

Rol van P-glycoproteïne bij therapieresistente epilepsie ondergeschikt

Kim B. Gombert-Handoko ^{ab*}, H.J. Marian Majoie ^c,
Mirjam Hermans ^d, Walter A.J.J. Hermens ^a, Jeannette E.F. Zwart-
van Rijkom ^{be}, Yechiel A. Hekster ^f en Toine C.G. Egberts ^{be}

^a Ziekenhuisapotheek Noordoost-Brabant, 's-Hertogenbosch; thans Apotheek
Onze Lieve Vrouwe Gasthuis, Amsterdam

^b Divisie Farmaco-epidemiologie en farmacotherapie, Utrecht Institute for
Pharmaceutical Sciences, Universiteit Utrecht.

^c Epilepsiecentrum Kempenhaeghe, Heeze.

^d Afdeling Moleculaire Diagnostiek, Jeroen Bosch Ziekenhuis, 's-Hertogenbosch.

^e Afdeling Klinische Farmacie, Universitair Medisch Centrum Utrecht.

^f Afdeling Klinische Farmacie, Universitair Medisch Centrum Nijmegen.

* Correspondentie: k.b.gombert-handoko@olv.nl, k.b.handoko@uu.nl.

Kernpunten

- P-glycoproteïne (gecodeerd door het gen *ABCB1*) speelt misschien een rol bij het ontstaan van therapieresistente epilepsie.
- Onderzoek tot nu toe laat tegenstrijdige resultaten zien. De reden is wellicht dat een te beperkt aantal polymorfismen van het *ABCB1*-gen is onderzocht.
- Dit onderzoek, waarbij alle haplotypen van het *ABCB1*-gen zijn onderzocht, laat geen verband zien tussen het *ABCB1*-gen en therapieresistente epilepsie.
- Toekomstig farmacogenetisch onderzoek zou gericht moeten zijn op andere (transporter)genen en combinaties van genen.

Epilepsie is een ernstige neurologische aandoening die bij 0,4-0,8% van de bevolking voorkomt [1]. Bij de meerderheid van de epilepsiepatiënten slaat behandeling met anti-epileptica goed aan: de aanvallen zijn onder controle en er treden weinig tot geen bijwerkingen op. Ongeveer 30-40% van de patiënten wordt echter niet aanvalsvrij, zij worden therapieresistent genoemd [2, 3]. Tot op heden heeft men hiervoor geen duidelijke verklaring kunnen vinden. De laatste jaren is onderzoek gedaan naar de rol van de zogenaamde *multidrug transporters* bij therapieresistente epilepsie. De hypothese is dat deze transporteiwitten verantwoordelijk zijn voor het actief terugpompen van anti-epileptica uit de hersenen naar de bloedbaan en zo verhinderen dat zij in de hersenen voldoen de hun werking kunnen uitoefenen [4].

Een van de transporteiwitten waarnaar veel onderzoek is gedaan is P-glycoproteïne, die wordt gecodeerd door het *ABCB1*-gen (oude naamgeving: *MDR1*). Onderzoek tot nu toe liet wisselende resultaten zien voor associaties tussen polymorfismen (SNP's) van P-glycoproteïne en therapieresistente epilepsie [5-8]. Een mogelijke oorzaak is dat over het algemeen een tot drie SNP's werden bestudeerd. Om daadwerkelijk de genvarianten (haplotypen) die consequenties kunnen hebben voor het functioneren van P-glycoproteïne te

Abstract

Minor role of P-glycoprotein in therapy-resistant epilepsy

Objective

We extensively explored the association between high resolution haplotypes of the *ABCB1* gene (encoding the drug transporter P-glycoprotein) and drug-resistant epilepsy. Until now, association studies between polymorphisms in *ABCB1* and antiepileptic drug response have produced inconsistent results. This may be due to the fact that only few single nucleotide polymorphisms (SNPs) or small haplotype blocks have been studied.

Design and methods

A case control study was conducted in a main tertiary epilepsy centre in the Netherlands. Patients were eligible for inclusion if they were 18 years or older and were treated with antiepileptic drugs for at least one year. Cases were antiepileptic drug-resistant patients and controls were patients who were responsive to antiepileptic drug treatment. The frequency of 18 SNPs and the consequent 32 haplotypes of *ABCB1* were compared and tested with χ^2 and logistic regression analysis.

Results

In this study 287 patients were included and genotyped: 128 antiepileptic drug-resistant patients and 159 antiepileptic drug-responding patients with epilepsy. No association was found between individual SNPs and drug-resistant epilepsy. Almost 90% of all patients was represented by 9 haplotypes. No association was found for haplotypes of *ABCB1* and drug-resistant epilepsy.

Conclusion

Assessing high resolution haplotypes in the *ABCB1* gene, we found no association between *ABCB1* and drug-resistant epilepsy.

PW Wetenschappelijk Platform. 2008;2(9):203-207

onderzoeken, is het noodzakelijk een groter aantal SNP's te analyseren. Inmiddels is bekend dat het *ABCB1*-gen meer dan 60 haplotypen kent [9]. Doel van dit onderzoek is: bepalen of er een verband bestaat tussen het voorkomen van bepaalde haplotypen van het *ABCB1*-gen en therapieresistentie bij epilepsiepatiënten.

Methoden

Setting en onderzoekspopulatie

Dit retrospectieve case-controleonderzoek werd goedgekeurd door de Medisch Ethische Toetsings Commissie van Kempenhaeghe te

Tabel 1**Patiëntkarakteristieken van niet-responders en responders**

Eigenschap	Niet-responders (128) n (%)	Responders (159) n (%)	p-waarde
Leeftijd in jaren (spreiding)	41,7 (18-71)	43,4 (18-79)	0,315 $\square$
Man	63 (49)	93 (58)	0,117 ∇
Diagnose			
Partiële epilepsie			
• idiopatisch	0 (0)	3 (2)	
• symptomatisch	43 (34)	37 (23)	
• cryptogeen	77 (60)	92 (58)	0,011 ∇
Gegeneraliseerde epilepsie			
• idiopatisch	0 (0)	8 (5)	
• cryptogeen	1 (1)	1 (1)	
Ongedefinieerd	7 (5)	18 (11)	
Huidig aantal anti-epileptica			
• 1	30 (24)	76 (48)	<0,01 ∇
• 2	39 (31)	57 (36)	
• ≥ 3	58 (46)	26 (16)	
Soort anti-epilepticum			
• carbamazepine	55 (43)	68 (43)	0,927 ∇
• levetiracetam	42 (33)	18 (11)	<0,01 ∇
• lamotrigine	54 (42)	48 (30)	0,031 ∇
• oxcarbazepine	18 (14)	20 (13)	0,674 ∇
• fenytoïne	23 (18)	23 (14)	0,404 ∇
• valproïnezuur	19 (15)	40 (25)	0,034 ∇
$\square$ T-toets			
∇ chikwadraattest			

 $\square$ T-toets ∇ chikwadaatstest

Heeze, een van de twee tertiaire epilepsiecentra van Nederland. Patiënten van 18 jaar en ouder, afkomstig uit dit centrum, die minimaal een jaar met anti-epileptica zijn behandeld voor epilepsie, is gevraagd deel te nemen aan het onderzoek. Cases waren de therapieresistenten of de niet-responders, gedefinieerd als patiënten bij wie behandeling met minimaal drie geïndiceerde anti-epileptica leidde tot een aanvalsreductie van minder dan 30%. Zij werden vergeleken met de controles, de therapieresponders: patiënten bij wie de behandeling met medicatie had geleid tot een aanvalsreductie van meer dan 50% [7]. De patiënten is gevraagd een bloedmonster af te staan voor de genotypering. Aanvullend zijn patiëntgegevens zoals leeftijd, geslacht, classificatie van het type epilepsie, aanvalsfrequentie en medicatiegegevens verzameld uit de vragenlijsten die zijn ingevuld door de behandelend artsen.

Genotypering en analyse van haplotype

Het DNA is met een *generation capture column kit* uit de bloedmonsters geïsoleerd. Met *real time* PCR-SNP-analyse met TaqMan-MGB-

probes zijn achttien SNP's bepaald [1.8:rs3213619, 1.10:rs28381802, 2.2:rs2214102, 2.3:rs9282564, 5.1:rs2235015, 10.1:rs10276036, 11.2:rs2229109, 12.2:rs1128503 (C1236T), 12.5:rs2032588, 13.1:rs2235033, 14.2:rs2235013, 15.1:rs28381916, 18.1:rs2235063, 20.2:rs2235040, 21.2:rs9282563, 21.3a en b:rs2032582 (G2677T/A), 26.3:rs1045642 (C3435T)]. De selectie van deze SNP's is gebaseerd op detectie van haplotypen met een frequentie van >0,5% bij kaukasiërs [9]. Om te testen of de allelfrequenties voldeden aan het Hardy-Weinberg-evenwicht, werden de allelfrequenties van de individuele SNP's tussen de niet-responders en de responders vergeleken met de chikwadaatstest. Met het programma Phase (versie 2.1) konden de haplotypen worden geconstrueerd [10, 11]. De associatie tussen de haplotypen en niet-responders is uitgedrukt als een oddsratio met een bijbehorend 95%-betrouwbaarheidsinterval dat werd berekend met logistische-regressieanalyse. Voor confounders, zoals leeftijd, geslacht en diagnose, is gecorrigeerd indien deze onafhankelijk geassocieerd waren met de uitkomst ($p < 0,05$) of een verandering van meer dan 10% in de ruwe oddsratio zouden teweegbrengen.

Tabel 2Allelratio's SNP-analyse *ABCB1* bij niet-responders en responders

Variant	SNP (rs)	Allelratio's niet-responders (128) (wtwt/wtva/vava)	Allelratio's responders (159) (wtwt/wtva/vava)	chikwadratoetst	p-waarde
1.8	3213619	112/16/0	141/18/0	0,094	0,759
1.10	28381802	128/0/0	159/0/0	–	–
2.2	2214102	112/16/0	126/32/1	3,853	0,146
2.3	9282564	101/26/1	128/30/1	0,122	0,941
5.1	2235015	87/37/3	103/52/5	0,589	0,745
10.1	10276036	57/59/12	76/66/17	0,627	0,731
11.2	2229109	109/18/0	141/19/0	0,333	0,564
12.2 (C1236T)	1128503	34/71/23	50/79/30	1,063	0,588
12.5	2032588	113/15/0	137/22/0	0,283	0,595
13.1	2235033	24/72/32	36/79/44	1,286	0,526
14.2	2235013	24/72/32	36/79/44	1,286	0,526
15.1	28381916	126/2/0	156/3/0	0,044	0,835
18.1	2235063	127/1/0	155/4/0	1,246	0,264
20.2	2235040	101/27/0	122/35/1	0,873	0,646
21.2	9282563	126/2/0	156/3/0	0,044	0,835
21.3 (G2677TA)	2032582	34/66/24/3/1 [□]	47/76/30/4/2 [□]	0,592	0,964
26.3 (C3435T)	1045642	21/68/39	30/84/45	0,357	0,837

SNP: *single nucleotide polymorphism*; wt: wild type; va, variantallel[□] Aangezien SNP 21.3 een multi-allel-SNP is (namelijk G>T/A), is hier weergegeven: wtwt/wtva1/wtva2/va1va1/va2va2 (GG/GT/GA/TT/AA).

Resultaten

Tussen november 2005 en juli 2007 zijn in totaal 287 patiënten geïnccludeerd: 159 therapieresponders en 128 therapieresistenten. Allen waren kaukasiërs. Tussen de groepen zijn geen statistisch significante verschillen gezien in leeftijd en geslacht. Onder de therapieresistenten bevonden zich meer patiënten met partiële epilepsie (93,8% versus 83,0%) en minder patiënten met gegeneraliseerde epilepsie (0,8% versus 5,7%) (tabel 1). De patiënten die therapieresistent waren, gebruikten vaker drie of meer anti-epileptica dan de responders (45,7% versus 16,4%). Tevens gebruikten meer therapieresistenten dan responders nieuwere anti-epileptica zoals levetiracetam (33,1% versus 11,3%) en lamotrigine (42,5% versus 30,2%). Het gebruik van valproïnezuur was lager onder de therapieresistenten (15,0% versus 25,5%).

De gevonden allelfrequenties voldeden aan het Hardy-Weinberg-evenwicht (chikwadratoetst <3,84 en $p > 0,05$). De allelfrequenties van de individuele SNP's waren gelijk voor de niet-responders en de responders (kleinste p-waarde 0,146) (tabel 2). Met het programma Phase konden 32 verschillende haplotypen van het *ABCB1*-gen worden geconstrueerd, hiervan vertegenwoordigden negen haplotypen 88% van de bestudeerde populatie. Een significante associatie tussen de verschillende haplotypen en therapieresistentie is niet gevonden (tabel 3).

Beschouwing

In dit onderzoek is geen associatie gevonden tussen het voorkomen van bepaalde genotypen of haplotypen van het *ABCB1*-gen en

therapieresistente epilepsiepatiënten. Hiervoor kunnen verschillende verklaringen gegeven worden.

Ten eerste is het mogelijk dat onze definitie van therapieresistenten (patiënten bij wie behandeling met minimaal drie geïndiceerde anti-epileptica leidde tot een aanvalsreductie van minder dan 30%) versus therapieresponders (patiënten met een aanvalsreductie van meer dan 50%) niet voldoende onderscheidend is. In eerdere studies zijn verschillende definities voor therapieresistentie gebruikt, variërend van een of meer aanvallen per jaar tot meer dan tien aanvallen per jaar [6, 12]. Wij kozen voor onze formulering omdat we een duidelijk effect van de medicatie verwachtten en daarom juist wilden kijken naar een reductie van het aantal aanvallen door gebruik van medicatie zonder hierbij het absolute aantal aanvallen in beschouwing te nemen.

Ten tweede hebben wij in deze studie een patiëntengroep onderzocht die reeds in een tertiair centrum wordt behandeld. Het zou kunnen zijn dat hun genetische profiel vergelijkbaar is omdat zij allen patiënten zijn met een moeilijker behandelbare vorm van epilepsie. Als controlegroep zou daarom gekozen kunnen worden voor patiënten in een tweedelijnssetting. Deze mogelijke selectie-bias is echter onwaarschijnlijk omdat onze controlegroep vergelijkbaar was met een tweedelijns epilepsiepopulatie van een eerder onderzoek dat wij hebben uitgevoerd [13].

Ten derde is nog steeds onduidelijk in hoeverre de verschillende anti-epileptica daadwerkelijk substraat zijn voor P-glycoproteïne. Dierstudies geven aanwijzingen dat carbamazepine, fenytoïne, lamotrigine, oxcarbazepine en topiramaat door P-glycoproteïne

Tabel 3**ABCB1-haplotypeanalyse bij niet-responders en responders**

Haplotype	Niet-responders (%)	Responders (%)	OR _{ruw}	BI ₉₅	OR _{cor} [□]	BI ₉₅
*1	44 (17)	42 (13)	referentiegroep	–	referentiegroep	–
*2	13 (5)	10 (3)	1,24	0,49-3,13	1,92	0,54-6,86
*2a	16 (6)	23 (7)	0,66	0,31-1,43	0,38	0,06-2,42
*3	15 (6)	14 (4)	1,02	0,44-2,37	0,72	0,33-1,57
*13	44 (17)	66 (21)	0,64	0,36-1,13	1,23	0,27-5,71
*13c	32 (13)	35 (11)	0,87	0,46-1,65	0,98	0,57-1,69
*14	27 (11)	26 (8)	0,99	0,50-1,97	0,74	0,06-9,45
*21	11 (4)	22 (7)	0,48	0,21-1,10	0,58	0,20-1,65
*26	30 (12)	35 (11)	0,82	0,43-1,56	0,95	0,35-2,58

OR_{ruw}: ruwe oddsratio; OR_{cor}: gecorrigeerde oddsratio; BI: betrouwbaarheidsinterval

□ Gecorrigeerd voor leeftijd, geslacht, epilepsiediagnose, huidig aantal anti-epileptica en anti-epilepticagebruik.

getransporteerd worden [14-16]. Enkele casestudies laten eveneens zien dat toevoeging van een P-glycoproteïneremmer, verapamil of probenecide, kan leiden tot een betere respons op anti-epileptica [17-19]. (Geen van de patiënten in onze populatie gebruikte overigens deze middelen.) In eerste instantie wilden we onderscheid maken tussen het gebruik van de diverse middelen, maar aangezien er nog zo veel onbekend is op dit terrein, is toch ervoor gekozen alle anti-epileptica samen te nemen. Bovendien heeft een recente studie laten zien dat de respons op een volgend anti-epilepticum afneemt onafhankelijk van het middel dat daarvoor gebruikt is [20].

Ten vierde is er in de huidige studie slechts gekeken naar polymorfismen in het DNA. Andere factoren die van invloed kunnen zijn op de activiteit van P-glycoproteïne – zoals methylering van het ABCB1-gen, de hoeveelheid mRNA of eiwit en de aanwezigheid van miRNA's – zijn niet geëvalueerd. De praktische reden hiervoor is dat deze analyses hersenweefsel vereisen.

Ten vijfde zijn er naast P-glycoproteïne nog vele andere transport-eiwitten, zoals MRP1, MRP2 en BCRP [21]. Over deze transporters is veel minder bekend, maar het is mogelijk dat hun rol groter is dan tot nu toe gedacht wordt.

Ten slotte is het goed mogelijk dat andere mechanismen leiden tot therapieresistentie, een voorbeeld is de targethypothese [22]. Deze hypothese stelt dat er een verandering van de aangrijpingspunten van de anti-epileptica plaatsvindt, bijvoorbeeld in de subunits van de natriumkanalen (aangrijpingspunt voor de meeste anti-epileptica). Hierdoor verandert de gevoeligheid van het kanaal voor het anti-epilepticum, waardoor het middel niet meer zijn beoogde effect kan bereiken. In feite zou hier sprake zijn van een farmacodynamische interactie.

Conclusie

Uit dit onderzoek volgt dat polymorfismen en haplotypen van het ABCB1-gen niet geassocieerd zijn met therapieresistentie bij epilepsiepatiënten. Aangezien wij alle haplotypen van ABCB1 onderzocht hebben, denken wij dat toekomstig onderzoek naar oorzaken van therapieresistentie bij epilepsie zich zou moeten

richten op andere regulatiemechanismen van P-glycoproteïneactiviteit, andere transporteiwitten of andere genen die mogelijk een farmacodynamisch effect teweegbrengen.

Gebaseerd op de registratielezing van K.B. Gombert-Handoko.

De auteurs bedanken de neurologen van het Epilepsiecentrum Kempenhaeghe voor de inclusie van patiënten; Ad Schellekens, Jacques Hulsman, Jeroen Poodt, Kim Breure en Jean Conemans voor hun inspanningen met betrekking tot de bioanalyses en Fons Duchateau en collega's van de Ziekenhuisapotheek Noordoost-Brabant voor hun steun aan het onderzoek. Voor dit onderzoek is een financiële ondersteuning verkregen van het Arijan Porsius Fonds.

LITERATUUR

- 1 Sander JW. The epidemiology of epilepsy revisited. *Curr Opin Neurol*. 2003;16:165-70.
- 2 Kwan P, Brodie MJ. Early identification of refractory epilepsy. *N Engl J Med*. 2000;342:314-9.
- 3 Devinsky O. Patients with refractory seizures. *N Engl J Med*. 1999;340:1565-70.
- 4 Ramachandran V, Shorvon SD. Clues to the genetic influences of drug responsiveness in epilepsy. *Epilepsia*. 2003;44 Suppl 1:33-7.
- 5 Siddiqui A, Kerb R, Weale ME, et al. Association of multidrug resistance in epilepsy with a polymorphism in the drug-transporter gene ABCB1. *N Engl J Med*. 2003;348:1442-8.
- 6 Sills GJ, Mohanraj R, Butler E, et al. Lack of association between the C3435T polymorphism in the human multidrug resistance (MDR1) gene and response to antiepileptic drug treatment. *Epilepsia*. 2005;46:643-7.
- 7 Shahwan A, Murphy K, Doherty C, et al. The controversial association of ABCB1 polymorphisms in refractory epilepsy: an analysis of multiple SNPs in an Irish population. *Epilepsy Res*. 2007;73:192-8.
- 8 Zimprich F, Sunder-Plassmann R, Stogmann E, et al. Association of an ABCB1 gene haplotype with pharmacoresistance in temporal lobe epilepsy. *Neurology*. 2004;63:1087-9.
- 9 Kroetz DL, Pauli-Magnus C, Hodges LM, et al. Sequence diversity and haplotype structure in the human ABCB1 (MDR1, multidrug resistance transporter) gene. *Pharmacogenetics*. 2003;13:481-94.
- 10 Stephens M, Donnelly P. A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum Genet*. 2003;73:1162-9.
- 11 Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet*. 2001;68:978-89.

- 12 Hung CC, Tai JJ, Lin CJ, et al. Complex haplotypic effects of the ABCB1 gene on epilepsy treatment response. *Pharmacogenomics*. 2005;6(4):411-7.
- 13 Handoko KB, Zwart-van Rijkom JE, Visee HF, et al. Drug treatment-related factors of inadequate seizure control. *Epilepsy Behav*. 2008;13(3):545-8.
- 14 Potschka H, Loscher W. In vivo evidence for P-glycoprotein-mediated transport of phenytoin at the blood-brain barrier of rats. *Epilepsia*. 2001;42:1231-40.
- 15 Sills GJ, Kwan P, Butler E, et al. P-glycoprotein-mediated efflux of antiepileptic drugs: preliminary studies in mdria knockout mice. *Epilepsy Behav*. 2002;3:427-32.
- 16 Potschka H, Fedrowitz M, Loscher W. P-glycoprotein-mediated efflux of phenobarbital, lamotrigine, and felbamate at the blood-brain barrier: evidence from microdialysis experiments in rats. *Neurosci Lett*. 2002;327:173-6.
- 17 Summers MA, Moore JL, McAuley JW. Use of verapamil as a potential P-glycoprotein inhibitor in a patient with refractory epilepsy. *Ann Pharmacother*. 2004;38:1631-4.
- 18 Macphee GJ, McInnes GT, Thompson GG, et al. Verapamil potentiates carbamazepine neurotoxicity: a clinically important inhibitory interaction. *Lancet*. 1986;1:700-3.
- 19 Potschka H, Baltes S, Loscher W. Inhibition of multidrug transporters by verapamil or probenecid does not alter blood-brain barrier penetration of levetiracetam in rats. *Epilepsy Res*. 2004;58:85-91.
- 20 Schiller Y, Najjar Y. Quantifying the response to antiepileptic drugs: effect of past treatment history. *Neurology*. 2008;70:54-65.
- 21 van Vliet EA, Redeke S, Aronica E, et al. Expression of multidrug transporters MRP1, MRP2, and BCRP shortly after status epilepticus, during the latent period, and in chronic epileptic rats. *Epilepsia*. 2005;46:1569-80.
- 22 Remy S, Beck H. Molecular and cellular mechanisms of pharmacoresistance in epilepsy. *Brain*. 2006;129:18-35.

NEDERLANDS FARMACEUTISCH ONDERZOEK IN DE INTERNATIONALE LITERATUUR

GMP-productie van een DNA-vaccin voor klinisch onderzoek

Jos Kosterink

Van een groot aantal aandoeningen verschuift de behandeling steeds meer naar de toepassing van kleine peptiden: monoklonale antilichamen, vaccins en mondjesmaat ook gentherapeutica. Voor een *proof of principle* zijn in eerste instantie kleine hoeveelheden van het geneesmiddel in *clinical grade* nodig. Er is behoefte aan flexibele productie-eenheden die deze producten kunnen maken conform *good manufacturing practice* (GMP) tegen acceptabele kosten. Het hier beschreven onderzoek is daar een uitstekend voorbeeld van. Voor de behandeling van melanoom bieden DNA-vaccins een veelbelovende therapeutische benadering. In dit onderzoek is een plasmide ontwikkeld dat codeert voor de melanoom-geassocieerde epitoot (MART-1) en voor een immunostimulerende sequentie (tetanustoxinefragment-c). Dit plasmide, pDERMATT genoemd, zal in een fase-I-onderzoek intradermaal toegepast worden om de toxiciteit en de inductie van de tumorspecifieke T-cel-immuniteit vast te stellen. Hiervoor zijn een GMP-conforme plasmideproductie en een geschikte doseervorm ontwikkeld. Het onderzoek c.q. het ontwikkelingsproces resulteerde in productiebatches van circa 200 mg plasmide-DNA met een hoge zuiverheid: >90% *supercoiled* DNA, A260:280-ratio 1,80:1,95 en niet-aantoonbare of extreem lage residuen van endotoxinen, *Escherichia coli*-gastheer-eiwit, RNA en DNA. In het gehele productieproces zijn geen enzymen van dierlijke oorsprong gebruikt (zoals RNase) of potentieel schadelijke organische oplosmiddelen. Na steriele filtratie was de plasmide-concentratie circa 1,1 mg/ml.

Voor de daadwerkelijke intradermale toepassing is een concentratie noodzakelijk van circa 5 mg/ml. Deze is gerealiseerd door vries-drogen in een oplossing van 20 mg/ml sacharose. Het lyofilisaat is steriel, met >90% *supercoiled* DNA, A260:280-ratio 1,80:1,95, gehalte 90-110% van de declaratie en <2% (w/w) residu water. Het plasmide voldoet tevens aan het gedefinieerde profiel na restrictie-enzymanalyse en is sterk immunogeen, wat bevestigd is in een in-vivo-muis-model. Tevens is het product stabiel gedurende zes maanden bij 5°C. Kortom, er is niet alleen een reproduceerbaar proces ontwikkeld voor de productie van een aan de farmaceutische eisen voldoende plasmide-DNA, maar ook een stabiele doseervorm die toegepast kan worden in klinisch geneesmiddelenonderzoek.

Quaak SG, van den Berg JH, Toebes M, Schumacher TN, Haanen JB, Beijnen JH, Nuijen B. GMP production of pDERMATT for vaccination against melanoma in a phase I clinical trial. *Eur J Pharm Biopharm*. 17 mei 2008; epub ahead of print.