteit wellicht aan een verminderde klaring kan worden toegeschreven, waardoor de erytroïde voorlopercellen langer aan darbepoëtine worden blootgesteld.<sup>14,15</sup>

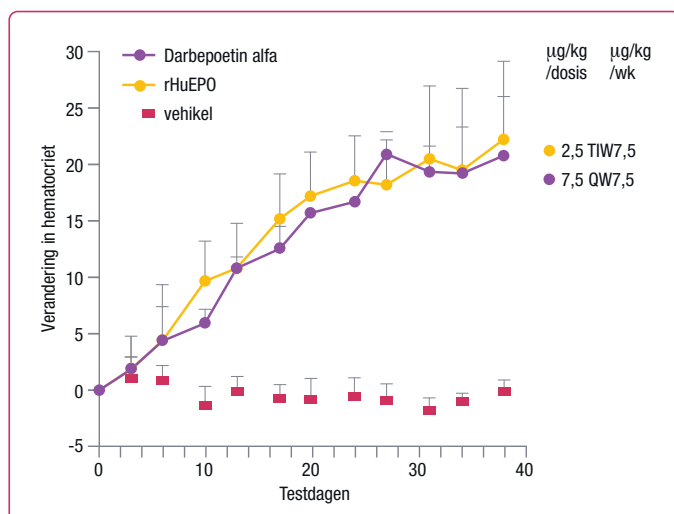
#### d. Klinische werkzaamheid van NESP en rHuEPO

In onderzoeken naar de werkzaamheid en veiligheid van darbepoëtine alfa bij patiënten met chronisch nierlijden, hemodialyse en peritoneale dialyse werd aangetoond dat een initiële dosis van 0,45-0,75 µg/kg lichaamsgewicht effectief de anemie corrigeert. Darbepoëtine alfa heeft een goed veiligheidsprofiel, zowel bij intraveneuze als bij subcutane toediening. Er zijn geen significante verschillen in de wekelijkse dosisbehoefte waargenomen tussen intrave-

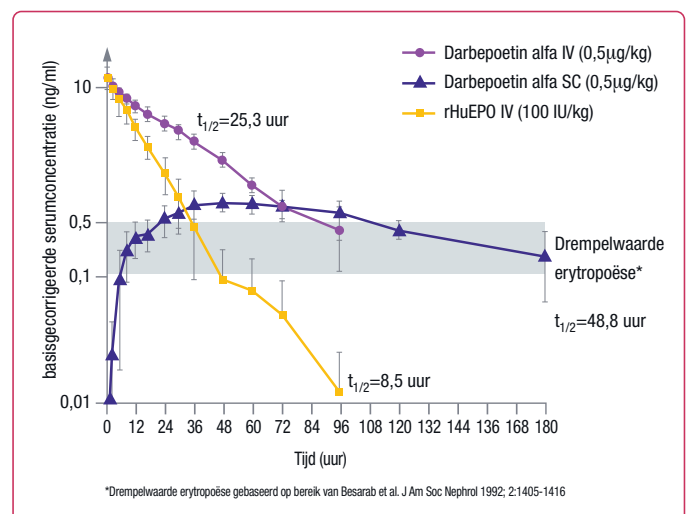
neuze en subcutane toediening van darbepoëtine alfa.<sup>16</sup> Een gerandomiseerde, dubbelblinde werkzaamheidstudie bij hemodialysepatiënten, waarin driemaal weekse intraveneuze toediening van rHuEPO met eenmaal weekse toediening van NESP werd vergeleken, liet dezelfde werkzaamheid zien.<sup>17</sup> In een andere studie bij hemodialysepatiënten bleek NESP, eenmaal per week dan wel eenmaal per twee weken intraveneus toegediend, werkzamer te zijn dan intraveneuze rHuEPO, twee- of driemaal per week, respectievelijk eenmaal per week toegediend. De doseringen werden aanvankelijk omgezet conform de peptidenmassa (200 IE: 1 µg). Na 24 weken was de benodigde gemiddelde intraveneuze dosis voor NESP 18% lager dan voor rHuEPO.<sup>18</sup>

Concluderend: Darbepoëtine alfa bevat een grotere hoeveelheid siaalzuurhoudende koolhydraten en heeft een lagere klaring (tot driemaal lager), langere halfwaardetijd (driemaal langer) en een lagere bindingsactiviteit voor de receptor (4,3 keer

**Figuur 7:** Darbepoëtine alfa kan minder vaak worden toegediend dan rHuEPO. Vergelijking van het effect van eenmaal weekse (QW) toediening van 7,5 µg/kg darbepoëtine alfa en driemaal weekse (TIW) toediening van 2,5 µg/kg rHuEPO. De twee moleculen werden intraperitoneaal aan muizen toegediend. Er waren acht muizen/groep voor darbepoëtine alfa, tien muizen/groep voor rHuEPO en zes muizen/groep voor de vehikelcontrole. De hematocriet werd bij aanvang bepaald en vervolgens tweemaal per week. De gegevens zijn afkomstig van een representatief experiment. Weergegeven is de groepsgemiddelde verandering van de hematocriet (± SD) (Egrie et al. *Exp Hematol* 2003;31:290-299)



**Figuur 8:** Farmacokinetiek van rHuEPO en darbepoëtine alfa bij dialysepatiënten. Het grijze gebied geeft de drempelwaarde voor biologische activiteit weer: gemiddelde ± SD (Maccougall et al. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:2392-2395).



lager) dan rHuEPO. Door de langere halfwaardetijd en grotere in-vivopotentie hoeft darbepoëtine minder vaak te worden toegediend dan rHuEPO om een gelijkwaardige biologische werking te verkrijgen.

**e. Relatie tussen de halfwaardetijd en in-vivopotentie<sup>8,12</sup>**

Na intraveneuze injectie heeft NESP bij mensen een veel langere halfwaardetijd (25,3 uur versus 8,5 uur) en een tragere klaring (1,6 versus 4,0 ml/h/kg) dan rHuEPO. Na subcutane toediening bereikte de serumspiegel van NESP 54 uur na de injectie de piekwaarde. De halfwaardetijd was 48,8 uur (figuur 8).<sup>12</sup> De activiteit van een ESP hangt af van zijn binding aan en activering van de EPOR. Het aantal receptoren op elke erytroïde voorlopercel is laag, ongeveer 200 met een maximum van 1000 per cel. Om de erythropoëse te stimuleren is een receptorbezetting van slechts 20-30% nodig. Dit is waarschijnlijk de verklaring voor het feit dat de essentiële factor voor sti-

mulering van de erythropoëse de tijdsduur is dat de concentratie boven de drempelwaarde (de concentratie die de erythropoëse in stand houdt) blijft en niet de piekconcentratie.

De potentie voor binding aan de EPOR is rechtstreeks gerelateerd met de mate van sialylering van rHuEPO. De affiniteit voor de receptor is daarentegen omgekeerd gecorreleerd met het aantal sialzuurresiduen dat aan rHuEPO is gebonden. De potentie en affiniteit voor de receptor zijn dus omgekeerd gecorreleerd. Om dit fenomeen te begrijpen moet de definitie van receptoraffiniteit nader worden toegelicht. Receptoraffiniteit betekent niet de sterkte van de binding van EPO aan de EPOR, maar betekent in feite een concentratie waarbij een bepaald aantal receptoren is gebonden en die de verwachte biologische werking oplevert. Indien de affiniteit voor de receptor lager is - maar nog steeds voldoende groot - moet de

serumconcentratie hoger zijn om hetzelfde aantal receptoren bezet te krijgen en hetzelfde effect te bereiken.

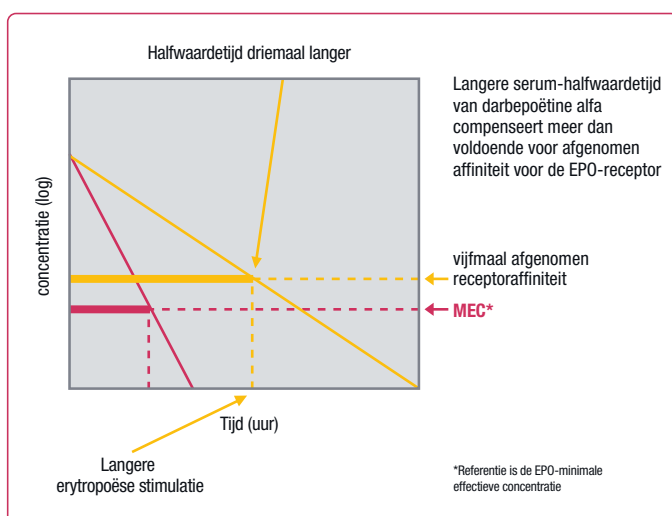
Dit is de reden waarom de halfwaardetijd van groot belang is voor de potentie van dit soort behandelingen. Figuur 9 laat het effect zien dat de combinatie van een lagere affiniteit voor de receptor en een langere halfwaardetijd op de ESP-activiteit heeft. Dit is wat er gebeurt wanneer de glycosylering van een ESP hoger is. In dat geval biedt de langere seumhalfwaardetijd meer dan compensatie voor de lagere affiniteit voor de receptor: de tijdsduur dat de concentratie hoger dan de drempelwaarde is, is langer.

Concluderend: De lagere klaring, een langere halfwaardetijd, een grotere in-vivopotentie en een lagere bindingsaffiniteit voor de receptor van darbepoëtine alfa in vergelijking met die van rHuEPO wijzen erop dat de tijd dat het middel in het lichaam aanwezig is en niet de bindingsaffiniteit voor de receptor (op voorwaarde dat deze affiniteit niet te ver daalt) een belangrijke factor is voor de in-vivopotentie van ESP's.<sup>15</sup> Belangrijk is de tijdsduur dat de concentratie van de ESP boven de drempelwaarde blijft die voor de erythropoëse nodig is.

die bij het katabolisme van EPO betrokken zijn. Hoewel levercellen gedesialyleerde EPO opnemen, lijkt de lever evenwel geen belangrijke rol te spelen in de afbraak van EPO. Ook de renale klaring van EPO blijft van ondergeschikt belang. Er is aangetoond dat de farmacokinetiek van EPO non-lineair is, wat wijst op een verzadigbaar eliminatiemechanisme. EPO en daarvan afgeleide recombinante middelen kunnen worden ingelijfd door cellen waarop de EPOR-receptor tot expressie komt.<sup>19</sup> Gross et al. veronderstelden dat het belangrijkste mechanisme voor de afbraak van EPO in het lichaam zich afspeelt in cellen waarop de EPOR tot expressie komt door receptorgemedieerde endocytose, gevolgd door afbraak in lysosomen. Zij konden aantonen dat rHuEPO en NESP in vitro uitsluitend worden afgebroken door gekweekte cellen waarop EPOR tot expressie komt en dat hun receptorbindings-, dissociatie- en trafficking (intracellulair transport)-eigenschappen bepalend zijn voor de snelheid van hun intracellulaire afbraak. EPO bindt sneller aan het oppervlak van de EPOR ( $k_{on} = 5,0 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$  versus  $1,1 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) en dissocieert trager ( $k_{off} = 0,029 \text{ min}^{-1}$  versus  $0,042 \text{ min}^{-1}$ ) van het oppervlak van de EPOR dan NESP. Na binding aan het oppervlak van de EPOR worden rHuEPO en NESP met dezelfde snelheid de cel in getransporteerd. Na deze internalisatie wordt 60% van elk ligand (rHuEPO en NESP) opnieuw intact gesecerneerd, terwijl 40% in de lysosomen wordt afgebroken.<sup>20</sup>

Het is echter niet nog helemaal duidelijk hoe de eliminatie van ESP's plaatsvindt. Recente onderzoeksgegevens maken het aannemelijk dat de EPOR-gemedieerde klaringroute wellicht niet zo belangrijk is voor de in-vivo-eliminatie van ESP's als vroeger werd gedacht. In een studie

**Figuur 9:** De halfwaardetijd en de bindingsactiviteit voor de receptor kunnen invloed hebben op de werking in vivo (Elliott S. Presentatie bij de 7e Lübeck Conferentie over de pathofysiologie en farmacologie van erythropoëtine. 6-9 september 2006. Elliott et al. *Ann Haematol* 2006;85:642 abstract).



**Klaring van ESP's**

De glycaansamenstelling van EPO is van belang voor de bepaling van de biologische activiteit en de afbraaksnelheid van EPO en analogen daarvan. Toch is niet bekend wat de belangrijkste plaats voor de verwijdering van EPO uit de circulatie en het mechanisme daarachter zijn die het verschil in halfwaardetijd tussen rHuEPO en NESP zouden kunnen verklaren. De lever, nieren en het beenmerg zijn potentiële plaatsen



werd onderzocht welke rol de EPOR-gemedieerde klaringsroute heeft door de farmacokinetische profielen te bepalen na intraveneuze toediening aan ratten en muizen van rHuEPO en rHuEPO-analogen met een verschillende EPOR-bindingsactiviteit, waaronder analogen die niet aan EPOR binden (analoog NM385). De eliminatie van de EPOR-bindingsactiviteit bij NM385 had geen effect op de klaring van het molecuul na intraveneuze toediening aan ratten, en vertraagde de klaring met ~50% na intraveneuze toediening aan muizen in vergelijking met rHuEPO. Deze resultaten wijzen erop dat EPOR-onafhankelijke routes een belangrijke rol spelen bij de in-vivoklaring van ESP's. Een toenemende mate van hyperglycosylering of pegylering van een ESP - in dit geval darbepoëtine alfa - leidde tot een tragere klaring, een langere halfwaardetijd en een lagere affiniteit voor de receptor. De langere halfwaardetijd kan echter slechts gedeeltelijk worden verklaard door de lagere affiniteit van het molecuul voor de receptor. Hyperglycosylering of pegylering van darbepoëtine alfa had een grotere invloed op de klaring en resulteerde in een grotere verlenging van de halfwaardetijd, in vergelijking met rHuEPO, dan verwijdering van de EPOR-bindingsactiviteit.<sup>21</sup>

Concluderend: Hoewel uit in-vitro-gegevens valt af te leiden dat ESP's alleen worden afgebroken in aanwezigheid van cellen waarop de EPOR tot expressie is gekomen, wijzen recentere in-vivo-gegevens erop dat EPOR-onafhankelijke eliminatiemechanismen een belangrijke rol spelen in de klaring van ESP's.

## Referenties:

1. Constantinescu SN, Ghaffari S, Lodish HF. The erythropoietin receptor: Structure, activation and intracellular signal transduction. *Trends Endocrinol Metab* 1999;10:18-23.
2. Philo JS, Aoki KH, Arakawa T, et al. Dimerization of the extracellular domain of the erythropoietin (EPO) receptor by EPO: one high-affinity and one low-affinity interaction *Biochemistry* 1996;35:1681-91.
3. Elliott S, Lorenzini T, Yanagihara D, et al. Activation of the erythropoietin (EPO) receptor by bivalent anti-EPO receptor antibodies. *J Biol Chem* 1996;271:24691-7.
4. Elliott S, Lorenzini T, Chang D, et al. Mapping of the active site of recombinant human erythropoietin. *Blood* 1997;89:493-502.
5. Qiu H, Belanger A, Yoon HW, et al. Homodimerization restores biological activity to an inactive erythropoietin mutant. *J Biol Chem* 1998;273:11173-6.
6. Gregory T, Yu C, Ma A, et al. GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating bcl-xL expression. *Blood* 1999;94:87-96.
7. Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, et al. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell* 1993;74:227-36.
8. Macdougall IC. Optimizing the use of erythropoietic agents - pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17(Suppl 5):66-70.
9. Egrie JC, Grant JR, Gillies DK, et al. The role of carbohydrate on the biological activity of erythropoietin. *Glycoconjugate J* 1993;10:263 (abstract S7.7)
10. Darling RJ, Kuchibhotla U, Glaesner W, et al. Glycosylation of erythropoietin affects receptor binding kinetics: role of electrostatic interactions. *Biochem* 2002;41:12524-31.
11. Egrie JC, Browne JK. Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). *Nephrol Dial Transplant* 2001;16(Suppl 3):3-13.
12. Macdougall IC, Gray SJ, Elston O, et al. Pharmacokinetics of novel erythropoiesis stimulating protein compared with epoetin alfa in dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:2392-5.
13. Egrie JC, Dwyer E, Browne JK, et al. Darbepoetin alfa has a longer half-life and greater in vivo potency than recombinant human erythropoietin. *Exp Hematol* 2003;31:290-9.
14. Elliott S, Lorenzini T, Asher S, et al. Enhancement of therapeutic protein in vivo activities through glycoengineering. *Nature biotechnol* 2003;21:414-21.
15. Elliott S, Egrie J, Browne J, et al. Control of rHuEPO biological activity: The role of carbohydrate. *Exp Hematol* 2004;32:1146-55.
16. Deicher R, Hörl WH. Differentiating factors between erythropoiesis-stimulating agents. A guide to selection for anaemia of chronic kidney disease. *Drugs* 2004;64:499-509.
17. Nissenson AR, Swan SK, Lindberg JS, et al. Randomized, controlled trial of darbepoetin alfa for the treatment of anemia in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2002;40:110-8.
18. Hörl WH, Holzer H, Mayer GJ. Treatment of renal anemia with darbepoetin alfa: results of an Austrian multicenter study [in German] *Wien Klin Wochenschr* 2002;114:967-71.
19. Jelkmann W. The enigma of the metabolic fate of circulating erythropoietin (Epo) in view of pharmacokinetics of the recombinant drugs rhEpo and NESP. *Eur J Hematol* 2002;69:265-74.
20. Gross AW, Lodish HF. Cellular trafficking and degradation of erythropoietin and novel erythropoiesis-stimulating protein (NESP). *J Biol Chem* 2006;281:2024-32.
21. Agoram B, Molineux G, Jang G, et al. Effects of altered receptor binding activity on the clearance of erythropoiesis-stimulating proteins: a minor role of erythropoietin receptor-mediated pathways? *XLIII ERA-EDTA Congress-July 15-18, 2006*.

## Afkortingen

- Da:** dalton  
**EPO:** (endogene) erythropoëtine  
**EPO-IRS:** erythropoëtine - internationale referentiestandaard  
**EPOR:** erythropoëtinerceptor  
**ERK2:** extracellulair signaalgereguleerd kinase 2  
**EMP:** erythropoëtine-mimetisch peptide  
**ESP:** erythropoëse-stimulerende proteïne  
**JAK-2:** januskinase 2  
**MAPK:** mitogeengeactiveerd proteïnekinase  
**NESP:** nieuwe erythropoëse-stimulerende proteïne (darbepoëtine alfa)  
**PI-3K/akt:** fosfatidyl-inositol-3-kinase  
**rHuEPO:** recombinante humane erythropoëtine  
**STAT5:** signaaltransducer en -activator van transcriptie 5