

Bloedspetters op de farmaceutische kaart

De farmaceutische industrie en klinische laboratoria hebben een oude methode herontdekt voor de kwantitatieve analyse van bloedmonsters. De bloedspotmethode is in feite een klassieker in een nieuw jasje, die veel mogelijkheden biedt om proefdiergebruik te verminderen en kosten te besparen.

Door Els van den Brink, gepubliceerd in het Laboratorium Magazine van November 2010

In de farmaceutische wereld is de Dried Blood Spot (DBS)-methode een ware hype. In plaats van meerdere buisjes bloed is een klein druppeltje bloed op een kaartje al voldoende voor een kwantitatieve analyse. GlaxoSmithKline (GSK) introduceerde de technologie in 2006 en heeft het in 2008 zelfs als standaard opgenomen in de procedures. Het bedrijf heeft hiermee al zeker 168 methodes voor meer dan 85 verschillende stoffen gevalideerd.¹ Sanofi-Aventis, die de methode eerder al gebruikte voor malaria onderzoek, heeft de bloedspotmethode in 2009 geïmplementeerd en toegepast bij zeker 26 verschillende stoffen.² Pfizer, AstraZeneca, Abbott en tal van andere farmaceutische bedrijven volgen hun voorbeeld of onderzoeken de mogelijkheden daartoe. Ook ziekenhuislaboratoria hebben de technologie ontdekt. Het Academisch Ziekenhuis Maastricht (AzM) introduceerde de methode onlangs voor bloedspiegelanalyses van niertransplantatiepatiënten. “Wij zijn de eerste met een klinische toepassing waarbij concentraties van 1 µg/ml nauwkeurig gemeten kunnen worden. Maar ziekenhuizen in Groningen, Amsterdam en Utrecht zijn ook al in geïnteresseerd”, vertelt Jaques van der Heijden, manager laboratorium Klinische Farmacie en Toxicologie van het AzM.

Klassieke hielprik

Echt nieuw is de technologie in feite niet. Robert Guthrie bedacht de bloedspotmethode al in de jaren zestig van de vorige eeuw voor de screening van pasgeborenen op phenylketonurie (PKU). Baby's krijgen deze hielprik nog steeds, voor screening op PKU en zestien andere erfelijke aandoeningen. Toch is er een duidelijk verschil tussen de klassieke hielprik en de nieuwe bloedspottechnologie. “De oude testen waren alleen kwalitatief en nooit kwantitatief”, vertelt Dr. Theo de Boer, manager Bioanalytical and Scientific Affairs bij QPS Netherlands (voorheen Xendo Drug Development) in Groningen. “De techniek was wel geschikt om de aanwezigheid van bepaalde eiwitten of andere biomarkers aan te tonen, maar voor de kwantitatieve bepalingen waren de concentraties te laag. Tegenwoordig zijn de analysetechnieken veel gevoeliger, waardoor dergelijke analyses nu wel mogelijk zijn.”

Spotten

Voor de nieuwe bloedspotmethode kan bloedafname bij patiënten en vrijwilligers simpelweg door een vingerprik. Bij muizen en ratten gebeurt dit door een prikje in hun staart, bij konijnen via het oor. Onderzoekers hebben vervolgens verschillende mogelijkheden om het afgenomen bloed op het kaartje aan te brengen, door het direct hierop te druppelen of aan te brengen via een capillair, waaraan eventueel een antistollingsmiddel kan worden toegevoegd. Sommige onderzoekers willen het bloed nog nauwkeuriger doseren. Ze vangen het bloed eerst op in een buisje, voordat ze het op het kaartje pipetteren. Na het spotten worden de kaartjes gedroogd en bewaard. Opslag en transport kunnen vervolgens gewoon bij kamertemperatuur plaatsvinden. Voorzorgsmaatregelen vanwege besmettingsgevaar zijn overbodig, doordat cellen tijdens het drogen lyseren en eiwitten denatureren.

Voor de analyse steken onderzoekers een klein rondje uit de kaartjes, met een diameter van ongeveer drie millimeter. Vaak gebeurt dit handmatig, maar er zijn al verschillende punchingrobots op de markt. De Boer legt uit: "Op zich is dit punchen niet veel meer werk dan het pipetteren wat we anders deden, maar het is ergonomisch een stuk zwaarder. Vandaar dat het belangrijk is om dit te automatiseren." Het AzM gebruikt hiervoor een zelfontwikkeld semiautomatisch apparaat. De rest van de analyse verloopt vergelijkbaar met de traditionele bloed- en plasma analyses. Eerst wordt het bloed met wat water losgeweekt van het papier, daarna volgt een extractie met organisch oplosmiddel. Ten slotte een analyse, meestal door middel van vloeistofchromatografie in combinatie met massaspectrometrie (LC-MS).

In principe is de bloedspotmethode overigens niet alleen bruikbaar voor de analyse van bloed, maar ook van andere vloeistoffen zoals bloedplasma, urine of wangslim. Hoewel voor deze vloeistoffen de voordelen minder groot zijn, zijn verschillende bedrijven bezig om dit te onderzoeken.

Gevoeligheid

"Het enige punt bij de bloedspotmethode is nog de gevoeligheid. Bij heel lage doseringen kan dat wel een probleem zijn", zegt De Boer. "Voor het gros van de geneesmiddelen is de gevoeligheid voldoende. Wij konden zelf analyses doen tot een concentratie van 0,1 nanogram/milliliter. Maar als je iets wilt meten met een concentratie van bijvoorbeeld 5 picogram/milliliter, dan wordt het wel lastig." Daarom wordt de bloedspotmethode nu nog vooral preklinisch toegepast bij proefdieren. Hier liggen geneesmiddelconcentraties vaak een stuk hoger dan bij klinisch onderzoek, wat de analyse vereenvoudigt.

De Boer verwacht dat de gevoeligheid van de analysetechnieken verder zal verbeteren. "Er zijn verschillende bedrijven bezig met de ontwikkeling van apparatuur om de complete analyse, inclusief extractie, volautomatisch uit te voeren (zie kader). Dat kan de gevoeligheid met een factor tien of twintig verbeteren."

Minder proefdieren

"Bij preklinisch onderzoek is de bloedspotmethode een uitgelezen kans, omdat je minder proefdieren nodig hebt", meent hij. In het kader van de 3V's (Vervanging, Vermindering en Verfijning) is dat een belangrijk streven van de farmaceutische industrie. "In het verleden werd soms het bloed van drie ratten gepooled om een goede analyse te kunnen uitvoeren. Nu hebben we voldoende aan één druppel van twintig microliter", vertelt De Boer. Daardoor is poolen niet meer nodig, en is het mogelijk om op meerdere tijdstippen monsters te nemen van hetzelfde proefdier. GSK schat hun proefdiergebruik met drieëndertig tot drieënveertig procent te kunnen verminderen. De proeven worden bovendien diervriendelijker, doordat het niet meer nodig is om de dieren voor bloedafname te verwarmen.

Fenotyperingsstudie

"Bij klinisch onderzoek is het grote voordeel dat je monsters niet meer hoeft af te draaien en in te vriezen, en geen kisten vol droogijs nodig hebt bij het vervoer. Dat is een enorme kostenbesparing", stelt De Boer. Voor de betrokken patiënten of vrijwilligers is het bovendien prettig dat ze niet meer elke keer naar het ziekenhuis hoeven om bloed te laten afnemen. "Met een vingerprik kunnen de mensen dat eenvoudig thuis doen", zegt De Boer. Hij heeft onlangs een studie afgerond, waarmee hij de bruikbaarheid van de bloedspotmethode heeft aangetoond voor een fenotyperingsstudie. Dat hield in dat vrijwilligers gescreend werden om te zien of ze geneesmiddelen snel of langzaam metaboliseren, een gegeven wat nodig is voor de start van een klinische studie. In vervolg kan QPS deze screening uitvoeren op basis van de bloedspotmethode.

Niertransplantatiepatiënten van het Academisch Ziekenhuis Maastricht kunnen dankzij de bloedspotmethode thuis bloed prikken ten bate van de noodzakelijke bloedspiegelbepalingen. Deze bepalingen moeten regelmatig plaatsvinden om de juiste dosering voor hun afstotingsmedicijnen vast te stellen. Van der Heijden vertelt: "Voorheen moesten patiënten nuchter naar het ziekenhuis komen, met lange wachttijden tussendoor. Voor het opnemen van een dagcurve, met meerdere

keren prikken, was zelfs een dagopname noodzakelijk. Nu kan dat allemaal gewoon thuis. Voor een klinische trial, waarin we dagcurves opnemen om verschillende medicijnen te vergelijken, betekent dat een kostenbesparing van driehonderdduizend euro.”

De bloedspotmethode zorgt daarnaast ook voor nieuwe mogelijkheden voor klinisch onderzoek. Voor kinderen is deze manier van bloedafname bijvoorbeeld een stuk minder belastend. Klinisch onderzoek in ontwikkelingslanden, waar voorzieningen zoals centrifuges en vriezers minder beschikbaar zijn, is hierdoor ook een optie. Van der Heijden is daar nu al mee bezig. “Wij ontwikkelen een project voor tuberculosepatiënten in de derde wereld. Zelfs op de meest eenvoudige zusterposten kunnen zij bloed afnemen met een vingerprik en op een kaartje versturen”, vertelt hij.

Vlucht

Of regulerende instanties resultaten van bloedspottesten zullen accepteren als bewijslast, is nog niet helemaal duidelijk, maar De Boer verwacht geen problemen. “Volgens de richtlijnen is het toegestaan om testen te doen met totaal bloed in plaats van bloedplasma. Ik neem daarom aan dat deze technologie zal worden goedgekeurd. Op dit moment is er nog geen aanvraag ingediend voor een geneesmiddel op basis van bloedspottesten. Dat is dus nog even afwachten. Ik verwacht dat deze technologie een nog grotere vlucht zal nemen zodra het eerste geneesmiddel van GSK op basis van bloedspottesten wordt goedgekeurd.”

Volautomatische DBS

Voordat laboratoria bloedspots kunnen analyseren, moeten ze deze eerst punchen en extraheren. Verschillende bedrijven zijn bezig met de ontwikkeling van nieuwe technologie om deze stappen over te slaan en bloedspots direct volautomatisch te analyseren. Hiervoor zijn twee mogelijkheden. De eerste mogelijkheid is om het bloed volautomatisch van het papier af te halen, op basis van de principes van dunnelaagchromatografie (TLC) of *solid phase extraction* (SPE). Hierbij loopt een vloeistof door het papier van de bloedspot en neemt de verschillende stoffen mee naar de massaspectrometer. Een TLC-applicatie wordt bijvoorbeeld ontwikkeld door het Zwitserse bedrijf CAMAG, terwijl Spark Holland werkt aan een toepassing op basis van SPE. Een andere mogelijkheid is directe desorptie, waarbij de componenten bijvoorbeeld kunnen vrijkomen door bestraling met een hete geladen gasstroom.

Het AzM heeft met een aantal partners, waaronder DSM en Spark Holland, een subsidieproject van Pieken in de Delta binnengehaald. Doel is om de bloedspottechnologie te automatiseren en voor een breder kader toegankelijk te maken. Jaques van der Heijden legt uit: “De kwantitatieve toepassing van deze techniek is nog zo nieuw, dat er nog veel verbeteringen mogelijk zijn. Je kunt het vergelijken met HPLC, waarbij in eerste instantie alleen silicakolommen beschikbaar waren, terwijl nu allerlei kolommen beschikbaar zijn van geavanceerd materiaal. Zo kan het papier van de kaartjes misschien ook vervangen worden door meer geavanceerd dragermateriaal.”

¹Data afkomstig van presentatie Matt Barfield tijdens EBF conferentie in Brussel, juni 2010.

²Data afkomstig van een EBF conferentie in Barcelona, December 2009.