

Memoires Désiré Collen

Memoires Désiré Collen

EEN HART VOOR ONDERZOEK EN ONDERNEMEN

Désiré Collen

VANDEN BROELE

Memoires Désiré Collen

EEN HART VOOR ONDERZOEK EN ONDERNEMEN

© 2009 – Désiré Collen/Uitgeverij Vanden Broele, Brugge
X + 228 p.
Foto cover: Bart Van Leuven
ISBN 978 90 4960 056 3
D/2009/0783/82
NUR 681

Vormgeving en druk : Grafische Groep Vanden Broele
Tekstredactie : Peter Raeymaekers

Alle rechten voorbehouden. Behoudens de uitdrukkelijk bij wet bepaalde uitzonderingen mag niets uit deze uitgave worden veelevoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand of openbaar gemaakt, op welke wijze ook, zonder de uitdrukkelijke voorafgaande en schriftelijke toestemming van de uitgever.

Uitgeverij Vanden Broele, Stationslaan 23, B-8200 Brugge

www.uitgeverij.vandenbroele.be

INHOUD

| | |
|---|----|
| Voorwoord | 1 |
| t-PA en trombolysen ... de context van een levensverhaal | 7 |
| Een eenvoudig experiment | 7 |
| Levensreddende optie voor hartinfarct | 7 |
| De tol van hart- en vaatziekten | 8 |
| Plaques en stolsels | 9 |
| ‘Open-slagader’-hypothese | 10 |
| Oorzaak of gevolg? | 11 |
| Koppige volhouders | 11 |
| Weinig animo | 12 |
| Opnieuw schot in de zaak | 13 |
| | |
| Deel I. Wat voorafging | 15 |
| Dubbel opgeleid | 17 |
| Eerst braaf, dan minder braaf en ten slotte hard werkend | 17 |
| Eerste onderzoekservaring | 18 |
| Geneeskunde en chemie | 19 |
| Gebet door onderzoek | 21 |
| Klinische opleiding in mineur door revalidatie en reoriëntatie | 22 |
| New York | 24 |
| Stockholm | 25 |
| Terug in Leuven | 26 |
| Afgerond | 27 |
| Fibrinolyse moleculair ontrafeld | 31 |
| Leven en dood van een bloedklonter | 31 |
| Oplossend trio: plasminogeenactivator, plasminogeen en fibrine | 32 |
| Een onbekende remmer | 34 |
| Ontdekking van α_2 -antiplasminen | 36 |
| Ondernemer in spe? | 39 |
| Onder contract bij LR&D | 39 |
| Boer-ondernemer | 40 |

| | |
|--|----|
| Deel II. t-PA-story | 43 |
| Een lastig eiwit | 45 |
| Fibrinespecifiek | 45 |
| De rollende sneeuwbal | 46 |
| Een kankergeneesmiddel? | 46 |
| Productiekampioen | 48 |
| Opgebruikt geluk | 48 |
| Vermoedens worden feiten | 49 |
| Gered vanuit Nederland | 49 |
| Een snelle tussenspurt | 50 |
| Een patent en een cont(r)act ... met de vermeende dochter van een professor | 55 |
| Goede raad van Rector Pieter De Somer | 55 |
| Een eerste octrooi | 55 |
| Te vroeg, te laat ... of net op tijd | 56 |
| A piece of cake | 56 |
| Een nieuwe industrie | 57 |
| LR&D op pad gestuurd | 58 |
| 18/24, 7/7 | 59 |
| Een mooi eiwit | 59 |
| De wind tegen | 61 |
| Dansende poppen | 61 |
| Loyaliteit in collaboraties | 61 |
| Samenwerking met Genentech gaat onverminderd verder | 63 |
| Een eerste patiënt | 65 |
| Op congres in Rotterdam | 65 |
| Een kritieke nierpatiënt | 65 |
| Preklinisch t-PA-onderzoek | 69 |
| Amerikaanse honden | 69 |
| Recombinant t-PA, niet te onderscheiden van natuurlijk Bowes melanoma t-PA | 70 |
| Niet over één nacht ijs | 70 |
| Een verloren vriend | 71 |
| De eerste klinische studies met t-PA | 73 |
| Dubbel record | 73 |
| Eerste gerandomiseerde studie | 73 |

| | |
|--|-----|
| Europese ECG en Amerikaanse TIMI Studies | 77 |
| NIH stapt in, TIMI-1 | 78 |
| Een eerste keer rt-PA tegen streptokinase | 79 |
| NEJM en Lancet | 80 |
| Statistisch significant maar ook klinisch relevant? | 81 |
| Ethisch debat rond placebo | 81 |
| Een nieuwe reeks rt-PA-studies | 82 |
| 80, 100 of 150 mg – terug naar TIMI | 84 |
| 1987, het jaar van de goedkeuring van rt-PA door de FDA | 85 |
| Vrijdag 29 mei 1987 | 85 |
| Een genuanceerde weergave van de feiten | 86 |
| Een samenloop van onduidelijkheden | 88 |
| Eind goed, al goed? | 89 |
| Even goed of beter, maar alleszins duurder | 91 |
| Dichotomie privaat-publiek | 91 |
| Kip met de gouden eieren? | 92 |
| Op weg naar een ‘head-to-head’ | 93 |
| Kapers op de kust, rt-PA getest in de rechtszaal | 95 |
| Voor de volksjury | 95 |
| Drie weken in Wilmington | 96 |
| Over de hele lijn | 96 |
| Grote crisis | 97 |
| De koude douche van GISSI-2 | 97 |
| Een complexe waarheid | 98 |
| ISIS-3, een (fatale?) schep bovenop | 99 |
| De 1% van GUSTO | 101 |
| Megastudie | 101 |
| Resultaten samengebald | 102 |
| 1% minder sterfte tegen een redelijke prijs | 103 |
| rt-PA, epiloog | 107 |
| De kinderen van rt-PA | 107 |
| Trombolysie of dotteren en stenten | 108 |
| Een tweede leven | 109 |
| Terugkijkend op het t-PA-verhaal | 111 |

| | |
|---|-----|
| Deel III. Ondernemen tussen academia en industrie | 113 |
| Van LR&D over Innovi tot Thromb-X en ThromboGenics Ltd | 115 |
| Fundamentele documenten | 115 |
| Een nieuwe speler – Innovi | 116 |
| Duwtje in de rug | 117 |
| Exclusieve overeenkomst met Genentech – versie 1983 | 118 |
| Breuk met Innovi | 118 |
| Innovi uitgekocht | 119 |
| De nv t-PA | 120 |
| Thromb-X | 120 |
| Thromb-X en 4C | 121 |
| Thromb-X en de vakbond | 123 |
| ThromboGenics Ltd | 123 |
| De D. Collen Research Foundation | 125 |
| Gemeenschappelijk bestuurd | 125 |
| Activiteiten van DCRF | 127 |
| Een ‘niet-zó’ rijke, maar eigengereide professor? | 129 |
| Mijn privéjet | 129 |
| Solidariteitskassen aan de K.U.Leuven | 131 |
| Solidariteitsfonds – ronde 1 | 132 |
| Solidariteitsfonds – ronde 2 | 133 |
| Coup de théâtre en onterechte insinuaties | 134 |
| Geen leerstoel en ... | 135 |
| ... geen rector | 136 |
| Vakschool en/of onderzoeksinstelling? | 137 |
| Naar Londen | 138 |
| Overdracht van LR&D naar DCRF | 138 |
| Anker toch niet gelicht | 140 |
| Stafylokinase – t-PA voor arme mensen | 141 |
| Een déjà vu | 141 |
| Lab in overdrive | 142 |
| Kloon en gen | 143 |
| Preklinisch onderzoek | 144 |
| De eerste patiënt | 145 |
| Thromb-X en ThromboGenics | 146 |
| Hulp van buitenaf | 146 |
| Klinische studies | 149 |
| Immunogene karakter | 149 |

| | |
|---|-----|
| Het Vlaams (Interuniversitair) Instituut voor Biotechnologie | 153 |
| VLAB | 153 |
| Compromis ‘à la belge’ | 154 |
| Een bankgarantie !? | 154 |
| ‘Administratief kantoor’ en ‘perifere executanten’ | 155 |
| Instituut zonder weerga met focus op excellentie | 156 |
| Klimaat voor ondernemen | 157 |
| Een pluim voor politici | 158 |
| VIB3 – Departement voor Transgene Technologie en Gentherapie | 159 |
| Eerste knock-outs in België | 159 |
| VEGF, de start van een nieuwe onderzoeksrichting | 160 |
| VIB 3 | 161 |
| Angiogenese-‘geweld’ | 162 |
| Medicijn tegen ALS? | 163 |
| Kankeronderzoek | 164 |
| Vesalius | 165 |
| ThromboGenics, beursgenoteerd en wissel op de toekomst | 167 |
| Microplasmine, in ‘poleposition’ | 168 |
| Naar fase III | 169 |
| Microplasmine voor hersentrombose | 170 |
| Stafylokinase | 171 |
| Antilichaam tegen factor VIII (TB-402) | 172 |
| Antilichaam tegen PlGF | 173 |
| Vroeg in de pijplijn | 174 |
| Een winnend team | 175 |
| Epiloog: Wat nu? | 177 |

| | |
|--|-----|
| Bijlagen | 183 |
| 1. Thrombosis test, mijn eerste octrooi | 185 |
| 2. Overeenkomst tussen LR&D en Désiré Collen | 187 |
| 3. Het t-PA-octrooi | 189 |
| 4. Eerste overeenkomst tussen Genentech en Leuven Research & Development vzw | 191 |
| 5. Succesvolle klonering van t-PA | 193 |
| 6. Publicatie in New England Journal of Medecine | 195 |
| 7. Proces in Wilmington | 197 |
| 8. Document dat de fusie tussen nv t-PA en Thromb-X bekrachtigt | 199 |
| 9. Oprichtingsakte van Thromb-X | 201 |
| 10. Overeenkomst tussen Thromb-X en 4C | 203 |
| 11. Oprichtingsakte van de D. Collen Research Foundation | 205 |
| 12. SakSTAR | 207 |
| 13. Publicatie van Peter Carmeliet in <i>Nature</i> | 209 |
| 14. Curriculum Vitae Désiré Collen | 211 |
| Verklarende woordenlijst | 215 |
| Register | 221 |

Voorwoord

De ontwikkeling van rt-PA (recombinant tissue plasminogen activator; weefsel plasminogeen activator) tot een succesvol geneesmiddel geldt als een schoolvoorbeeld van succesvolle samenwerking tussen universiteit en industrie. Sommigen noemen het zelfs een paradigma. Zelf heb ik niet het gevoel dat dit succes het gevolg was van zorgvuldige planning, tenminste niet van mijn zijde. Het succes van rt-PA is er gekomen dankzij een samenloop van omstandigheden en een flinke dosis toeval (serendipiteit), weliswaar gevolgd door hard werken, zowel in onze laboratoria in Leuven, als in klinische centra in Europa en de VS, als bij *Genentech*. In elk geval kijk ik met bijzondere gevoelens en een zekere fierheid terug op het t-PA-verhaal. Op minder dan tien jaar werd de stap gezet van een biochemisch concept – de fibrineselectiviteit van sommige eiwitten die bloedklonters oplossen – tot het meest succesvolle trombolytisch geneesmiddel tegen een hartaanval. Tussen het allereerste experiment met t-PA in ons laboratorium (toen nog in niet- gekloneerde versie) en de goedkeuring van recombinant t-PA door de Amerikaanse *Food and Drug Administration* (FDA) lag zelfs minder dan acht jaar. Dat dit onwaarschijnlijk korte tijdspannes zijn, dat beseft iedereen die thuis is in de geneesmiddelenindustrie. Als voorbeeld van ‘bench to bedside’ of van ‘translationeel onderzoek’ naar nieuwe geneesmiddelen – om maar eens een modewoord te gebruiken – kan het tellen.

rt-PA werd een belangrijk geneesmiddel: ondanks zijn stevig prijskaartje groeide het uit tot de ‘eerste keuze’ voor patiënten met een hartinfarct. Tenminste als die snel genoeg naar het ziekenhuis konden worden gebracht. Op tijd ingrijpen was, en is ook vandaag met de percutane coronaire interventies (dotteren en stenten) - nog altijd cruciaal bij een hartinfarct. Tijdens de hoogdagen van rt-PA werden elk jaar meer dan een kwart miljoen hartpatiënten met rt-PA behandeld. Vóór de komst van de trombolytische geneesmiddelen overleed tot een kwart van deze patiënten; aan het einde van de jaren ‘80 zou dit percentage door verscheidene ontwikkelingen in de cardiovasculaire geneeskunde teruglopen tot onder de 10%. Vele tienduizenden patiënten hebben hun leven te danken aan rt-PA.

Omdat *Leuven Research and Development* vzw (LR&D), de technologie transfer organisatie van de K.U.Leuven, de patentrechten had op t-PA, heeft de instroom van royalty’s - aangevuld met reguliere bronnen voor onderzoeksfinanciering - gezorgd dat het Centrum voor Moleculaire en Vasculaire Biologie kon uitgroeien tot een onderzoekscentrum met wereldfaam en dat we er het in 1994 opgestarte Centrum voor Transgene Technologie en Gentherapie van het Vlaams Instituut voor Biotechnologie (VIB) konden mee financieren. Bovendien hadden we mogelijkheden om bijtijds nieuwe onderzoeksrichtingen in te slaan, van angiogenese (de vorming van bloedvaten) over gentherapie tot onderzoek naar de aanleg van zenuwbanen en de behandeling van solide tumoren en neurodegeneratieve ziekten als amyotrofe laterale sclerose. De royalty’s op rt-PA hebben er ook toe

bijgedragen dat jaarlijks vier of vijf jonge universitaires, initieel via een fellowship van de K.U.Leuven en nadien van de *Belgian American Educational Foundation* voor een periode van minstens één jaar naar de VS kunnen om belangrijke expertise op te bouwen en ervaring op te doen. Tot slot hebben we ook een industriële biomedische activiteit in Vlaanderen kunnen uitbouwen. *Thromb-X* en zijn latere opvolger *ThromboGenics* hebben mee geholpen om Vlaanderen op de kaart van de industriële biotechnologie te zetten. Als een van de jonge beursgenoteerde bedrijven in de sector hoop ik dat *ThromboGenics* een even succesvol groeipad opgaat als *Genentech* met rt-PA.

Mogelijk heeft de rt-PA-samenwerking tussen K.U.Leuven en *Genentech* als succesvol rolmodel ook bijgedragen tot de oprichting van het Vlaams Instituut voor Biotechnologie (VIB). Deze parel aan de Vlaamse kroon van onderzoeksinstituten is goed op weg om zichzelf een plaats te veroveren binnen de topliga van Europese onderzoeksinstituten in de levenswetenschappen. Steeds meer kan het VIB de voet zetten – alle verhoudingen van grootte in acht genomen, natuurlijk – naast onderzoeksorganisaties als het Duitse *Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften*, het Franse *Centre National de la Recherche Scientifique* of het Zwitserse *Federal Institute of Technology*.

Niet al mijn projecten zijn succesnummers geworden. Stafylokinase - het t-PA voor ‘arme mensen’ - is veel minder goed van de grond gekomen, ondanks deze keer een wel doordachte planning en met de ervaring van rt-PA achter de rug. Ook mijn relatie met sommige bestuurders van de K.U.Leuven, en een aantal collega-professoren is niet altijd rimpelloos verlopen. Niet iedereen was gelukkig met de manier waarop ik, nochtans altijd in overleg en met akkoord van de K.U.-Leuven, zoals contractueel verplicht, de royaltystroom heb gemanaged of prioriteiten heb gelegd. Sommigen meenden zelfs dat de universiteit, die via LR&D eigenaar was van het t-PA-octrooi en van alle juridische en economische rechten die eruit voortvloeiden, centraal de bestemming van de inkomsten moest kunnen bepalen. Dit heb ik efficiënt kunnen keren.

Daartegenover staat dat het overgrote deel van mijn enkele honderden wetenschappelijke medewerkers positief terugdenken aan onze wetenschappelijke samenwerking, dat ik ook in mijn beroepsleven veel vrienden heb gemaakt en (uitzonderlijk) weinig vijanden. Ik ben dan ook uitermate verheugd met de herinneringsposter die mijn huidige medewerkers in Leuven mij aangeboden hebben ter gelegenheid van mijn emeritaat. Met op de achtergrond de poster voor de aankondiging van het afscheidssymposium voor mijn emeritaat (*Heart for the Future*) is de gesymboliseerde structuur van t-PA uitgebeeld waarbij de bouwstenen, die in hun eenlettersymbool in cirkel weergegeven zijn in de *Nature*-publicatie van Pennica et al, vervangen zijn door afbeeldingen van mijn medewerkers. Aangezien er 527 aminozuren (cirkels) zijn in het natuurlijke t-PA en ik ‘slechts’ in totaal 274 medewerkers had in 2008, is er wat artistieke vrijheid genomen bij de postervoorstelling.

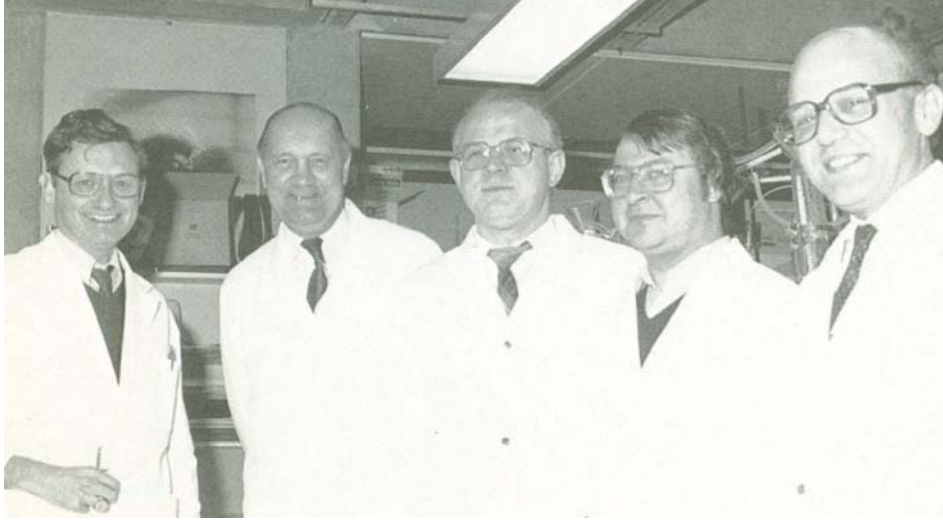
HEART for the FUTURE



Op het ogenblik dat dit boek verschijnt, ben ik een jaar op emeritaat en heb ik de tijd gehad om een aantal gebeurtenissen nog eens op een rijtje te zetten. Niet alleen het t-PA-verhaal zelf, maar ook wat er voor kwam en al wat t-PA met zich mee heeft gebracht. Het idee om mijn persoonlijke ervaringen te boek te stellen, is niet nieuw en komt in oorsprong zelfs niet eens van mezelf. Het werd me al vaak gesuggereerd, meestal ter gelegenheid van conversaties aan de eetdis of op een receptie. Ik heb me echter steeds gerealiseerd dat ik dan gevoelige thema's zou moeten aansnijden zoals de persoonlijkheid van diverse actoren in het t-PA-verhaal en daarbuiten, de soms richtinggevende invloed van de industrie op onderzoek, de stoeve relaties binnen de universiteit, enzovoort. Een paar keer heb ik de pen of het toetsenbord ter hand genomen en ben ik begonnen met het opschrijven van mijn verhaal, om echter snel daarna te stoppen. Ik besepte dat ik te veel gevoeligheden zou aanraken en dat de tijd (toen) nog niet rijp was. Om Leo Tindemans te parafaseren: bij het te vroeg schrijven van dit boek zou ik 'vrienden verliezen', terwijl ik bij het te laat schrijven 'geen lezers meer zou hebben'. Daarom meen ik dat de tijd nu wel rijp is. Over een aantal feiten heeft de tijd immers een zekere mildheid gelegd, terwijl het verhaal aan de andere kant nog genoeg actuele elementen bevat om interessant te blijven voor een breder

publiek. Het is een boek geworden met veel elementen: de aanloop naar t-PA in deel I, het t-PA-verhaal in deel II, en de doorgroei naar geneesmiddelenontwikkeling tussen academia en industrie in deel III. Het bevat niet alleen mijn positieve ervaringen als professor, onderzoeker en ondernemer, maar ook mijn minder geslaagde exploten.

Het is niet mijn bedoeling met dit boek wie dan ook na te trappen, maar het is evenmin de bedoeling alles toe te dekken met de mantel der liefde, want dan kon ik beter gaan vissen (of in mijn geval vliegen). Zij die me kennen, weten dat ik niet rancuneus ben, maar dat ik eerder het hart op de tong draag. Als ik niet akkoord ben met iemands zienswijze, kom ik daar recht voor uit, ongeacht wie mijn opponent is. Over de jaren heb ik een soort allergie ontwikkeld tegen huchelarij en compromissen die niet tegen het daglicht kunnen worden gehouden. Hierdoor heb ik dikwijls kansen moeten laten liggen en heb ik in sommige gelegingen de reputatie van een moeilijk en zelfs ietwat gevaarlijk man gekregen, die best “in zijn labo en van de straat gehouden wordt.” Ik ben me er wel van bewust dat sommige spelers in dit verhaal delen ervan anders zouden vertellen. Misschien omdat hun geheugen een andere versie heeft opgeslagen of omdat geen twee mensen dezelfde feiten op dezelfde manier interpreteren. Ik heb me gebaseerd op mijn eigen geheugen en mijn – weliswaar beperkte – correspondentie, op de omvangrijke wetenschappelijke bibliotheek over trombolysen, de octrooien en opgestelde contracten, en getuigenissen die werden afgelegd tijdens het symposium ‘*Heart for the future*’ en die werden neergeschreven in de ‘*Anthology of Scientific Collaborations*’, beide naar aanleiding van mij emeritaat. Toch had ik het gevoel dat er nog een extra filter nodig was en dat sommige zaken beter door een onafhankelijke persoon nog een keertje moesten gecheckt worden. Daarom heb ik de pen toevertrouwd aan Peter Raeymaekers. Met een onderzoekservaring van vijftien jaar kent hij de wereld van het biomedische onderzoek en met een tien jaar lange ervaring als wetenschapsschrijver en -communicator vond ik in hem een uitstekend klankbord. Niettemin blijven de verhalen in dit boek mijn impressies en mijn interpretaties en bijgevolg neem ik er ook de volle verantwoordelijkheid voor.



De wetenschappelijke staf van het Centrum voor Trombose en Vasculair Onderzoek (K.U.Leuven) rond 1985 met v.l.n.r. Prof. Vermeylen, Prof. Verstraete (diensthoofd), Prof. Collen, Prof. Lijnen en Prof. Verhaeghe

Ik had het geluk om sinds 1965 terecht te komen in de onderzoeksgerichte omgeving van het Laboratorium voor Bloedstolling, dat in 1955 als eenmansbedrijf gestart was door Prof. dr. Marc Verstraete. Het lab werd later omgedoopt tot achtereenvolgens het ‘Centrum voor Trombose en Vasculair Onderzoek’ en het ‘Centrum voor Moleculaire en Vasculaire Biologie’ van de K.U.Leuven en telt thans een tachtigtal medewerkers. Ik ben veel dank verschuldigd aan Prof. dr. Marc Verstraete, voor zijn niet aflatende steun aan mijn onderzoek, zelfs al lag het soms buiten zijn eigen expertise. Ik heb ook het geluk gehad om met talrijke jonge Belgische en buitenlandse studenten, MD’s en PhD’s, en met een trouwe schare zeer bekwame laboranten en technici te kunnen samenwerken. Bovendien was het t-PA-verhaal er nooit gekomen zonder een intense samenwerking met andere onderzoeksgroepen, zowel aan meerdere universiteiten als in de industrie. Al deze mensen draag ik een warm en dankbaar hart toe.

Dit boek gaat over mijn ervaringen als onderzoeker en ondernemer en, op uitdrukkelijk verzoek van mijn gezin, niet over familiale of persoonlijke ervaringen, buiten enkele anekdotes die relevant zijn voor het gebrachte verhaal. Een oprecht dankwoord aan mijn echtgenote Louisa voor haar toewijding en uithoudingsvermogen. Steeds heeft zij klaargestaan om, dikwijls ‘on short notice’, in te pakken en te verhuizen naar New York, Stockholm, Burlington VT, San Francisco of Londen. Het aanhouden van een job is er voor haar sinds 1968 niet meer bij geweest omdat zij het overgrote deel van de gezinstaken uitgevoerd heeft. Op dat gebied mag ik mijzelf geen progressieve houding of evenwichtige taakverdeling aanmeten.

Désiré Collen

t-PA en trombolyse ... de context van een levensverhaal

Een eenvoudig experiment

Februari 1979. Het experiment was uitermate eenvoudig. We mengden enkele druppels ‘geconditioneerd’ groeimedium met gezuiverd fibrinogeen, het eiwit dat de voorloper is van fibrine en dat verantwoordelijk is voor de vorming van bloedklonters. Het geheel deden we stollen. In het ‘geconditioneerd’ groeimedium waren voordien cellen van de ‘Bowes’-melanomacellijn opgegroeid. We wisten al dat de melanomacellijn een eiwit afscheidde, een zogenaamde plasminogeenactivator, dat een mechanisme op gang bracht waardoor bloedstolsels oplossen. Het doel van het experiment was echter om na te gaan in hoeverre de plasminogeenactivator uit het kweekmedium zich al of niet zou binden aan het stolsel zelf. Andere destijds gekende plasminogeenactivatoren zoals urokinase of streptokinase deden dat niet, terwijl de activator, die in zeer lage concentraties in ons bloed circuleert, dat wel deed. Tot onze grote vreugde bleek de activator uitgescheiden door de ‘Bowes’ melanomacellijn zeer sterk te binden aan de fibrineklonter. Het experiment was kinderlijk eenvoudig in zijn opzet, maar zou verstrekkende gevolgen hebben.

Levensreddende optie voor hartinfarct

Ik was er na dit experiment van overtuigd dat indien de plasminogeenactivator uit de Bowes-cel lijn kon gezuiverd worden en op grote schaal geproduceerd, we de groeiende golf van hartinfarcten te lijf konden gaan. Dat we eindelijk redding konden brengen voor de duizenden mensen die elk jaar met een infarct in het ziekenhuis terecht kwamen en waarvoor we toen weinig konden uitrichten. Afwachten en hopen dat de patiënt het zou overleven, was één optie. Een aspirientje geven, was de tweede. Mijn toenmalig diensthoofd, Marc Verstraete, werkte koortsachtig aan een derde optie: trombolyse. Die techniek is erop gericht om bij een acuut hartinfarct de bloedstolsels die de slagaders van het hart verstoppen op te lossen zodat de bloedstroom hersteld wordt en het hart opnieuw zuurstof en voedingsstoffen krijgt.

Al in 1969 publiceerde Verstraete resultaten van een klinische studie waarbij hij en drie andere Europese cardiologen streptokinase toedienden aan patiënten met een hartaanval.¹ In 1971 en 1979 zou onder zijn leiding de ‘*European Working*

¹ Amery A, Roeber G, Vermeulen HJ, Verstraete M. Single-blind randomised multicentre trial comparing heparin and streptokinase treatment in recent myocardial infarction. *Acta Med Scand Suppl.* 1969; 505: 1-35.

Party on Streptokinase' nog bijkomende studies publiceren in respectievelijk de *British Medical Journal*² en de *New England Journal of Medicine*³, twee zeer gereputeerde medische tijdschriften.

Het eenvoudige experiment met fibrinogeen en het cultuurmedium van de Bowes-cel lijn maakte mij echter duidelijk dat de plasminogeenactivator uit die cel lijn (die we vandaag weefselplasminogeenactivator of kortweg t-PA noemen, van 'tissue-type plasminogen activator'), de mogelijkheid had om een veel beter geneesmiddel te zijn dan streptokinase. Alleen moesten we dat nog bewijzen en de rest van de wereld zien te overtuigen (zie 't-PA-story').

Trombolytische therapie werd uiteindelijk over heel de wereld de routinebehandeling: meer dan een kwart miljoen mensen per jaar zouden ermee behandeld worden en dat gedurende een periode van bijna twintig jaar. Op een decennium tijd reduceerde het aantal mensen dat in het ziekenhuis overleed na opname met een acuut hartinfarct met meer dan de helft: van 25% in het midden van de jaren '70 tot 10% mede door de introductie van recombinant t-PA (rt-PA) door *Genentech*.⁴ Mijn enige frustratie is dat we nog veel meer mensen hadden kunnen redden indien t-PA voor iedereen beschikbaar was geweest. Ook voor mensen die niet het geluk hadden om in het rijke Westen te leven.

Toch zou het nog heel wat tijd, onderzoek, duizenden vlieg mijlen, zweet en bij sommigen zelfs tranen kosten, vooraleer t-PA volop beschikbaar zou zijn voor patiënten. Maar dat ene rudimentaire experiment in ons labo op de Campus Gasthuisberg van de K.U.Leuven heeft zonder meer de ontwikkeling van t-PA als geneesmiddel voor het oplossen van bloedklonters in gang gezet.

De tol van hart- en vaatziekten

Aandoeningen van het hart en de bloedvaten zijn in de Westerse wereld nog steeds een belangrijke oorzaak van overlijden, ziekte en invaliditeit. Ze zijn verantwoordelijk voor een kwart van de sterfgevallen bij mensen ouder dan 40 jaar. Drie grote categorieën zijn te onderscheiden: aandoeningen van de coronaire bloedvaten (de kransslagaders die het hart van bloed voorzien) door atherosclerotische degeneratie ofwel 'slagaderverkalking' wat op termijn kan leiden tot een hartinfarct (acuut myocardinfarct, AMI); aandoeningen van de bloedvaten in de hersenen (cerebrovasculair accident, CVA) waardoor beroerte kan ontstaan; en

² Streptokinase in recent myocardial infarction: a controlled multicentre trial. European working party. *Br Med J.* 1971; 3: 325-31.

³ Streptokinase in acute myocardial infarction. European Cooperative Study Group for Streptokinase Treatment in Acute Myocardial Infarction. *N Engl J Med.* 1979; 301: 797-802.

⁴ Delude C. Clot-Busters !! – Discovery of thrombolytic therapy for treating heart attack and stroke. *Breakthroughs in Bioscience, FASEB* 2004, 6.

veneuze trombose of de vorming van bloedklonters in de aders van de benen (diepe veneuze trombose, DVT) die via het hart naar de longen kunnen migreren en daar longembolie (pulmonaal embool, PE) veroorzaken.

Naar schatting 80 miljoen Amerikanen lijden aan een cardiovasculaire aandoening, jaarlijks worden 7 miljoen onder hen opgenomen in het ziekenhuis en elk jaar sterven een klein miljoen Amerikanen als gevolg van een cardiovasculaire aandoening. Bij 52% gaat het om een aandoening van de coronaire bloedvaten, bij 17% om een beroerte. Het geheel kost de Amerikaanse samenleving 475 miljard dollar per jaar.⁵ West-Europa moet hiervoor niet onderdoen: de corresponderende getallen zijn, gecorrigeerd voor de grootte van de bevolking, in de meeste West-Europese landen grotendeels gelijklopend en in Oost-Europa zelfs nog aanzienlijk hoger.

Plaques en stolsels

Vandaag weten we dat de directe aanleiding tot een hartinfarct of een beroerte in de overgrote meerderheid van de gevallen de vorming is van een bloedstolsel dat een vernauwd bloedvat afsluit. Die vernauwing is ontstaan door atherosclerose wat op zijn beurt het gevolg is van kleine beschadigingen in de gladde wand van het bloedvat. Het lichaam tracht deze beschadigingen te herstellen en tijdens dit herstelproces vormt zich een ophoping van witte bloedcellen en bloedplaatjes samen op de beschadigde plaats. Ook andere stoffen uit het bloed, bijvoorbeeld cholesterol, blijven hieraan kleven. Er ontstaat dan een brijachtige massa die weer met een laagje cellen wordt afgedekt met een vernauwing (atherosclerotische plaque) in het bloedvat tot gevolg. Door deze vernauwing kan de bloedtoevoer naar organen of lichaamsdelen op een bepaald ogenblik tekort schieten. Dit kan geleidelijk gaan, indien dit gebeurt in de hartslagaders krijgt men angina pectoris (AP), in de hersenen kan dit voorbijgaande ischemische aanvallen ('transient ischemic attacks', TIA) veroorzaken. Wanneer een slagader plotseling verstopt raakt door een bloedstolsel, krijgt het achterliggende weefsel geen bloed meer waardoor het kan afsterven. Als dat bij het hart het geval is, spreken we over een hartaanval of een acuut myocardinfarct (AMI), gebeurt dit in de hersenen, dan gaat het om een beroerte of een cerebrovasculair accident (CVA).⁶

⁵ Lloyd-Jones D et al. Heart disease and stroke statistics – 2009 update: A report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2009; 119: e21-e181.

⁶ Nederlandse hartstichting, <http://www.hartstichting.nl/go/default.asp?mID=5544>

‘Open-slagader’-hypothese

Begin 1979 was het debat over het mechanisme van hartinfarcten evenwel nog niet beslecht.⁷ De eerste elementen voor die discussie waren al een eeuw voordien aangebracht door de patholoog Ludwig Hektoen en de internist Sir William Osler. In een JAMA-editoriaal⁸ in 1899 schreef Hektoen dat “een hartinfarct in de meeste gevallen ontstaat door een trombose die secundair optreedt na sclerotische wijzigingen in de coronaire bloedvaten”. Osler was in 1892 nog specifiek⁹: “De blokkering van een bloedvat door een trombus of een embolus leidt tot een aandoening die we anemische necrose of een wit infarct noemen. Dit wordt vooral waargenomen in het linkerventrikel en het septum, de delen van het hart die door de voorste coronaire arterie worden bevoeid.”

Aan het begin van de 20^{ste} eeuw namen artsen aan dat een acuut hartinfarct steevast leidde tot de dood. Er werd dan ook weinig onderzoek gedaan, noch naar therapie, noch naar de klinische symptomen. Daardoor werden de mechanismen die leiden naar een hartinfarct niet goed in kaart gebracht. De Russische artsen Obratsov en Strazhesko brachten daar in 1910 verandering in door de klinische symptomen te beschrijven bij een patiënt die een hartinfarct doormaakte maar die het overleefde.¹⁰ In 1912 beschreef James Herrick tijdens een voordracht voor de *Association of American Physicians* de klassieke signalen en symptomen van een zogenaamde acute coronaire arteriële occlusie, de verstopping van een kransslagader. Alhoewel het werk van Herrick nu wordt erkend als een mijlpaal, werd zijn eerste voordracht slechts lauw onthaald door de collega’s. Een update van zijn onderzoek in 1918, opnieuw gepresenteerd voor hetzelfde genootschap, kreeg meer aandacht en zorgde ervoor dat de term ‘coronaire trombose’ synoniem werd met acuut hartinfarct. Belangrijk was dat Herrick er de nadruk op legde dat coronaire trombose niet altijd fataal hoefde te zijn. Hij schreef¹¹: “Ik sta versteld van de bewaring van lichaamskracht bij een aantal patiënten die getroffen worden door een hartinfarct. Sommigen onder hen wandelen al na enkele uren opnieuw rond. Na enkele dagen nemen ze hun gewone leven weer op. Net als voor zoveel andere aandoeningen moeten we het vooroordeel opgeven dat de diagnose van een hartinfarct alleen mogelijk is na een autopsie.”

⁷ Maroo A en Topol EJ. The early history and development of thrombolysis in acute myocardial infarction, *J Thromb Haemost* 2004; 2: 1867-70.

⁸ Hektoen L. Infarction of the heart, *JAMA* 1899; 33: 919.

⁹ Osler W. *The Principle and Practice of Medicine*. New York: D. Appleton, 1892.

¹⁰ Maroo A en Topol EJ. The early history and development of thrombolysis in acute myocardial infarction, *J Thromb Haemost* 2004; 2: 1867-70.

¹¹ Herrick JB. Clinical features of sudden obstruction of the coronary arteries. *JAMA* 1912; 59: 2015–20.

De bewustwording van de sterke associatie tussen coronaire trombose en hartinfarct, en de notie dat niet alle hartinfarcten dodelijk zijn, leidde tot een nieuw therapeutisch model: de ‘open-slagader’-hypothese. Volgens deze hypothese zou het herstellen van de bloedstroom naar de hartspier de overleving en de genezing van de hartpatiënt bevorderen.

Oorzaak of gevolg?

In de jaren ‘40 herzagen de meeste cardiologen echter hun mening. De controverse begon toen C.K. Friedberg en H. Horn in 1939 hun paper ‘*Acute myocardial infarction not due to coronary obstruction*’ publiceerden.¹² Op basis van autopsieën kwamen de auteurs tot de conclusie dat slechts 31% van de patiënten die overleden aan een infarct coronaire trombose vertoonden.

Door deze en andere studies kwam de ‘open-slagader’-hypothese op de helling en men vroeg zich af of coronaire trombose oorzaak dan wel gevolg was van een hartaanval. Een van de meest vooraanstaande protagonisten in deze controverse was William C. Roberts, hoofd van het *Cardiac Pathology Heart Institute* bij de *National Institutes of Health* (NIH). Roberts geloofde eerder dat coronaire trombose het gevolg was van myocardiale necrose, het afsterven van delen van de hartspier, en niet omgekeerd zoals de ‘open-slagader’-hypothese voorhield¹³: “Alhoewel het een belangrijke factor kan zijn bij het ontstaan van atherosclerose, speelt coronaire trombose slechts een kleinere rol – of zelfs helemaal geen – bij het uitlokken van een fatale coronaire gebeurtenis. Er is duidelijke evidentie dat myocardiale necrose eerst komt en coronaire trombose pas op de tweede plaats.”

De stelling van Roberts leidde ertoe dat de hypothese als zou een infarct veroorzaakt worden door oncontroleerbare spierspasmen, sterke opgang maakte. De ontwikkeling van trombolytische geneesmiddelen raakte er hopeloos mee in het slop.

Koppige volhouders

Toch waren er koppige hardhoofden die volop bleven inzetten op trombolytische therapie voor de behandeling van een hartinfarct. Een van hen was Sol Sherry. Hij was overtuigd dat het eiwit streptokinase, geproduceerd door de hemolytische streptokokbacterie, in staat was om ongewenste bloedstolsels op te

¹² Friedberg CK, Horn H. Acute myocardial infarction not due to coronary artery occlusion. JAMA 1939; 112: 1675–9.

¹³ Roberts WC, Ferrans VJ. The role of thrombosis in the etiology of atherosclerosis (a positive one) and in precipitating fatal ischemic heart disease (a negative one). Semin Thromb Hemost 1976; 2: 123–35.

lossen.¹⁴ Zonder precies te weten hoe streptokinase werkte, gebruikte Sherry in het tweede deel van de jaren '40 het geneesmiddel bij patiënten met hemothorax (bloeduitstorting in de borstholte) en empyeem (etterophoping in een borstholte).^{15 16 17} Sherry was evenwel vooral geïnteresseerd in streptokinase als mogelijk trombolytisch geneesmiddel. In 1957, nadat *Lederle Laboratories* een gezuiverde vorm van streptokinase kon aanleveren, stelden Sol Sherry, Tony Fletcher en Norma Alkjaersig een protocol op om bloedstolsels in menselijke coronaire bloedvaten op te lossen. Ze dienden eerst een 'opladende' dosis streptokinase toe, gevolgd door een continue infusie met lagere dosis. Het protocol leidde tot de eerste klinische studies op patiënten met een hartinfarct. Opmerkelijk suggereerden de auteurs toen al dat alleen vroegtijdige toediening van streptokinase (binnen de 14 uur na het begin van het infarct) resulteerde in een lagere mortaliteit. Bij patiënten die de behandeling later kregen, verbeterden de levenskansen nauwelijks.¹⁸ Deze observatie – hoe sneller behandeld, hoe effectiever de therapie – die voor het eerst in een gecontroleerde studie zou aangetoond worden door de Europese studiegroep rond Marc Verstraete (zie verder) zou een van de hoekstenen worden van de trombolytische therapie.

Weinig animo

Deze eerste (beperkte) successen vertaalden zich in de jaren 1960s en 1970s echter niet onmiddellijk in wijdverspreide routinematige toepassing in het ziekenhuis. De positieve klinische resultaten die de *European Working Party on Streptokinase* publiceerden^{19 20} bleken niet in staat om de meeste cardiologen te overtuigen. Temeer omdat andere studies gemengde resultaten opleverden. Als ook de belangrijkste bijwerking van streptokinase – het toegenomen risico op bloedingen waarvan een deel fataal kon zijn – mee in rekening werd gebracht, vroeg menig cardioloog zich openlijk af of trombolysie wel echt leidde tot een klinisch relevant voordeel voor de patiënt. Achteraf bekeken hielden de onderzoekers veel te weinig rekening met het tijdstip waarop ze de behandeling inzet-

¹⁴ Sherry S. The origin of thrombolytic therapy. *J Am Coll Cardiol* 1989 ; 14: 1085-92.

¹⁵ Tillet WS en Sherry S. The effect in patients of streptococcal fibrinolysin (streptokinase) and streptococcal desoxyribonuclease on fibrinous, purulent, and sanguinous pleural exudations, *J Clin Invest* 1949; 28: 173-90.

¹⁶ Sherry S, Tillet WS, Read CT. The use of streptokinase-streptodornase in the treatment of hemothorax. *J Thorac Surg* 1950; 20: 393-418.

¹⁷ Tillet W, Sherry S, Read C. The use of streptokinase-streptodornase in the treatment of chronic empyema. *J Thorac Surg* 1951; 21: 325-41.

¹⁸ Sherry S, Fletcher A, Alkjaersig N, Smyrniotis FE. An approach to intravascular fibrinolysis in man. *Trans Assoc Am Physicians* 1957; 70: 288-95.

¹⁹ European Working Party. Streptokinase in recent myocardial infarction: a controlled multicentre trial, *Br Med J* 1971; 3: 325-31.

²⁰ Streptokinase in acute myocardial infarction. European Cooperative Study Group for Streptokinase Treatment in Acute Myocardial Infarction. *N Engl J Med*. 1979; 301: 797-802.

ten. Burton Sobel zal later onderstrepen²¹: “We probeerden bloedklonters op te lossen bij mensen van wie de hartspier al dood was. We realiseerden ons onvoldoende hoe belangrijk vroege behandeling was om een klinisch positief resultaat te bekomen. In feite waren we allemaal wat van slag en dachten dat er iets fout was met de hypothese dat hartinfarcten werden veroorzaakt door bloedklonters. Ons gebrek aan inzicht leidde ertoe dat we geen wezenlijke vooruitgang boekten en dat het onderzoek naar trombolytische behandeling van een hartaanval opdroogde.”

Opnieuw schot in de zaak

Pas begin 1980 veert de interesse in trombolytische therapie terug op. Marcus DeWood en zijn collega's betrapten coronaire oclusies en bloedstolsels bij het plegen van het misdrijf zelf. DeWood publiceerde zijn onderzoek in het prestigieuze tijdschrift *The New England Journal of Medicine*.²² Met behulp van coronaire angiografie – een techniek waarbij via een katheter ingebracht in de lies en opgeschoven in de aorta contrastvloeistof in de coronaire bloedvaten wordt gebracht en Röntgenopnamen worden gemaakt – ziet hij hoe bij 110 van de 126 (87%) onderzochte patiënten met een hartinfarct totale verstopping van een kransslagader was opgetreden. Bij 59 patiënten werd de verstopping aantoonbaar veroorzaakt door een bloedprop. Bij 52 patiënten kon hij via de katheter de bloedprop zelfs verwijderen. Vandaag is dit een routinebehandeling geworden, in die tijd een opmerkelijk staaltje van interventionele behendigheid en durf.

Ook het reperfusieonderzoek van E.I. Chazov²³ en later van K. Peter Rentrop²⁴ gaven het trombolytische onderzoeksveld een nieuw elan: zij dienden streptokinase toe via de hartslagader tijdens een diagnostische angiografie bij patiënten met een hartinfarct. Hun onderzoek toonde aan dat heropening van coronaire bloedvaten kon bekomen worden in een acute setting en dat dit leidde tot een verbetering van de symptomen bij de patiënt en een herstel van de hartfunctie.

Artsen die vandaag worden opgeleid, zullen er zich wellicht over verbazen dat het concept van de coronaire verstopping een van de meest bediscussieerde hypothesen geweest is gedurende een flink deel van de 20^{ste} eeuw. Nu vinden we het normaal dat we bij een hartaanval de bloedtoevoer naar het hart zo snel mogelijk herstellen, hetzij via trombolytische geneesmiddelen die de bloedklonter

²¹ Delude C. Clot-Busters !! – Discovery of thrombolytic therapy for treating heart attack and stroke. Breakthroughs in Bioscience, FASEB 2004, 3.

²² DeWood MA et al. Prevalence of total coronary occlusion during the early hours of transmural myocardial infarction. N Engl J Med. 1980; 303: 897-902.

²³ Chazov EI et al., Intracoronary administration of fibrinolysin in acute myocardial infarct. Ter Arkh 1976; 48: 8-19.

²⁴ Rentrop KP et al. Acute myocardial infarction: intracoronary application of nitroglycerin and streptokinase. Clin Cardiol. 1979; 2: 354-63.

oplossen, hetzij via angioplastie, een ingreep waarbij het bloedvat mechanisch wordt opengesperd met een ballonnetje waarna een stent wordt geplaatst om het bloedvat open te houden. Door de bredere beschikbaarheid van cathlabs in ziekenhuizen in Vlaanderen wordt vandaag zelfs preferentieel voor de laatste techniek gekozen, tenminste wanneer de ingreep binnen de drie uur – liever nog binnen de 90 minuten – na het optreden van de eerste symptomen kan plaatsgrijpen.

Het was echter in de geschetste historische context dat we op het einde van de jaren 1970 ontdekten dat de Bowes-melanomacellijn het eiwit t-PA uitscheidde en dat we een bron voor een trombolytisch eiwit in handen hadden dat waarschijnlijk meer efficiënt zou zijn dan streptokinase voor het oplossen van bloedklonters en wellicht veel specifiek was waardoor het minder bloedingen elders in het lichaam zou veroorzaken. Een bijkomend voordeel is dat t-PA lichaamseigen is, zodat het in tegenstelling met streptokinase geen reactie van het immuunsysteem opwekt en er geen neutraliserende antilichamen gevormd worden.

Al die ‘vermoedens’ moesten natuurlijk nog worden hardgemaakt.

Deel I.

Wat voorafging

Dubbel opgeleid

Mijn verhaal als medicus, wetenschapper en ondernemer laat ik best beginnen in oktober 1961. Ik stapte toen, op de leeftijd van achttien jaar, de Katholieke Universiteit Leuven, de *alma mater*, binnen. Ik schreef me in voor het studieprogramma dat zou leiden tot de titel van dokter in genees-, heel- en verloskunde. Er stonden me zeven jaar studie te wachten. Deze keuze was zeker geen roeping, eerder een praktische overweging: dokter zijn was, in die tijd, nog een respectabel beroep. Mijn keuze werd beïnvloed door mijn vader. Als zoon van een ongeschoold arbeider had hij zelf nooit de kans gekregen om verder te studeren en was hij met zijn humanioradiploma het hoogst opgeleide lid van de vorige generatie in onze familie. In een familie waar, voor zover ik weet, niemand ooit een universitair diploma had gehaald, vervulde het vooruitzicht om een dokter in de familie te hebben, mijn ouders met grote fierheid. De optie om naar Leuven te gaan, lag voor de hand: het had een goede reputatie en ik kende de stad al omdat ik er tijdens mijn humaniora zeven jaar op kostschool was geweest. Bovendien duurde de treinrit van Leuven naar Sint-Truiden, het Limburgs stadje waar ik in 1943 geboren ben, slechts een klein uur.

Eerst braaf, dan minder braaf en ten slotte hard werkend

Over mijn eerste jaar in Leuven valt weinig te zeggen. Ik was een heel ‘brave’ student, ging naar alle lessen, practica en oefensessies en pendelde heen en terug tussen Sint-Truiden en Leuven. Ik slaagde in juli met onderscheiding. Het tweede jaar ging ik ‘op kot’ in Leuven en wijzigde ik mijn tactiek. Ik besepte dat ik tijdens het eerste jaar inspanningen had gedaan die eigenlijk niet echt nodig waren. Ik woonde alleen nog de verplichte practica en oefensessies bij en ik bracht meer tijd door in studentenclubs en cafés dan aan mijn studeertafel. De resultaten waren navenant: met de examenzittijd van juni/juli 1963 slaagde ik slechts met voldoening.

In mijn derde preklinische jaar voelde ik aan dat een universitaire opleiding uit meer zou moeten bestaan dan uit rondhangen en het minimum doen om te slagen. Ik keek op de Faculteit Geneeskunde rond of ik ergens aan de slag kon in een of ander onderzoeksproject en begon als student-onderzoeker in het Laboratorium Fysiologie van Prof. J.P. Bouckaert die het laatste jaar voor zijn emeritaat inging. Het volgende jaar eerder bij toeval dan door planning kwam ik terecht op het Laboratorium voor Bloedstolling onder leiding van Marc Verstraete. Verstraete blijkt zich die eerste ontmoeting nog duidelijk te herinneren²⁵: “We deden op dat ogenblik onderzoek met cumarinederivaten. Om de stollingstijden

²⁵ Verstraete M. An anthology of scientific collaborations compiled at the occasion of the 65th birthday of Désiré Collen. Leuven 2008: 119-21.

van bloed bij patiënten te kalibreren, hadden we bijna dagelijks bloed van gezonde proefpersonen nodig. Op het einde van een les ronselde ik vrijwilligers onder de studenten. Désiré werd door enkele vrienden uitgedaagd en het kwam tot een weddenschap. De volgende dag was Désiré present, liet zichzelf prikken, won de weddenschap en raakte geïnteresseerd in het onderzoek dat we deden.”

Ik had niet echt een specifieke voorliefde voor bloedstolling of cardiologie, maar ik raakte vooral geboeid door de figuur van Guido Tytgat, een jonge arts in specialisatieopleiding tot gastro-enteroloog. Guido onderzocht onder meer de snelheid waarmee het belangrijke bloedstollingseiwit fibrinogeen werd omgezet door de lever bij gezonde mensen en bij patiënten met levercirrose. Dat zou het onderzoeksonderwerp voor zijn aggregaatsthesis worden. Guido was een inspirerende figuur: hij was een workaholic, met een sterke persoonlijkheid en een brede kijk op geneeskunde. Naast het onderzoek voor zijn thesis bestudeerde hij de regulatie van de zuurtegraad in de maag, de diagnostische waarde van bipten van de dundarm, uitwisselingstransfusie bij acute leveratrofie, experimentele levercirrose bij de hond en nog veel meer. Ik was onder de indruk van zijn intelligentie, werkkraft en doorzettingsvermogen en door hem werd ik een adept van het biomedisch onderzoek. Voor mijn studies was het echter geen goede zaak. Ik had weliswaar de kroeg geruild voor het lab, maar van studeren kwam opnieuw weinig in huis. Ik moest me nog flink reppen om de examens te doorspartelen, maar dit keer had ik er op het eind wel een beter gevoel bij: ik had tenminste ook iets nuttigs gedaan in plaats van alleen basiscursussen van buiten blokken.

Eerste onderzoekservaring

Nadat hij de omzetting van fibrinogeen bij leverpatiënten en de bijdrage van bloedstolling en fibrinolytische degradatie in de bloedvaten had ontrafeld, wenste Guido Tytgat over te gaan tot het bestuderen van de omzetting van plasminogeen. Plasminogeen is een niet-actief eiwit, een zogenaamd ‘pro-enzyme’ dat in zijn actieve vorm, plasmine, in staat is om bloedstolsels op te lossen. Omdat noch Guido, noch ikzelf, enige praktische biochemische achtergrond hadden, riepen we de hulp in van René De Vreker, de biochemicus in het lab van Marc Verstraete. Hij zou voor ons plasminogeen afzonderen uit menselijk plasma.

René bracht ons al snel een eiwitoplossing die er op het eerste zicht homogeen uitzag en die na activering bloedstolsels oploste. Zowel Guido, René als ikzelf waren ervan overtuigd dat we ‘het echte ding’ in handen hadden. Na het eiwit gemerkt te hebben met radioactief jodium spoten we het bij onszelf in, vervolgens bij twee dozijn vrijwilligers en bij twee dozijn patiënten met levercirrose.

De eerste resultaten waren veelbelovend. Na negen dagen was de helft van de radioactiviteit verdwenen en we meenden er waardevolle experimentele resultaten uit te kunnen afleiden. Maar heel wat andere observaties stonden haaks op de

hypothese waarmee we werkten. Het werd ons geleidelijk duidelijk dat ‘het echte ding’ waarmee we werkten in feite een mengsel was van eiwitten, dat hooguit gecontamineerd was met plasminogeen. Guido Tytgat nam de zaak niet al te ernstig, hij liet het project vallen en was zich sowieso al aan het voorbereiden op zijn vertrek naar Seattle in de VS waar hij zijn opleiding tot gastro-enteroloog zou voortzetten. Guido zou later in Amsterdam terecht komen en een uitzonderlijke onderzoekscarrière als eerste professor in de gastro-enterologie in Nederland en als diensthoofd van de wereldbepaalde Dienst Gastro-enterologie van het Academisch Medisch Centrum uitbouwen.

Geneeskunde en chemie

Ik achtte het steeds onwaarschijnlijker dat ik ooit praktiserend huisarts of specialist zou worden. Ik zag veeleer een carrière als biomedisch onderzoeker zitten. Een eerste opstapje moest een thesis over het onderzoek op plasminogeen worden. Daarom stelden het vertrek van Guido en het uitblijven van onderzoeksresultaten mij enorm teleur. Mijn onderzoek zat hopeloos vast. Indien ik enig succes wilde boeken, moest ik mijn biochemische kennis grondig bijspijkeren.

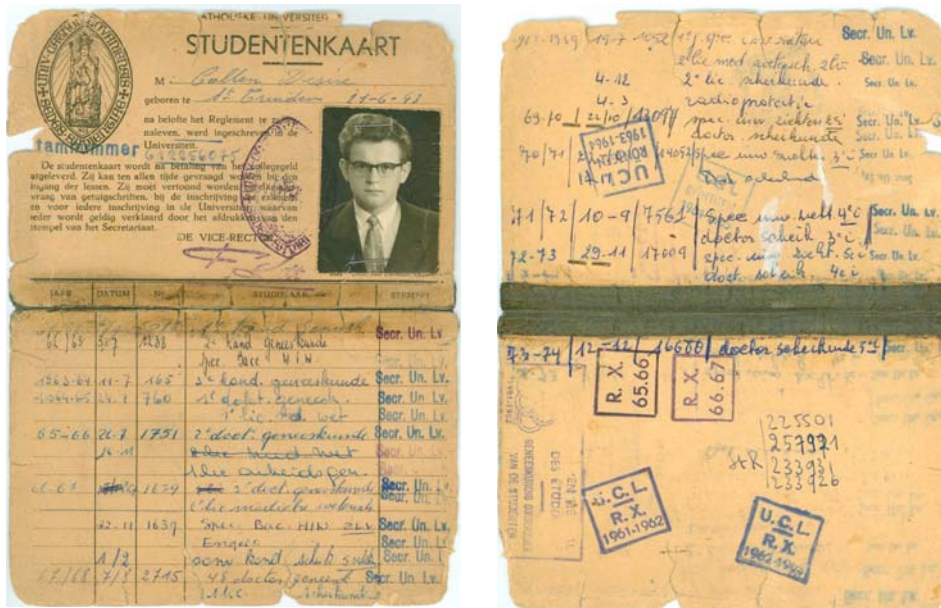
Waarom mijn opleiding in de Faculteit Geneeskunde niet combineren met een bijkomende opleiding in het Departement Chemie van de Faculteit Wetenschappen, vroeg ik mezelf af? Ik besprak deze denkpiste met Marc Verstraete en die vond dit een excellent idee. Mijn vrouw – we waren in de zomer van 1966 gehuwd – accepteerde onconditioneel dat we een paar jaar niet met vakantie konden gaan.

De mouwen moesten inderdaad worden opgestroopt: de Faculteit Wetenschappen was niet zo ‘happig’ op haar nieuwe student en deed weinig toegevingen. Ze gaf me wel de kans om in de septemberzitting van 1967 alle vakken van de kandidaturen chemie af te leggen waarvoor ik geen vrijstelling kon krijgen op basis van mijn reeds doorlopen opleiding geneeskunde. Ik nam de examenhorde van september 1967 met succes. Voor de laatste twee jaar van de opleiding, de licentiejaren chemie, kreeg ik echter geen privileges en moest ik alle vakken afleggen, inclusief alle verplichte practica doorheen het jaar. Alleen al dat laatste nam het grootste deel van de week in beslag.

1968 werd een verschrikkelijk hectisch jaar. De studentenrevoltes van 1968, zowel in Leuven als internationaal, zou ik nauwelijks actief meebeleven. Ik had vooral geneeskunde en chemie aan mijn hoofd. Doorheen het academiejaar werkte ik volledige dagen in het laboratorium voor de chemische practica, mijn eindexamen geneeskunde legde ik af in februari en juli (voor sommige vakken was ik zelfs nooit naar de les geweest), en voor de examens chemie had ik de tweede zitting van september.

Dubbel opgeleid

Intussen was ik expert geworden in het afleggen van examens en haalde het diploma van dokter in de geneeskunde in 1968, en van licentiaat in de medische wetenschappen én licentiaat in de wetenschappen, groep scheikunde in 1969, telkens met grote onderscheiding. Mijn studentenkaart van de K.U.Leuven is, met de bijkomende inschrijvingen voor specialisatieopleiding in Geneeskunde en doctoraat in Wetenschappen (Scheikunde) misschien wel een van de langste ooit in Leuven bij elkaar geharkt.



Studentenkaart van Désiré Collen van de K.U.Leuven.

Gebet en door onderzoek

In juli 1968, met mijn titel van geneesheer op zak en met de examens voor de eerste licentie chemie nog voor de boeg, werd ik onderzoeksassistent (eerst navorsingstagiair, dan aspirant en uiteindelijk aangesteld navorsers) bij het Nationaal Fonds voor Wetenschappelijk Onderzoek (NFWO) dat thans actief is onder de naam Fonds Wetenschappelijk Onderzoek Vlaanderen (FWO). Mijn werkplaats werd het laboratorium van Marc Verstraete. Ik moest opnieuw beroep doen op zijn inschikkelijkheid en steun opdat ik tegelijk met mijn mandaat een licentiaat-thesis in de chemie zou kunnen doen onder de supervisie van Professor Leo De Maeyer. Die laatste had slechts een deeltijdse opdracht aan de K.U.Leuven. Hij leidde het Laboratorium voor Fysische Chemie en verder had hij een benoeming aan het Max Planck Instituut in Göttingen (Duitsland). Leo De Maeyer ontwikkelde en bouwde instrumenten om de initiële snelheid ('transiënt kinetics') van specifieke chemische reacties in de eerste microseconden te bepalen. Later zou Manfred Eigen de Nobelprijs voor Chemie winnen onder meer dankzij de instrumenten van De Maeyer.

De Maeyer had hoegenaamd geen interesse in bloedstolling. Toch liet hij me een onderzoeksproject starten naar de polymerisatie van fibrine. De zuivering van fibrine en het chemische luik van het onderzoek kon ik uitvoeren in het lab van Marc Verstraete. Verder kon ik gebruik maken van de hydrostatische druktoestellen in het laboratorium van Prof. Putzeys, een biochemicus die aan het laatste jaar vóór zijn emeritaat toe was. Op het einde van het jaar hadden we fraaie resultaten. Ze waren zelfs zo interessant dat het tijdschrift *Nature* ze publiceerde.²⁶ Ik was zo fier als een haan want bij mijn weten is het zeer uitzonderlijk dat onderzoek voor een licentiaatsthesis tot een publicatie in *Nature* leidt. Dat deze publicatie echter tot een kleine niche in het hogedruk biochemisch onderzoek behoorde en slechts een twintigtal citaten zou opleveren, kon ik toen niet inschatten. In ieder geval voelde ik mij gelanceerd als wetenschappelijk onderzoeker.

²⁶ Collen D, Vandereycken G, De Maeyer L. Influence of hydrostatic pressure on the reversible polymerization of fibrin monomers. *Nature*. 1970; 228: 669-71.

INFLUENCE OF HYDROSTATIC PRESSURE ON THE REVERSIBLE POLYMERIZATION OF FIBRIN MONOMERS

*(Reprinted from Nature, Vol. 228, No. 5272, pp. 669-671,
November 14, 1970)*

By
D. COLLEN, G. VANDEREYCKEN
and
L. De MAEYER

Klinische opleiding in mineur door revalidatie en reoriëntatie

Het doel van een NFWO-onderzoeksassistentschap in een klinische discipline is onderzoek te combineren met een formele training tot een medische specialiteit. In mijn geval was dat interne geneeskunde. Een onderzoekscarrière losgekoppeld van enige klinische verantwoordelijkheid, zoals ik dat voor ogen had, was in die tijd hoogst ongebruikelijk voor een geneesheer van opleiding. Het normale vijf jaar durende programma liet toe om slechts één jaar voltijds met onderzoek bezig te zijn, de andere vier jaren werd je geacht klinische ervaring op te doen. De meeste studenten plannen dat onderzoeksjaar ergens aan het einde of ten vroegste in het midden van hun opleiding. In mijn geval was het onderzoeksluik al opgevuld na het eerste jaar en startte ik in juli 1969 met mijn klinische rotatie in interne geneeskunde in het UZ St. Rafaël in Leuven.

Drie maanden later sloeg echter het noodlot toe. Een slecht opgezet experiment was de oorzaak. We zochten naar een methode om patiënten met ernstige aandoeningen van de bloedstolling te behandelen. In die tijd woedde er een debat over het mogelijke nut van orgaantransplantatie als behandeling voor patiënten met hemofilie A. Dit is een genetische stollingsziekte waarbij het bloed veel moeizamer stolt en de patiënt (meestal gaat het om jongetjes) een risico loopt op overlijden aan inwendige bloedingen of ernstige gewrichtsmisvormingen door bloeduitstortingen. De patiënten met deze stollingsziekte missen een bepaald eiwit, factor VIII, dat cruciaal is voor het stollingsmechanisme. Wij wilden nagaan of milttransplantatie een mogelijke oplossing zou bieden. Marc Verstraete had een eenvoudig experiment bedacht om het 'proof of concept' van die therapie te leveren: we zouden bloed van een patiënt met zeer ernstige hemofilie (min-

der dan 1 percent Factor VIII) langs de miltarterie doorheen een geïsoleerde milt van een overleden patiënt sturen en nagaan of het bloed opgevangen aan de veneuze kant factor VIII activiteit bevatte.

Het hele experiment draaide uit op een gigantisch fiasco. In de eerste plaats bleek de milt afkomstig van een patiënt met ernstige splenomegalie of miltzwellling. De vaten van die milt werden als het ware toegeknepen door de zwelling. Zelfs met ‘brute force’ was daar geen bloed door te pompen. Bovendien was de hemofiliepatiënt, waarvan het bloed werd afgetapt, opgenomen vanwege een agressieve chronische hepatitis. Het experiment mislukte grandioos en mondde uit in een fikse hepatitis B-infectie (serum-hepatitis) voor drie van de experimenteerders. Ik bleef zes weken in bed met een onbeschrijfelijke vermoeidheid. Ik kon zelfs geen boek lezen en de infectie werd bijna mijn dood. Dit experimenteel ongeluk gebeurde in de periode dat het hepatitis B-virus als oorzaak van serumhepatitis aangetoond werd en dat ‘Australisch antigeen’ als diagnostische biomarker ontwikkeld werd. De patiënt die zijn bloed leverde voor ons miltexperiment bleek achteraf een torenhoge hoeveelheid circulerend hepatitis B-virus te bevatten waardoor het zelfs een aantal jaren als referentie gebruikt werd voor de ontwikkeling van hepatitis B-analyses in het Rega Instituut.

Een nadeel heeft echter soms ook zijn voordeel. Ik moest 6 maanden in revalidatie en mocht geen ziekenzaal betreden. Noodgedwongen – maar onverhoopt – moest ik mijn actieradius beperken tot het laboratorium.

Rond maart 1970, hersteld van de hepatitis B-infectie en met een hoge titer aan circulerende antistoffen tegen het virus, die wezen op volledige genezing, nam ik mijn klinische opleiding terug op met driemaandelijke rotaties op de afdelingen cardiologie (Prof. J.W. Joossens), endocrinologie (Prof. P. De Moor), hepatologie (Prof. J. De Groot), bloedings- en vaatziekten (Prof. M. Verstraete), infectieziekten (Prof. L. Eyckmans) en de raadpleging inwendige geneeskunde (Prof. A. Amery). Achteraf bekeken was dit toch een zeer leerrijke ervaring. Hoewel ik uiteindelijk geen internist geworden ben, heb ik toch heel wat bagage opgedaan die nuttig bleek voor een brugfunctie in een multidisciplinaire onderzoeksomgeving met geneesheren enerzijds en doctors in de wetenschappen anderzijds. Ik heb dan ook geen minuut spijt van deze periode. Terug op volle kracht combineerde ik deze rotaties met werk aan mijn doctoraatsthesis chemie en mijn aggregaatsthesis in geneeskunde. Ik zorgde dat al mijn klinische dossiers in orde waren en dat de patiënten en mijn supervisors kregen wat er van mij verwacht werd, zodat ik deze achttien maanden zonder noemenswaardige klacht of berisping doorkwam. Hoewel ik toen klinisch routinewerk met onderzoek voor twee thesissen kon combineren, bleef er geen tijd voor klinische specialisatie door het bijwonen van seminars, gevallenbespreking, klinische literatuur. Het werd stil aan duidelijk dat ik op die manier geen bekwame klinische internist zou worden.

New York

In september 1971, na een totaal van achttien maanden klinische opleiding, vertrok ik samen met mijn vrouw en twee kinderen naar New York om gedurende één jaar voor Alan Johnson te werken als ‘aspirant’ van het Belgisch NFWO. Marc Verstraete had dit voor mij geregeld. Johnson en Verstraete kenden elkaar van het onderzoek op streptokinase. Johnson had een aantal biochemische tests op punt gezet en was ook betrokken bij experimentele trombolysen in proefdieren en bij patiënten. Johnson was een ‘geschikte vent’, hij was aimabel in de omgang, aardig en beschaafd, maar zijn laboratorium was een puinhoop. Grotendeels als gevolg van een gebrek aan continuïteit wat betreft personeel en onderzoeksprojecten.

Ik was ervan uitgegaan dat mijn beurs van het NFWO – welgeteld \$260 per maand – minstens voor een deel kon voorzien in ons levensonderhoud in New York. Met enige paniek stelden we vast dat alleen de huur van het appartement in Manhattan, niet te ver van het lab maar wel met slechts één slaapkamer, al \$259 per maand kostte.

Toen Alan me na de eerste paar dagen vertelde dat ik \$12 000 per jaar zou verdienen als onderzoeksassistent (research assistant) via de fondsen die hij had van de *National Institutes of Health* (NIH), was ik aangenaam verrast en vooral opgelucht. Twee dagen later nog meer, toen hij mijn curriculum had doorgenomen en er was achtergekomen dat ik ook een ‘master’ in chemie had. Daardoor promoveerde ik tot geassocieerd wetenschapper (associate research scientist) met een salaris van \$16 000 per jaar. De champagnekurken vlogen helemaal in het rond toen ik zes weken later bericht kreeg vanuit België dat ik van IBM een bijkomende onderzoeksbeurs kreeg van \$8 000 die combineerbaar was met andere toelagen. Financieel zaten we dus op rozen en mijn vrouw spendeerde een fantastisch jaar in New York met de twee kinderen.

Professioneel was New York echter een tegenvaller. Mijn directe supervisor in het lab was een Chinees-Amerikaanse Ph.D. met weinig creatief denkvermogen en nog minder doorzetting. Voor mij betekende hij eerder een last dan een hulp. De output van één jaar New York was bijzonder mager: 60 tot 80 uur werken per week leverde slechts één paper op over de omzetting van een afgebroken vorm van plasminogeen. Het artikel zou pas twee jaar later verschijnen in een tijdschrift dat niet eens van eerste rang was.²⁷ Johnson was wel zo hoffelijk om toe te laten dat ik alle resultaten uit New York mocht gebruiken voor mijn doctoraatsthesis in Leuven.

²⁷ Collen D, Ong EB, Johnson AJ. Human plasminogen: in vitro and in vivo evidence for the biological integrity of NH₂-terminal glutamic acid plasminogen. *Thromb Res.* 1975; 7: 515-29.

Als afsluiting van mijn New York-ervaring toch nog een persoonlijke anekdote. Getrouwd als student in juli 1966 werd ons gezin tot bij mijn vertrek naar New York onderhouden door een ‘subsidie’ van mijn vader tot ik afstudeerde als geneesheer in 1968 en nadien door mijn beurs van het NFWO. Bovendien werkte mijn echtgenote aan de boekhouding in het bedrijfje van haar vader tot in 1971.

Op het ogenblik van ons vertrek naar NY was ons ‘gezinsfortuin’ aangegroeid tot ongeveer 185 000 BEF die ik omzette in American Travellers Checks voor een waarde van \$3 700 (ongeveer 50 BEF per \$). Naar het einde van 1971 daalde de waarde van de dollar, doordat de Amerikanen de goudstandaard loslieten, tot 40 BEF per \$. Ik had toen nog ongeveer \$3 000 aan American Traveller Checks en verloor daarop dus 20 percent. Een jaar later, toen ik nog ongeveer \$1 500 overhad, was de dollar gedaald tot 30 BEF per \$ en verloor ik hierop weer meer dan 20 percent. Het werd duidelijk dat ik toen het vak van belegger nog helemaal niet onder de knie had.

Stockholm

Mijn verblijf in Stockholm (Zweden) in 1972-1973 in het laboratorium van Birger Blombäck aan het vermaarde *Karolinska Institutet* was in vele opzichten het tegenovergestelde van mijn oponthoud in New York. Ik mocht van Birger naar Stockholm komen op voorwaarde dat ik voor eigen financiering kon zorgen. Uiteindelijk lukte dat, na enkele omwegen, via een Navo-reisbeurs bovenop mijn NFWO-mandaat als aspirant. Het onderzoek in Stockholm - het bepalen van de eiwitsamenstelling van geïsoleerde fragmenten van het eiwit fibrinogeen - was een wonderbaarlijke ervaring. Ze leidde tot twee mooie publicaties die in belangrijke mate bijdroegen tot de opheldering van de eiwitstructuur van fibrinogeen²⁸ ²⁹ en ik leerde er de fijne knepen van de eiwitchemie.

Ik ontdekte er ook de schaduwzijde van een carrière als diensthoofd van een academisch laboratorium, een rol die ik stilaan voor mezelf ook zag weggelegd: Birger moest voortdurend afrekenen met een poespas aan administratie, gevechten leveren met de bureaucraten van de universiteit en leveranciers afhouden van wie de rekeningen onbetaald bleven. Daarnaast leefde hij op een hectisch reis-schema tussen Stockholm en New York waar hij ook een laboratorium in het *New York Blood Center* leidde. Toch was deze excentrieke baas, als hij al aanwezig was, bijzonder inspirerend. Het meest heb ik van hem geleerd tijdens onze bijna dagelijkse avondbezoeken (samen met zijn vier post-doc's en doctoraats-

²⁸ Kudryk BJ, Collen D, Woods KR, Blombäck B. Evidence for localization of polymerization sites in fibrinogen. *J Biol Chem.* 1974; 249: 3322-5.

²⁹ Collen D, Kudryk B, Hessel B, Blombäck B. Primary structure of human fibrinogen and fibrin. Isolation and partial characterization of chains of fragment D. *J Biol Chem.* 1975; 250: 5808-17.

studenten) aan het café waar wij tijdens het drinken van een paar ‘mellanöls’ (ietwat beter dan alcoholvrij maar toch bijlange geen Stella Artois) ons konden laven aan zijn wetenschappelijke en filosofische escapades. Gelukkig voor mijn gezinsleven, maar toch ietwat spijtig voor mijn kijk op de wereld, was hij maar goed één derde van de tijd in Stockholm en werd steevast om elf uur ’s avonds een houten plaat met ‘Stängt’ (gesloten) op de tapkast geplaatst.

Mijn vrouw was minder opgetogen over ons verblijf in Stockholm. Zij zat opgescheept met (inmiddels) drie kleuters in Solna, een buitenwijk van Stockholm waar tijdens de dag niets viel te beleven omdat iedereen was gaan werken. Voor haar was de terugkeer naar Leuven een zegen.

Terug in Leuven

In september 1973 kwamen we terug naar Leuven. Om mijn specialisatie interne geneeskunde af te maken, zou ik nog één jaar kliniek moeten doen als laatstejaars assistent. Niet echt een vooruitzicht waar ik blij van werd. Ik had immers weinig klinische ziekenhuiservaring op mijn teller staan. Mijn verblijven in New York en Stockholm telden elk voor een jaar specialisatie - hoewel ik er geen enkele patiënt van dichtbij of ver had gezien – en ook in de periode voordien had ik een aantal maanden klinische praktijk gemist als gevolg van mijn hepatitis B-affaire. Bovendien had ik door mijn voorkeur voor onderzoek mijn specialisatieopleiding tot internist niet altijd als mijn grootste prioriteit gezien. In plaats van de gebruikelijke vier jaar ervaring voor een ‘senior resident’, had ik ongeveer anderhalf jaar ervaring die echter dateerde van drie jaar voordien. Bijna iedereen rondom mij zou meer ondervinding hebben dan ikzelf. Hoewel ik tijdens mijn beperkte klinische opleiding steeds mijn opdrachten en verantwoordelijkheden correct en tot voldoening van de supervisors had uitgevoerd, voelde ik mij toch niet geroepen om de functie van ‘senior resident’ op te nemen. Hoe moest ik hier een mouw aanpassen?

De oplossing kwam er door het getuigschrift voor een specialisatie in de klinische chemie aan te vragen op basis van mijn dubbele opleiding, geneeskunde en chemie. Ik ruilde met andere woorden mijn specialisatie interne geneeskunde voor een specialisatie klinische chemie. Daardoor kon ik aan de slag als klinisch bioloog in het Laboratorium voor Bloedings- en Vaatziekten van de Academische Ziekenhuizen van de Universiteit Leuven, een functie waar ik wel kaas van gegeten had.

Toch was ook dat getuigschrift een dubbeltje op zijn kant: ik had geen enkele formele opleiding in microbiologie of klinische chemie. Vandaag zouden dergelijke toeren niet meer kunnen. Gelukkig maar. Inderdaad, toen ik in de zomer van 1980 een vervanging deed van de klinisch bioloog in een routine klinisch laboratorium in Brussel bleek al snel dat ik voor dergelijke taak onvoldoende

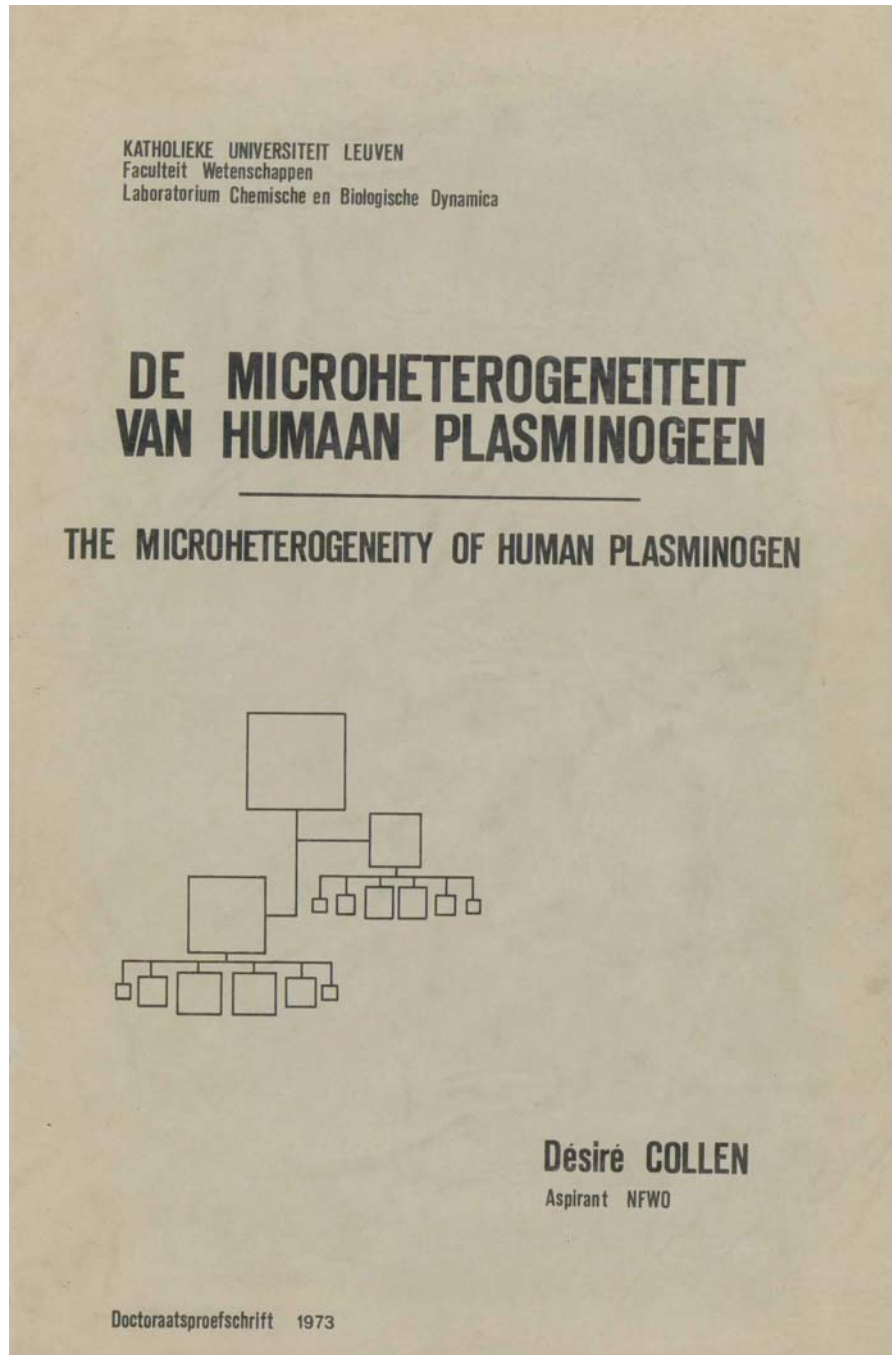
opgeleid was. Een ontnuchterende vaststelling was het: met het equivalent van meer dan twintig jaar universitaire opleiding (zeven jaar geneeskunde, vijf jaar specialisatie, zeven jaar wetenschappen (chemie) en twee jaar licentie medische wetenschappen), was ik in feite onvoldoende geschoold om enige praktische vorm van geneeskunde buiten de universiteit te beoefenen.

Afgerond

Ik kon me na mijn terugkeer uit Stockholm verder concentreren op mijn doctoraatsthesis chemie, die handelde over de microheterogeniteit van menselijk plasminogeen, en mijn doctoraatsthesis geneeskunde over de omzetting ('turnover') van plasminogeen en protrombine bij de mens. Ik verdedigde de eerste thesis in januari 1974, de tweede in juli 1974. Alhoewel mijn chemische thesis niet veel nieuwe elementen bevatte, liet ze me toe om een aantal biochemische technieken en procedures in het Laboratorium voor Bloedstolling te introduceren die later cruciaal zouden blijken. Mijn thesis geneeskunde legde dan weer de basis voor de ontdekking van α_2 -antiplasmine en het onderzoek dat leidde naar t-PA.

Na een additioneel uitstel van vijftien maanden omwille van mijn legerdienst (van september 1974 tot november 1975) en een tijdelijke benoeming aan de universiteit als Buitengewoon Docent, werd ik uiteindelijk op 1 oktober 1976 benoemd tot Docent aan de Faculteit Geneeskunde en Adjunct Kliniekhoofd op de Afdeling Bloedings- en Vaatziekten bij de Dienst voor Interne Geneeskunde. Dat is precies vijftien jaar nadat ik voor het eerst een auditorium van de K.U.Leuven betrad. Mijn opleiding was nu wel achter de rug en het werd hoog tijd om een academische carrière uit te bouwen.

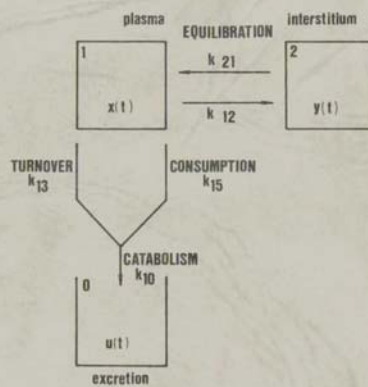
Gebeten door onderzoek



Doctoraatsthesis chemie (links) verdedigd in januari 1974 en doctoraatsthesis geneeskunde (rechts) verdedigd in juli 1974.

UNIVERSITY OF LEUVEN, BELGIUM
FACULTY OF MEDICINE
DEPARTMENT OF MEDICAL RESEARCH
LABORATORY OF BLOOD COAGULATION

PLASMINOGEN AND PROTHROMBIN METABOLISM IN MAN



Désiré COLLEN
Aangesteld navorser N.F.W.O.

THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
"GEAGGREGEERDE VAN HET HOGER ONDERWIJS"

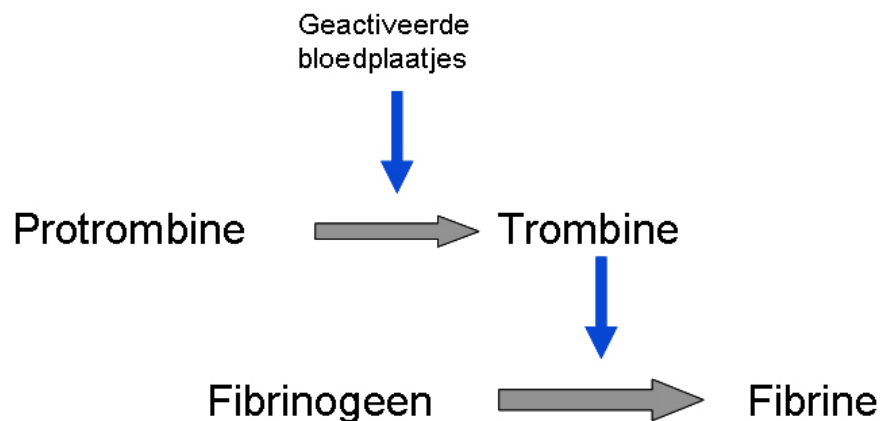
1974
acco
LEUVEN

Fibrinolyse moleculair ontrafeld

Het bloedstollingssysteem is een mooi voorbeeld hoe ons lichaam een delicate balans moet zoeken tussen tegengestelde acties. Enerzijds moet bloed stollen van zodra een weefsel of een bloedvat ernstig beschadigd raakt - anders zouden we bij de minste verwonding doodbloeden. Anderzijds moeten bloedstolsels ook worden afgebroken (fibrinolyse) en opgeruimd om plaats te maken voor nieuwe weefsels. Voor beide richtingen, stolling en fibrinolyse, heeft het lichaam een moleculair systeem uitgewerkt dat vol met controles en evenwichten zit. Raken die evenwichten uit balans, dan is ziekte het gevolg.

Leven en dood van een bloedklonter

De belangrijkste spelers in de bloedstolling zijn bloedplaatjes en de eiwitten trombine en fibrine. Als een bloedvat beschadigd raakt, zullen bloedplaatjes zich ophopen op de plaats van beschadiging en een tijdelijke prop vormen. Tegelijk zenden de bloedplaatjes signaalstoffen uit waardoor het niet-actieve eiwit protrombine wordt omgezet in trombine. Trombine zet op zijn beurt het eiwit fibrinogeen om in fibrine. Deze fibrine-eiwitten klonteren ter plaatse samen tot een fijnmazig netwerk opgebouwd uit lange touwachtige slierten die het beschadigde bloedvat volledig afsluiten. Dat mengsel van bloedplaatjes en taai fibrinevezels zijn de hoofdbestanddelen van een bloedstolsel.



De feiten zoals ze hier zijn weergegeven, zijn slechts een sterk vereenvoudigde voorstelling van de werkelijkheid. In realiteit zijn er meer dan een dozijn verschillende eiwitten betrokken bij de regulatie van die bloedstolling waarbij het ene eiwit het andere activeert of onderdrukt. De eerste spelers in dit complexe net-

werk werden al op het einde van de 19^{de} eeuw beschreven, onder meer door Rudolf Virchow, de meeste andere eiwitten waren voor 1970 gekend.³⁰

Een variant van de ‘normale’ bloedstolling is de trombose (zie hoofdstuk ‘t-PA en trombolyse, de context van een levensverhaal’). Hierbij zijn essentieel dezelfde moleculaire spelers aan het werk: bloedplaatjes, trombine en fibrinogeen, maar deze keer reageren ze niet op een trauma maar op een atherosclerotische plaque in een slagader of op hyperstolbaarheid (trombofilie) bij veneuze trombose. Enigszins kort door de bocht zouden we kunnen stellen dat een trombose een ongewenst nevenproduct is van de levensnoodzakelijke bloedstolling.

Oplossend trio: plasminogeenactivator, plasminogeen en fibrine

Dat bloed van zoogdieren een eiwitsysteem bevat om bloedklonters op te lossen, wordt voor het eerst in de 18^{de} en 19^{de} eeuw beschreven. De betrokken eiwitspelers worden grotendeels tussen 1930 en 1950 geïdentificeerd.³¹ Bij deze zoektocht speelt het eiwit streptokinase, afkomstig van de streptokokbacterie, een belangrijke rol.

Al in 1933 wordt ontdekt dat sommige stammen van streptokokken in staat zijn om bloedklonters op te lossen.³² Het lijkt een eigenaardige gril van de natuur dat bacteriën menselijke bloedklonters kunnen oplossen, maar bij nader toezien is het een aanpassing van de bacterie tegen onze afweer. Bij lokale bacteriële infecties reageert ons lichaam immers door rond de infectiehaard het bloed te laten stollen. Daardoor wordt de aan- en afvoer afgesloten, zitten de bacteriën lokaal opgesloten en kunnen ze niet uitbreken naar andere weefsels. Hemolytische streptokokken hebben als remedie het eiwit streptokinase ontwikkeld: het eiwit activeert ons eigen fibrinolytisch systeem zodat het afsluitend netwerk van bloedstolsels wordt opgelost en de bacterie vrije doorgang krijgt.

Streptokinase was een handig hulpmiddel voor onderzoekers uit het midden van de 20^{ste} eeuw om de andere eiwitten betrokken bij fibrinolyse te identificeren. De onderzoekers moesten gewoon nagaan met welke eiwitten streptokinase reageert. Op die manier wordt in 1944 en 1945 plasminogeen en zijn actief dochtereiwit plasmine ontdekt.^{33 34 35}

³⁰ Collen D. On the regulation and control of fibrinolysis. Edward Kowalski Memorial Lecture. *Thromb Haemost.* 1980; 43: 77-89. Review.

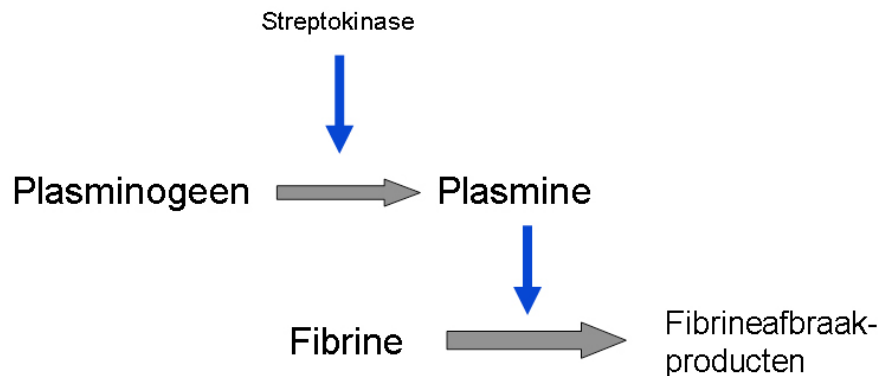
³¹ Collen D. On the regulation and control of fibrinolysis. Edward Kowalski Memorial Lecture. *Thromb Haemost.* 1980; 43: 77-89. Review.

³² Tillett WS, Garner RL. Fibrinolytic activity of haemolytic streptococci. *J Exper Med.* 1933; 58: 485-502.

³³ Milstone H. Factor in normal blood which participates in streptococcal fibrinolysis. *J Immunol.* 1941; 42: 109-16.

³⁴ Kaplan MH., Nature and role of the lytic factor in haemolytic streptococcal fibrinolysis. *Proc Soc Exper Biol Med.* 1944; 57: 40-3.

Plasmine is het eiwit dat fibrinevezels afbreekt. Zelf ontstaat plasmine uit plasminogeen, een voorlopereiwit dat net als fibrinogeen vrij in het bloedplasma voorkomt. De omzetting van plasminogeen tot plasmine gebeurt door streptokinase via proteolytische klieving: streptokinase gebonden aan plasminogeen knipt gewoon een stuk van andere plasminogeenmoleculen die daardoor geactiveerd worden.



In 1947 maken Tage Astrup en Per Permin voor het eerst gewag van een eiwit aanwezig in dierlijke weefsels met eigenschappen die leken op die van streptokinase.³⁶ Het zal nog vijf jaar duren voor Astrup het eiwit isoleert³⁷, zij het nooit in heel zuivere vorm. Aanvankelijk krijgt het de naam fibrinokinase mee, later zal dat wijzigen naar weefselplasminogeenactivator.

In 1947 wordt vastgesteld dat urine ook stoffen bevat die bloedklonters kunnen oplossen.³⁸ Het blijkt hier te gaan om een andere plasminogeenactivator, met name het eiwit urokinase.³⁹ Tot slot wordt er in de jaren 1950 en 1960 naast de exogene activering (via urokinase of streptokinase) of de extrinsieke activering (via plasminogeenactivator) nog een derde activeringsroute gevonden: de intrinsieke reactieketen. Hierbij is contact van plasminogeen met een reeks eiwitten – o.a. Hagemanfactor, kininogeen, prekallikreïne en andere – belangrijk. Een gedetailleerd overzicht van deze reactieketen zou ons echter te ver leiden.

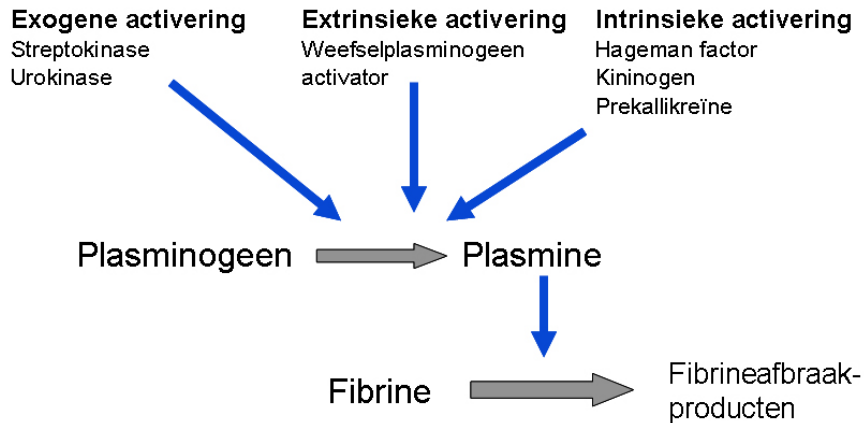
³⁵ Christensen LR, Macleod CM. Proteolytic enzyme of serum: characterization, activation, and reaction with inhibitors. *J Gen Physiol.* 1945; 28: 559-83.

³⁶ Astrup T, Permin PM. Fibrinolysis in the animal organism. *Nature.* 1947; 159: 681-682.

³⁷ Astrup T, Stage A. Isolation of a soluble fibrinolytic activator from animal tissue. *Nature.* 1952; 170: 929.

³⁸ Macfarlane RG, Pilling J. Fibrinolytic activity of normal urine. *Nature.* 1947; 159: 779.

³⁹ Williams JRB. The fibrinolytic activity of urine. *Brit J Exper Pathol.* 1951; 32: 530-37.



Een onbekende remmer

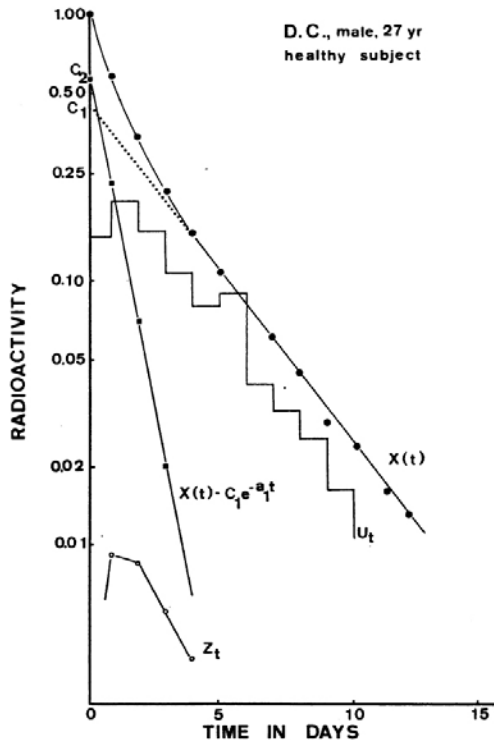
Toen ik startte met mijn onderzoek naar fibrinolyse was er al vrij veel gekend over de activering van plasmine. Over het neutraliseren van plasmine en de klaring (turnover) van plasminogeen was echter veel minder geweten. Het is duidelijk dat plasmine niet in zijn actieve vorm kan blijven. In dat geval zou elk bloedstolsel in het lichaam te snel worden afgebroken. Ik richtte me dus in een eerste fase op het onderzoek naar de klaring van plasminogeen en de bijdrage van omzetting naar plasmine hierop.

In een eerste experiment uit 1970, gepubliceerd in 1972, gingen we na wat de snelheid was waarmee ons lichaam plasminogeen en plasmine verwerkte.⁴⁰ Homogeen plasminogeen - opgezuiverd in samenwerking met Bjorn Wiman - werd gemerkt met radioactief jodium en ingespoten bij vrijwilligers. Vervolgens werd nagegaan hoe snel de radioactiviteit - en dus ook het plasminogeen - verdween uit het plasma en als afbraakproduct in de urine terecht kwam.

Bij een 'gezonde' mannelijke vrijwilliger van 27 met initialen 'D.C.' bleek de helft van de radioactiviteit na 2,5 dagen uit het bloed te zijn verdwenen. In die tijd waren onderzoekers nog heel vaak hun eigen proefkonijnen. Vandaag zou een dergelijk experiment eerst door een multidisciplinaire ethische commissie

⁴⁰ Collen D, Tytgat G, Claeys H, Verstraete M, Wallén P. Metabolism of plasminogen in healthy subjects: effect of tranexamic acid. *J Clin Invest.* 1972; 51: 1310-8.

moeten goedgekeurd worden.



Metabolisme van plasminogeen in een controlepersoon ('D.C.'): $x(t)$ = radioactiviteit in plasma; u_t = fractionele dagelijkse excretie van de radioactieve merker via de urine; z_t = radioactiviteit in plasma die niet precipiteerbaar is met trichloorazijnzuur (Uit Collen D., Tytgat G., Claeys H., Verstraete M., Wallén P. Metabolism of plasminogen in healthy subjects: effect of tranexamic acid. J Clin Invest. 1972; 51: 1310-8).

Soms gingen we wel wat ver in dat geëxperimenteer op ons eigen lichaam. Op het ogenblik dat ik in New York bij Alan Johnson aankwam, moest ik een medische keuring ondergaan. Toen de arts mijn armen zag, fronste hij de wenkbrauwen en werden er allerhande suggestieve vragen op me afgevuurd. De arts dacht zonder meer dat ik een junkie (geweest) was. Het heeft me flink wat tijd gekost om uit te leggen waar al die priksporen vandaan kwamen.

Het waren echter dat soort experimenten die ons toelieten om een beter inzicht te krijgen in de functie en de werking van de eiwitten betrokken bij de bloedstolling en fibrinolyse. Vandaag bestaan er voor degelijke experimenten gecomputeriseerde rekenmodellen, celculturen, specifieke proefdiermodellen – al of niet transgeen of knock-out – van wormen over vliegen en zebravissen tot muizen. Vroeger hadden we vooral ons eigen lichaam.

Ontdekking van α_2 -antiplasmin

Toen ik samen met Jos Vermylen van de K.U.Leuven de turnover van gemerkt plasminogeen bepaalde bij trombosepatiënten die behandeld werden met streptokinase, stonden we aanvankelijk voor een raadsel⁴¹: enerzijds zette streptokinase vrij rondcircelend plasminogeen snel om tot plasmin, maar dat werd dan op zijn beurt zeer snel geneutraliseerd. Anderzijds verdween de radioactiviteit slechts langzaam (met een halfwaardetijd van ongeveer 12 uur) uit het bloed. Daaruit leidden we af dat plasmin werd geïnactiveerd door een ander eiwit, dat zich vastzette op plasmin om het te neutraliseren, eerder dan door plasmin te klaren uit het bloed. Dat laatste was duidelijk een langzamer proces.

Het kwam er dus op aan om het complex van plasmin en de onbekende inhibitor af te zonderen. In feite ging iedereen in het onderzoeksveld ervan uit dat het inhiberende eiwit α_1 -antitrypsine of α_2 -macroglobuline moest zijn, want men vermoedde sterk dat die eiwitten betrokken waren bij de neutralisatie van plasmin. We slaagden er inderdaad in om uit bloed een eiwitcomplex af te zonderen dat, alleszins wat betreft de grootte, compatibel was met een complex plasmin- α_1 -antitrypsine.

Achteraf bleek echter dat het complex alleen reageerde met antisera tegen plasminogeen maar niet met antisera tegen α_1 -antitrypsine of enige andere gekende potentiële afremmer van plasmin. We hadden te doen met een nieuw eiwit, waarvan we de functie al wel kenden, zonder het eiwit zelf in handen te hebben. Het eiwit zou de naam α_2 -antiplasmin krijgen⁴² en we zouden het snel isoleren.

De toevallige ontdekking van α_2 -antiplasmin in 1973 zou gevolgd worden door een reeks systematische studies op het eiwit, voornamelijk met betrekking tot zijn biochemische en kinetische eigenschappen. Dit gebeurde vooral in samenwerking met Bjorn Wiman die in Stockholm werkte en die voor een jaar naar Leuven overkwam (zie ook hoofdstuk 'Een lastig eiwit' in deel II 'De t-PA-story'). Later zou ook Roger Lijnen als postdoctoraal medewerker dit onderzoek voortzetten en werd een collaboratie met William Holmes uit San Francisco tijdens zijn doctoraatsthesis in Leuven opgezet.

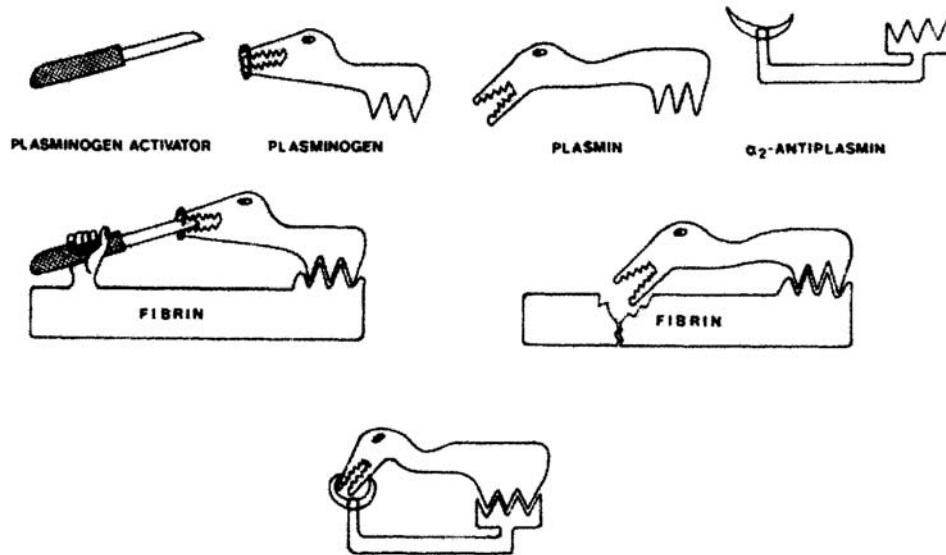
Uit al die experimenten distilleerden we in 1978 volgend functioneel model⁴³: α_2 -antiplasmin is een zeer snelle remmer van vrij in het plasma circulerend actief plasmin. Indien echter de 'lysine-sites' van plasmin bezet zijn – dit zijn de structuren waarmee plasmin bindt aan fibrine en die op de tekening voorgesteld

⁴¹ Collen D, Vermylen J. Metabolism of iodine-labeled plasminogen during streptokinase and reptilase therapy in man. *Thromb Res.* 1973; 2: 239-50.

⁴² Collen D. Identification and some properties of a new fast-reacting plasmin inhibitor in human plasma. *Eur J Biochem.* 1976; 69: 209-16.

⁴³ Wiman B, Collen D. Molecular mechanism of physiological fibrinolysis. *Nature.* 1978; 272: 549-50.

worden door de voetjes – verloopt de afremmende actie van α_2 -antiplasmin veel trager.



Schematische voorstelling van de moleculaire interacties die de afbraak van fibrine reguleren. Plasminogeenactivator zet inactief ('gemuilkorfd') plasminogeen om tot het proteolytisch actieve enzym plasmine. Deze conversie heeft enkel op een efficiënte manier plaats als beide eiwitten gebonden zijn aan fibrine in de bloedklonter. Vrij plasmine in het bloed wordt snel geïnactiveerd door α_2 -antiplasmin. Plasmine gebonden aan het fibrineoppervlak wordt gedeeltelijk beschermd tegen inactivering. Uit Col-len D. Regulation of fibrinolysis: plasminogen activator as a thrombolytic agent, in 'Pathobiology of the endothelial Cell'. Eds. H.L. Nessel and H.J. Vogel. Academic Press, New York, 1982, p.183-189.

Voor dat mechanisme is een logische biologische verklaring: vrij circulerend plasmine is een 'gevaar' voor ons lichaam: het verknipt niet enkel fibrine, maar het is ook in staat om tal van andere eiwitten te knippen. Actief plasmine vrij circulerend in bloed wordt best zo snel mogelijk geneutraliseerd. Alleen plasmine dat zich op een bloedklonter bevindt – dat met andere woorden gebonden is aan fibrine – mag actief blijven. Een systeem in perfect evenwicht.

Het principe van de differentiële neutralisatie van actief plasmine, al naargelang het gebonden is op de bloedklonter of vrij aanwezig is in het plasma, zal in de jaren nadien een focus blijven van ons onderzoek en zal tevens een hoeksteen vormen in de ontdekking van t-PA als trombolytisch geneesmiddel. Immers, ook bij de activering van plasminogeen naar plasmine is fibrinebinding cruciaal.

De ontdekking van α_2 -antiplasminen betekende ontegensprekelijk een eerste belangrijke doorbraak voor ons laboratorium. Het zette ons op de wereldkaart. Het leidde tot uitnodigingen om belangrijke voordrachten te geven, om reviews te schrijven en om me te mengen tussen de 'groten' in de cardiologische wereld.⁴⁴
45 46

⁴⁴ Collen D, Wiman B. Fast-acting plasmin inhibitor in human plasma. *Blood*. 1978; 51: 563-9. Review.

⁴⁵ Collen D, Wiman B. The fast-acting plasmin inhibitor of human plasma: The Prix Servier Lecture 1978. In: 'Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis, Vol. 4'. Ed.: J.F. Davidson. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1979; 11-19.

⁴⁶ Collen D. On the regulation and control of fibrinolysis. Edward Kowalski Memorial Lecture. *Thromb Haemost*. 1980; 43: 77-89. Review.

Ondernemer in spe?

Naar aanleiding van de ontdekking van α_2 -antiplasmine vraag ik ook mijn eerste octrooi aan (zie bijlage 1). Het octrooi draagt de titel ‘Thrombosis test’. De eerste versie wordt ingediend in Nederland met als prioriteitsdatum 19 september 1975. Het octrooi wordt in de VS ingediend op 13 september 1976 en nadien enkele keren aangepast.

De bedoeling was om de commerciële exploitatie te beschermen die uit de ontdekking van α_2 - antiplasmine kon voortvloeien. Het octrooi ging overigens wel breder dan α_2 -antiplasmine. Ook het gebruiken in een trombosetest van andere specifieke enzym-inhibitorcomplexen in bloedplasma, waaronder plasmine-antiplasmine, plasmine- α_2 -macroglobuline en thrombine-antithrombine III, wordt door de octrooiaanvraag beschermd.

Volgens mij waren deze enzymcomplexen goede biomerkers om na te gaan of in iemand zijn bloed het fibrinolysesysteem al of niet was geactiveerd. Dat kon er op wijzen dat deze persoon een trombose had, of tenminste had gehad. Het idee van de biomerkers werd conceptueel bevestigd uit vervolgonderzoek dat ik samen met Ed Plow van het *Scripps Institute* in La Jolla (VS) uitvoerde.⁴⁷ In principe werkt die test, alleen moet je er rekening mee houden dat er in die tijd nog geen monoklonale antilichamen bestonden. De antisera die wij destijds gebruikten, bestonden uit polyklonale mengsels van antilichamen bekomen uit konijnen die geïmmuniseerd waren met het plasmine-antiplasmincomplex. Die mengsels bevatten niet alleen antilichamen tegen het complex, maar ook tegen plasmine en antiplasmine afzonderlijk. De truc bestond erin de antisera eerst ‘op te zuiveren’ door ze te absorberen met achtereenvolgens plasmine en antiplasmine, en vervolgens te hopen dat er nog antilichamen overbleven die uitsluitend gericht waren tegen het complex plasmine- antiplasmin. Dat lukte in principe wel, alleen leidde deze werkwijze niet tot antisera die voldoende reproduceerbare resultaten opleverden om te gebruiken in een commerciële diagnostische test. Tot die conclusie kwamen ook de wetenschappers van Organon aan wie een licentie op het patent was toegekend. Het hele project kwam niet van de grond en het patent zou niet meer opbrengen dan een redelijke onderzoeksfinanciering gedurende enkele jaren.

Onder contract bij LR&D

Het was ook in die tijd dat afspraken werden gemaakt met de K.U.Leuven in verband met de valorisatie van onderzoek. Immers tal van vragen stelden zich bij het indienen van de octrooien: indien dit onderzoek zou leiden tot commerciële applicaties, wie was dan eigenaar, hoe zou een mogelijke financiële ‘return’ worden verdeeld, wie kon aanspraak maken op welk deel van de koek, enzovoort.

⁴⁷ Plow EF, de Cock F, Collen D. Immunochemical characterization of the plasmin-antiplasmin system. Basis for the specific detection of the plasmin-antiplasmin complex by latex agglutination assays. *J Lab Clin Med.* 1979; 93: 199-209.

De universiteit had zich al beraden over dergelijke vragen en had op 18 januari 1973 een ‘technology transfer’-kantoor geïnstalleerd dat instond voor de valorisatie van onderzoeksresultaten behaald door wetenschappers van de K.U.Leuven. Die organisatie kreeg de naam *Leuven Research and Development* vzw, afgekort LR&D.

Begin februari 1976 sloot ik een overeenkomst af met LR&D (zie bijlage 2). Daarin stond expliciet het volgende vermeld: ‘Dr. D. Collen en zijn medewerkers, tewerkgesteld aan de Katholieke Universiteit te Leuven, doen ten voordele van de v.z.w. *Leuven Research and Development* afstand van alle juridische, commerciële en financiële rechten en de uitoefening ervan, die verbonden zijn aan onderzoeksresultaten die zij rechtstreeks of onrechtstreeks bekomen hebben in het kader van hun onderwijs- en onderzoeksopdrachten aan de Katholieke Universiteit Leuven.’

Eventuele inkomsten die LR&D genereerde op basis van onze onderzoeksresultaten zouden verdeeld worden op basis van volgende sleutel: de K.U.Leuven ontving 10%, LR&D 7%, en na aftrek van alle kosten verbonden aan de uitoefening van zijn opdracht zal LR&D minimaal 50% van het resterende gedeelte ter beschikking houden voor verder onderzoek in ons laboratorium. Het resterende gedeelte kon aan de uitvinders en/of medewerkers als persoonlijke vergoeding worden uitgekeerd. Het document sluit echter af met ‘De concrete verdelingsmodaliteiten zullen ten gepaster tijd in onderling overleg tussen LR&D en Dr. D. Collen bepaald worden en ter goedkeuring aan de raad van beheer van LR&D worden voorgelegd. De raad van beheer van LR&D kan ten allen tijde zijn standpunt hierin aanpassen aan de omstandigheden.’

Dat document werd op 9 februari 1976 getekend door Guido Declercq, de toenmalige afgevaardigd beheerder van K.U.Leuven en Jos Bouckaert, de directeur van LR&D. Ikzelf tekende de overeenkomst op 11 februari 1976 met de goedkeuring van mijn diensthoofd Marc Verstraete.

Boer-ondernemer

Mijn eerste activiteiten als ondernemer situeren zich niet zozeer in het in licentie geven van onderzoeksresultaten en uitvindingen aan bedrijven, wel in het produceren en toeleveren van reagentia voor immunologische tests. In feite is het een grappig, maar tegelijk ook een ietwat pijnlijk verhaal.

Na mijn overeenkomst met LR&D en het eerste patent op de trombosetest bracht Jos Bouckaert mijn hoofd op hol. In de maanden die volgden zouden immers nog een aantal octrooiaanvragen volgen, die evenmin iets opbrachten. In plaats van een terugvloeit van middelen naar ons laboratorium, zat ik op zeker ogenblik met een flink negatief saldo aan octrooikosten bij LR&D. Ik moest er dus iets op verzinnen om mijn LR&D-schulden aan te zuiveren. Daarom werd ik producent van antisera.

In feite een eufemisme voor een portie ‘boerenactiviteit’ die zich voornamelijk afspeelde in mijn tuin in Winksele. Boer-zijn is me nooit helemaal vreemd geweest aangezien ik een deel van mijn kindertijd heb doorgebracht op het Limburgse platteland in Sint-Truiden. Ik heb ingewoond bij mijn grootmoeder langs moederszijde die jong weduwe geworden was en die het samen met haar vijf kinderen moest rooien met de opbrengst van vier melkkoeien, een dozijn kippen en een kersenboomgaard. Zo nu en dan werd een varken geslacht voor eigen gebruik. Honger hebben we nooit geleden maar een badkamer of centrale verwarming was er niet. Het toilet was een apart huisje in de tuin waarvan de opbrengst gebruikt werd voor de bemesting van de moestuin. Tijdens de winteravonden zaten we rond de Leuvense stoof in de enige verwarmde ruimte en we gingen slapen met een warmwaterkruik.

Maar dit terzijde en terug naar de antiserumproductie. De gezinswoning die mijn vrouw en ik in Winksele – nabij Leuven – in 1975 hadden gekocht, was gezegend met een tuin die al snel werd uitgebreid met een stuk weiland dat we kochten van de kerkfabriek van Winksele. Het was slechts een kleine stap om een tuinhuisje om te bouwen tot konijnenstal. Zelf hadden we immers in het lab nood aan specifieke antisera voor het isoleren van de eiwitten betrokken bij bloedstolling en fibrinolyse. Vandaag koop je die antilichamen en antisera bij gespecialiseerde bedrijven, of in het moeilijkste geval laat je die produceren door de ondersteunende diensten van de universiteit. In die tijd lag dat anders en het idee rijpte al snel om een batterij konijnen in het tuinhuis te laten fungeren als producent van antilichamen. Het volstond om de diertjes in te spuiten met de eiwitten waartegen we antilichamen wilden opwekken en enige weken later bloed af te tappen. Wat ik voor mijn eigen lab kon, kon ook op commerciële basis en ik leverde antisera aan een verdeler van antilichamen in de Benelux. De opbrengsten waren voldoende om onze rekening bij LR&D aan te zuiveren en nog wat onderzoeksgebonden kosten inclusief eigen representatiekosten te betalen.

Konijnen zijn echter kleine dieren, met relatief weinig bloed en dus leveren ze ook relatief weinig antisera voor commerciële exploitatie. Daarom werden enkele geiten aangekocht voor hetzelfde doel en later zelfs een pony. Ook werd door collega’s van andere onderzoeksdpartementen occasioneel gebruik gemaakt van de ‘Winksele production facilities’. Het praktische management van deze faciliteit was grotendeels in handen van mijn vrouw en kinderen (de pony fungeerde ook als rijdier). Zij verzorgden alle rondlopende viervoeters die een deel van het biomedisch onderzoek aan de K.U.Leuven bevoorraadden met noodzakelijke antilichamen. Een van onze eerste en trouwste ‘klanten’ was Alfons Billiau van het Rega Instituut. Hij getuigt over zijn ervaringen in Winksele⁴⁸: “Mijn onderzoek op het Rega Instituut spitste zich toe op menselijk interferon. Op een be-

⁴⁸ Billiau A. An anthology of scientific collaborations compiled at the occasion of the 65th birthday of Désiré Collen. Leuven 2008: 17-9.

paald ogenblik hadden we nood aan een krachtig en specifiek antiserum tegen interferon om affiniteitschromatografie uit te voeren en tests om het eiwit biochemisch te karakteriseren. Omdat we grote hoeveelheden antisera nodig hadden, dachten we aan het immuniseren van geiten. Maar dat bleek onmogelijk binnen de eenheid Experimenteel Dierenonderzoek van de K.U.Leuven. Daar werden enkel antisera geproduceerd met kleine dieren. De directeur verwees me echter naar Désiré, die met hetzelfde probleem worstelde en die blijkbaar een privéoplossing had gevonden. Uiteindelijk vonden we Louisa Collen, de echtgenote van Désiré, toentertijd een ervaren en liefdevolle geitenhoedster, bereid om twee extra geiten onder haar hoede te nemen. Eén dier zouden we immuniseren met gedeeltelijk gezuiverd β -interferon, het andere met volledig gezuiverd β -interferon. Jo Van Damme, mijn toenmalige doctoraatstudent en inmiddels hoogleraar, denkt nog met nostalgie terug aan het groene, heuvelige landschap van Winksele en de pogingen om de geiten te vangen en bloed af te tappen.”

“De antisera van de geiten van Désiré waren in 1980-1981 cruciaal voor het succesvol kloneren van β -interferon door een consortium van onderzoekers van het Rega Instituut, het Pasteur Instituut en de Universiteit Gent. Nog belangrijker waren beide antisera voor het identificeren van een eiwit dat samen met interferon werd geproduceerd en dat wel door het ene maar niet door het andere antiserum werd herkend. Dit eiwit bleek niets minder dan interleukine-6 te zijn.”

Alfons Billiau zou later een belangrijke rol spelen in mijn t-PA-verhaal en ik kon altijd op hem rekenen. Ook in tijden waarin mijn relatie met andere leden van het Rega Instituut vertroebelde. Alfons is een dierbare vriend geworden, en gebleven. Samen met Jos Vermeylen behoort hij tot een kleine, aparte klasse van echte ‘gentlemen’ waarvan ik het geluk heb gehad om aan de K.U.Leuven mee te mogen werken.

Deel II.

t-PA-story

Een lastig eiwit

Een eerste belangrijke aanzet tot het t-PA-onderzoek in Leuven werd geleverd door Bjorn Wiman die tot onlangs in het *Karolinska Institutet* in Stockholm (Zweden) heeft gewerkt. Mijn samenwerking met Bjorn heeft zich vooral toegeespitst op het onderzoek naar de zuivering en de biochemische karakteristieken van antiplasmine en de reactie van antiplasmine met plasmine (zie deel I). Bjorn was van augustus 1977 tot september 1978 bezoekend postdoc in het ‘nieuwe’ lab van Marc Verstraete op Gasthuisberg.

Vooraleer hij naar Leuven kwam, had Bjorn onderzoek gedaan op het eiwit weefselplasminogeenactivator of kortweg t-PA. Het eiwit was al in 1952 voor het eerst geïsoleerd door de Deense onderzoeker Tage Astrup en zijn medewerkers.⁴⁹ Van t-PA was geweten dat het niet-actief plasminogeen omzet naar actief plasmine dat dan op zijn beurt fibrine verknipt, het hoofdbestanddeel van bloedstolsels. Als de lange fibrinedraden worden geknipt, valt het stolsel uit elkaar en lost het op. t-PA lost met andere woorden niet zelf rechtstreeks bloedklonters op, maar brengt eerder een oplosmechanisme op gang.

Fibrinespecifiek

In de zomer van 1975 was Bjorn Wiman samen met Per Wallen in het Zweedse Umeå begonnen met de zuivering van t-PA uit de hartspier van varkens.⁵⁰ “Ik trachtte een manier te vinden om de activiteit van t-PA te meten”, herinnert Wiman zich.⁵¹ “Net zoals toen gebruikelijk was voor urokinase, eveneens een plasminogeenactivator, zocht ik in eerste instantie naar een test gebaseerd op het afbreken van caseïne, het belangrijkste eiwit in melk.”

Zelf is t-PA een ‘protease’ of een ‘eiwitknipper’. Dit wil zeggen dat t-PA plasminogeen activeert door er een stukje af te knippen. Het opzet van de test was om de mate waarin caseïne door het gevormde plasmine werd geknipt, te meten. Wiman: “Helaas, we kregen geen enkele reactie. Dat was vreemd, want hetzelfde staal van t-PA was wel heel actief in het oplossen van bloedklonters via het activeren van plasminogeen. Ik herinnerde me echter dat medewerkers van Astrup ooit hadden gesuggereerd dat t-PA een affiniteit had voor fibrine. Echt hard konden ze die stelling destijds niet maken omdat ze niet beschikten over gezuiver-

⁴⁹ Astrup T en Stage A. Isolation of a soluble fibrinolytic activator from animal tissue. *Nature*. 1952;170: 929.

⁵⁰ Wallén P, Wiman B. Proceedings: Purification of tissue activator using affinity adsorption on fibrin and hydrophobic interaction chromatography. Effect of fibrin on the enzymatic properties of the activator. *Thromb Diath Haemorrh*. 1975; 34: 609.

⁵¹ Mondelinge mededeling Wiman B. ‘De t-PA-story verteld door Bjorn Wiman’ tijdens ‘Heart for the Future’, 6 oktober 2008 en Wiman B. An anthology of scientific collaborations compiled at the occasion of the 65th birthday of Désiré Collen. Leuven 2008: 125-6.

verd t-PA. Ik voegde daarom wat gewassen fibrine aan de caseïneoplossing toe en onmiddellijk werd het melkeiwit afgebroken. Het was duidelijk: t-PA moest eerst gebonden zijn aan het oppervlak van fibrine-eiwitten vooraleer het effectief plasminogeen kon activeren.”

De rollende sneeuwbal

Toen Bjorn naar Leuven kwam en we vooral met antiplasmine aan de slag waren, wist hij me te overtuigen van de fibrinespecificiteit van t-PA. Voor mij was dat een belangrijk nieuw inzicht en ik begreep welke mogelijkheden er zich voordeden met t-PA. Het was namelijk op dat ogenblik al duidelijk dat de lage specificiteit van streptokinase een probleem kon worden om het verder te gebruiken als trombolytisch geneesmiddel. Als streptokinase wordt ingespoten in de bloedbaan bij hartpatiënten om lokaal een bloedstolsel in een kransslagader op te lossen, zorgt het er immers ook voor dat plasminogeen elders in het lichaam wordt geactiveerd waardoor het hele bloedstollingmechanisme ernstig van slag raakt. Dat kan een probleem worden. Indien daarentegen t-PA alleen actief is wanneer het zelf gebonden is op fibrinestrengen, zou het een veel specifiekere trombolytisch geneesmiddel kunnen zijn.

Bjorn Wiman verdient heel wat krediet voor zijn bijdrage aan het t-PA-verhaal. Al minimaliseert hij zijn eigen aandeel als volgt: “Komende van het hoge noorden, zou ik het t-PA-verhaal kunnen vergelijken met een sneeuwbal. Toen ik Désiré kon overtuigen van de fibrinespecificiteit van t-PA heb ik bij wijze van spreken een kleine sneeuwbal gemaakt. Désiré heeft die sneeuwbal aan het rollen gebracht en hem in een richting gestuurd waardoor hij alsmaar groter en groter en groter werd.”

Een kankergeneesmiddel?

De tweede aanzet van mijn t-PA-story kwam uit de Verenigde Staten en het Rega Instituut in Leuven. Onderzoeker Ed Reich en zijn medewerkers van de *Rockefeller University* in New York hadden rond 1975 een verband gelegd tussen het kwaadaardige fenotype van tumorcellen en de uitscheiding van plasminogeenactivatoren.⁵²

⁵² Ossowski L, Biegel D, Reich E. Mammary plasminogen activator: correlation with involution, hormonal modulation and comparison between normal and neoplastic tissue. *Cell*. 1979; 16: 929-40.

Zelf onderzocht ik al sinds 1976 met Alfons Billiau van het Rega Instituut het effect van plasma op de fibrinolytische activiteit van kwaadaardige cellen.⁵³ We hadden ontdekt dat plasma de capaciteit van tumorcellen om bloedstolsels op te lossen onderdrukte en dat de aanwezigheid van α_2 -antiplasmine daarin belangrijk was. Vanuit deze vaststelling hadden we de nogal aanmatigende hypothese vooruitgeschoven om specifieke remmers te ontwikkelen tegen proteasen van tumoren, uitgaande van de primaire structuur van α_2 -antiplasmine. We hoopten dat deze remmers antitumorale eigenschappen zouden hebben en dat we zo nieuwe geneesmiddelen tegen kanker op het spoor zouden komen. Achteraf bekeken een nogal naïeve redenering.

Maar goed, om dat onderzoek te kunnen doen, moesten we beschikken over een bron van zulke proteasen. Ik exploreerde verschillende mogelijkheden om aan bruikbare cellijnen of cultuurmedia te komen en kwam uiteindelijk terecht bij Grant Barlow van *Abbott Laboratories* in Chicago (VS) die ons cultuurmedium van een menselijke melanomacellijn opstuurde. Zelf had hij die cellijn rechtstreeks van Ed Reichs laboratorium gekregen. De cellijn was afkomstig van een longmetastase van een zekere mevrouw Bowes die al in 1974 was overleden aan de gevolgen van haar melanoma (een bijzonder kwaadaardig type huidkanker).

We kwamen er al snel achter dat we voor onze experimenten veel grotere hoeveelheden van dit medium nodig hadden dan Barlow ons kon toesturen. Daarvoor moesten we de cellijn zelf kunnen opgroeien. Tegen het einde van 1978 had ik haar te pakken via Dan Rifkin van het *New York University Medical Center*.

Alfons Billiau van het Rega Instituut herinnert zich nog de dag dat ik de Bowes-cellen bij hem binnenbracht⁵⁴: “Op een winterdag stond Désiré plots voor mijn bureau met in zijn handen een cultuurfles. ‘Of ik hiervoor kon zorgen’, vroeg hij me, wijzend naar de fles. Hij vertelde mij dat de cellijn ‘Bowes’ heette en terloops gaf hij me nog een snelcursus trombolysen en achtergrond over plasminogeenactivatoren. Voor ons lab was het een peulenschil om de cellijn verder op te groeien, het groeimedium te oogsten en het aan Désiré te leveren. Op het Rega beschikten wij immers op dat ogenblik al over een pilootopstelling voor de semi-massacultuur van fibroblasten. We gebruikten die fibroblasten om interferon uit af te zonderen. Zoals gewoonlijk houdt Désiré echter niet van half werk: hij nam onmiddellijk een laborante aan, en liet haar in het Rega Instituut de cultuur van de Bowes-cellijn nog verder opschalen.”

⁵³ Collen D, Billiau A, Edy J., De Somer P. Identification of human-plasma protein which inhibits fibrinolysis associated with malignant cells. *Biochim Biophys Acta*. 1977; 499: 194-201.

⁵⁴ Mondelinge mededeling Billiau A. ‘De t-PA-story verteld door Alfons Billiau’ tijdens ‘Heart for the Future’, 6 oktober 2008 en Billiau A. An anthology of scientific collaborations compiled at the occasion of the 65th birthday of Désiré Collen. Leuven 2008; 17-19.

Productiekampioen

Het was met dit cultuurmedium dat we in februari 1979 aantoonde dat de plasminogeenactivator geproduceerd door de Bowes-cel lijn pas actief werd als hij op fibrine was gebonden en dat het hier waarschijnlijk om t-PA ging (zie ook het beginverhaal in het inleidend hoofdstuk). Dat we er juist de Bowes-cel lijn hadden uitgepikt, is een heel gelukkig toeval. Achteraf is pas duidelijk geworden dat de meeste kanker cellijnen een urokinaseachtige plasminogeenactivator produceren die niet aan fibrine bindt. Tot op de dag van vandaag is de Bowes-cel lijn bij mijn weten nog steeds de beste door de natuur ontwikkelde productiemachine van t-PA.

Omdat ze zoveel plasminogeenactivator produceerde, was de Bowes-cel lijn al in diverse labs opgekweekt vooraleer ze in Leuven terecht kwam. Toch had al die jaren niemand onderzocht om welke plasminogeenactivator het nu precies ging, hoewel Lynn Wilson en Eugene Dowdle in 1980 publiceerden dat sommige tumoren in cultuur een niet-urokinaseachtige plasminogeenactivator produceerden.⁵⁵ Het idee om deze plasminogeenactivator verder te ontwikkelen tot een trombolytisch geneesmiddel was echter nog bij niemand opgekomen. Een zoveelste gelukkig toeval in mijn t-PA-verhaal.

Opgebruikt geluk

Al snel nadat Alfons Billiau de grootschalige kweek van de Bowes-cel lijn had aangepakt, leek het echter alsof ons geluk was opgeraakt. Om het t-PA uit het cultuurmedium van de Bowes-cel lijn te zuiveren, gebruikten we het protocol van Bjorn Wiman. We konden aan de hand van chromatografie op fibrine-Sepharose, lysine-Sepharose, arginine-Sepharose en butyl-Sepharose aantonen dat de plasminogeenactivator uit de Bowes-cel lijn zich exact hetzelfde gedroeg als natuurlijk t-PA. Bovendien verloren we, zoals beschreven was, enorm veel eiwit tijdens het zuiveringsproces door adsorptie aan glas, gels, dialysemembranen, ultrafilters etc. Dat stelde ons voor ontzaglijke problemen want hoewel we wel enige vooruitgang boekten, waren we er in de zomer van 1979 nog steeds niet in geslaagd om een homogeen product te bekomen. We zaten muurvast.

⁵⁵ Wilson EL, Becker ML, Hoal EG, Dowdle EB. Molecular species of plasminogen activators secreted by normal and neoplastic human cells. *Cancer Res.* 1980; 40: 933-8.

Vermoedens worden feiten

Gered vanuit Nederland

t-PA opzuiveren bleek een harde noot om te kraken. Het eiwit bleef overal aan kleven en we kregen het maar niet volledig gezuiverd. De oplossing voor ons probleem zou uiteindelijk uit Nederland komen. In september 1979 begon Dingeman (Dick) Rijken aan een driejarig postdoc in Leuven. Hij had net aan het *Gaubius Instituut* van TNO in Leiden zijn doctoraat afgewerkt en was erin geslaagd om uit vijf kilogram humaan baarmoederweefsel één milligram zuiver t-PA af te zonderen.⁵⁶ Het probleem van de adsorptieverliezen had Dick na een paar jaar sukkelen kunnen opheffen door het detergent Tween80 te gebruiken. Eenmaal in Leuven paste Dick een vereenvoudigde versie van zijn protocol toe. Hij had amper twee maanden nodig om, met het gebruik van Tween80, gezuiverd en homogeen t-PA af te zonderen uit het cultuurmedium van de Bowes-celijn.⁵⁷

“Toch had Désiré me aanvankelijk niet aangezocht om t-PA voor hem te isoleren”, vertelt Dick Rijken er zelf over.⁵⁸ “Pieter Brakman, mijn toenmalige supervisor in Leiden, en Marc Verstraete, de baas van Désiré, hadden afgesproken dat ik in Leuven aan de slag kon. Ik was bijzonder verheugd om voor een *‘science star’* als Désiré te gaan werken. Hij had immers samen met Bjorn Wiman op de Karlovy Vary-meeting in 1978 de *‘Prix Servier’* in ontvangst mogen nemen voor het onderzoek op α_2 -antiplasmin. Op diezelfde conferentie werd mijn enthousiasme in Désiré weliswaar een beetje getemperd toen ik vaststelde dat hij niet was opgedaagd op mijn voordracht over de biochemische en immunologische karakterisering van t-PA. Vermoedelijk had hij belangrijkere dingen aan het hoofd.”

Bij het einde van zijn doctoraat twijfelde Dick Rijken echter wel of hij tijdens zijn postdoc ook nog onderzoek op t-PA zou doen. Hij had de indruk dat de meest relevante informatie over t-PA in 1978-79 wel bekend was. Maar eigenlijk had niemand er een idee van dat er nadien nog duizenden wetenschappelijke artikels over t-PA zouden geschreven worden. In september 1978 bezocht Dick Rijken

⁵⁶ Rijken DC, Wijngaards G, Zaal-de Jong M, Welbergen J. Purification and partial characterization of plasminogen activator from human uterine tissue. *Biochim Biophys Acta*. 1979; 580: 140-53.

⁵⁷ Rijken DC en Collen D. Purification and characterization of the plasminogen activator secreted by human melanoma cells in culture. *J Biol Chem*. 1981; 256: 7035-41.

⁵⁸ Mondelinge mededeling Rijken D. 'De t-PA-story verteld door Dingeman Rijken' tijdens 'Heart for the Future', 6 oktober 2008 en Rijken D. An anthology of scientific collaborations compiled at the occasion of the 65th birthday of Désiré Collen. Leuven 2008: 91-3.

me voor het eerst in Leuven. Het was een zaterdagochtend. “Ik stelde de resultaten van mijn onderzoek uit Leiden voor en er werd gepraat over wat ik tijdens mijn verblijf in Leuven zoal zou kunnen doen. We spraken af dat ik eerst mijn doctoraat zou afwerken en dat ik pas nadien in Leuven de kinetica van de plasminogeenactivering door t-PA zou bestuderen”, aldus Rijken.

“Désiré wijzigde echter die plannen. In de zomer van 1979, enkele weken voor ik naar Leuven afzakte, ontmoette ik hem op het congres van de *International Society on Thrombosis and Haemostasis* in London. Hij vertelde me enthousiast over een melanomacellijn die 500 eenheden t-PA per milliliter cultuurmedium produceerde. Alleen waren er enkele problemen met de zuivering. Of ik die problemen kon oplossen van zodra ik in Leuven was? Uiteindelijk bleek één milliliter cultuurmedium ‘slechts’ twintig eenheden t-PA op te leveren in plaats van de beloofde 500, maar dat was nog gigantisch vergeleken met andere t-PA-bronnen. We slaagden erin om één milligram t-PA af te zonderen uit tien liter medium en dat is nog altijd een enorm succes vergeleken met één milligram t-PA uit vijf kilogram baarmoederweefsel tijdens mijn Leiden-periode.”

Op basis van het oorspronkelijke protocol van Dick Rijken, dat we nadien nog zouden vereenvoudigen, isoleerden mijn medewerkers op Gasthuisberg tussen eind 1979 en 1983 in totaal twee tot drie gram zuiver t-PA uit cultuurmedium van de Bowes-celijn.⁵⁹ Dat was voldoende om de biochemische, biologische en trombolytische eigenschappen van t-PA volledig in kaart te brengen. Dat onderzoek gebeurde in samenwerking met Roger Lijnen, Marc Hoylaerts, Irène Juhán-Vague en Christian Korninger. Daarenboven werden diverse samenwerkingen opgezet met andere onderzoeksgroepen, de eerste klinische studies uitgevoerd en de weg geëffend die van recombinant t-PA een succesvol geneesmiddel zou maken.

Een snelle tussenspurt

Het onderzoek vorderde in die periode snel, heel snel. Osamu Matsuo uit Myasaki (Japan) was in september 1979 onze onderzoeksgroep komen vervoegen voor een jaar. Hij onderzocht de specifieke trombolytische activiteit van t-PA in plasma.⁶⁰ Maar belangrijker nog wist hij het door Dick Rijken afgezonderde

⁵⁹ Collen D, Rijken DC, Van Damme J, Billiau A. Purification of human tissue-type plasminogen activator in centigram quantities from human melanoma cell culture fluid and its conditioning for use in vivo. *Thromb Haemost.* 1982; 48: 294-6.

⁶⁰ Matsuo O, Rijken DC, Collen D. Comparison of the relative fibrinogenolytic, fibrinolytic and thrombolytic properties of tissue plasminogen activator and urokinase in vitro. *Thromb Haemost.* 1981; 45: 225-9.

t-PA met succes te testen in een diermodel: konijnen met een experimentele longembolie.⁶¹ Matsuo werkte van 's morgens vroeg tot 's avonds laat. Soms nam ik hem 's avonds mee naar mij thuis om hem toch wat krachtige en gezonde voeding voor te schotelen. Aan een zieke of uitgeputte Japanse postdoc had ik trouwens weinig. Voor Matsuo betekenden die uitnodigingen vaak een dilemma omdat hij met een experiment bezig was. Meermaals nam hij dan een konijn mee naar mijn huis en zette het in mijn badkamer. Tijdens het dineren of het nuttigen van een glas *Old Smuggler*, nam Matsuo dan tussendoor bloedstalen. In recordtijd slaagde de Japanner erin om de eerste overtuigende preklinische studies met t-PA met succes af te ronden.

In dezelfde periode bracht Marc Hoylaerts de kinetika van de plasminogeenactivatie door t-PA in kaart en verduidelijkte hij verder de rol van fibrine.⁶² De paper die hij daarover schreef in de *Journal of Biological Chemistry* zou uiteindelijk meer dan 1000 keer geciteerd worden.

Dat alles maakte dat we in de loop van 1980 een goed beeld kregen van de werking en de eigenschappen van het t-PA uit de melanomacellijn. Bovendien konden we het t-PA-onderzoek koppelen aan de resultaten van het α_2 -antiplasminenonderzoek, dat eveneens was blijven doorlopen. In het hoofdstuk '*Plasminogen activator as a thrombolytic agent*' van het boek '*Pathobiology of the Endothelial Cell*' kon ik bijgevolg met overtuiging het volgende neerschrijven:

“Extrinsieke plasminogeenactivator (dat is de oorspronkelijke naam van wat later t-PA zal worden) heeft een zwakke affiniteit voor plasminogeen in de afwezigheid van fibrine ($K_m = 65 \mu M$) maar een veel hogere affiniteit in de aanwezigheid van fibrine (K_m tussen 0,15 en 1,5 μM). Deze verhoging van de affiniteit is het resultaat van het ‘assembleren’ van plasminogeenactivator en plasminogeen op het fibrineoppervlak. In deze reactie bindt plasminogeen aan fibrine via een specifieke structuur, de zogenaamde ‘lysine binding site’. Een van de manieren om de afbraak van fibrine te reguleren is met andere woorden de plasminogeenactivatie ter hoogte van het fibrineoppervlak.

Plasmine – de geactiveerde vorm van plasminogeen – wordt uiterst snel geïnactiveerd door α_2 -antiplasmine ($k_1 \sim 10^7 M^{-1}s^{-1}$). De halflevetijd van vrij plasmine in het bloed wordt daarom geschat op ongeveer 0,1 seconde. Plasmine waarvan de lysine binding site bezet is, wordt echter 50 keer trager geïnactiveerd door α_2 -antiplasmine. Het reversibel blokkeren van de actieve site van

⁶¹ Matsuo O, Rijken DC, Collen D. Thrombolysis by human tissue plasminogen activator and urokinase in rabbits with experimental pulmonary embolus. *Nature*. 1981; 291: 590-1.

⁶² Hoylaerts M, Rijken DC, Lijnen HR, Collen D. Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin. *J Biol Chem*. 1982; 257: 2912-9.

plasmine door substraat vertraagt ook aanmerkelijk de snelheid van inactivatie door α_2 -antiplasmine. Vanuit deze gegevens kan men extrapoleren dat plasminemoleculen die via hun lysine binding site op het fibrineoppervlak zijn gebonden en die betrokken zijn bij fibrineafbraak, beschermd zijn tegen een snelle inactivering door α_2 -antiplasmine. Plasmine dat wordt vrij gezet van het fibrineoppervlak zou daarentegen wel snel worden geïnactiveerd door α_2 -antiplasmine. Deze interacties zijn voorgesteld in onderstaande figuur.”⁶³

De bijhorende tekening (zie p. 37) die van de hand is van mijn vroegere medewerker Frans DeCock, werd een klassieker en smukte tal van voordrachten op – niet enkel die van mij. Wat in februari 1979, met ons eerste rudimentaire experiment nog allemaal ‘vermoedens’ waren, was op een jaar tijd omgezet in een goed onderbouwde casus en het werd voor iedereen duidelijk dat we nu, meer dan ooit, het concept van de fibrineselectieve trombolytische therapie moesten doorduwen. In hetzelfde hoofdstuk van dat boek claimde ik dan ook:

“Het (hierboven beschreven) moleculaire model voor de regulatie van de afbraak van fibrine heeft belangrijke gevolgen voor de ontwikkeling van trombolytische agentia. Inderdaad, de huidige beschikbare trombolytische geneesmiddelen streptokinase en urokinase hebben geen specifieke affiniteit voor fibrine en activeren daardoor zonder onderscheid zowel vrij circulerend als fibrinegebonden plasminogeen. Het gevolg daarvan is dat nieuw gevormd plasmine dat vrij in het bloed circuleert, snel zal afgebroken worden door α_2 -antiplasmine en daardoor verloren is voor trombolyse. Eens de inhibitor α_2 -antiplasmine echter uitgeput is, zal overblijvend actief plasmine andere plasma-eiwitten degraderen (fibrinogeen, factor V, factor VIII etc.) waardoor een ernstige neiging tot het optreden van bloedingen ontstaat. Dit kan verklaren waarom behandeling met streptokinase of urokinase slechts een beperkte efficiëntie heeft en geassocieerd is met ernstige, soms zelfs levensbedreigende nevenwerkingen.

⁶³ Oorspronkelijke tekst: “Extrinsic plasminogen activator has a weak affinity for plasminogen in the absence of fibrin (KM = 65 μ M) but a much higher affinity in the presence of fibrin (KM between 0.15 and 1.5 μ M). This increased affinity appears to be the result of a ‘surface assembly’ of plasminogen activator and plasminogen on the fibrin surface. In this reaction plasminogen binds to fibrin primarily via specific structures called the ‘lysine-binding site’. Thus one way of regulating fibrinolysis is at the level of plasminogen activation localized at the fibrin surface. Plasmin is extremely rapidly inactivated by α_2 -antiplasmin ($k_1 \sim 10^7$ M⁻¹ sec⁻¹); the half-life of free plasmin in the blood is therefore estimated to be approximately 0.1 sec. Plasmin with an occupied lysine-binding site is however inactivated 50 times more slowly by α_2 -antiplasmin. Reversible blocking of the active site of plasmin with substrate also markedly reduces the rate of inactivation by α_2 -antiplasmin. From these findings one can extrapolate that plasmin molecules generated on the fibrin surface, which are bound to fibrin through their lysine-binding sites and involved in fibrin degradation, are protected from rapid inactivation by α_2 -antiplasmin. Plasmin released from the fibrin surface would, however, be rapidly inactivated by α_2 -antiplasmin. These interactions are schematically visualized in Fig. 2”.

Het lijkt er daarom sterk op dat specifieke trombolyse alleen mogelijk wordt als het proces van activering van plasminogeen kan gelokaliseerd en beperkt worden tot het fibrineoppervlak. Volgens de huidige inzichten kan dit alleen bereikt worden door een activator te gebruiken die, zoals de fysiologische activator (bedoeld wordt t-PA – nvd), zelf bindt met het fibrineoppervlak en ter plaatse actief wordt.”⁶⁴

⁶⁴ Originele tekst: “The molecular model for the regulation of fibrinolysis described above has important consequences for the development of thrombolytic agents. Indeed, the presently available thrombolytic agents streptokinase and urokinase have no specific affinity for fibrin and therefore activate circulating and fibrin-bound plasminogen relatively indiscriminately. Consequently, plasmin formed in circulating blood will initially be neutralized very rapidly by α_2 -antiplasmin and be lost for thrombolysis. Once the inhibitor becomes exhausted, residual plasmin will degrade several plasma proteins (fibrinogen, factor V, factor VIII, etc.) and cause a serious bleeding tendency. This may explain why treatment with streptokinase or urokinase has only a limited efficiency and is associated with serious, sometimes life-threatening side effects. From this reasoning it appears that specific thrombolysis will be possible only if the activation process of plasminogen can be localized at and confined to the fibrin surface. According to the present concepts, this can only be adequately achieved with the use of an activator that, like the physiological activator, adsorbs to the fibrin surface and becomes active in loco.”

Een patent en een cont(r)act ... met de vermeende dochter van een professor

Goede raad van Rector Pieter De Somer

Op 22 mei 1980 gaf ik een voordracht aan het Rega Instituut met daarin een volledig overzicht van de toen gekende biochemische, biologische en trombolytische eigenschappen van t-PA. Na het seminarie moedigde Pieter De Somer, oprichter van het Rega Instituut en toen al ruim een decennium lang rector van de universiteit, me aan om een industriële partner te zoeken. Hij was zeker het idee genegen om een octrooiaanvraag in te dienen op t-PA via *Leuven Research and Development* vzw (LR&D), het ‘technologie transfer office’ van de K.U.-Leuven.

Pieter De Somer hielp me ook daadwerkelijk aan een eerste industrieel contact. Nog in mei 1980 zou ik een overeenkomst tot confidentialiteit tekenen met het Duitse Bayer AG. Het bedrijf kreeg alle informatie over t-PA (ook niet gepubliceerde) en kreeg zes maanden de tijd om te beslissen of het verder wilde gaan met t-PA. De samenwerking met Bayer was evenwel niet echt vruchtbaar en het heeft er nooit naar uitgezien dat Bayer geloofde in het potentieel van t-PA. De samenwerking bloedde dus langzaam dood en leidde tot weinig of niets.

Een eerste octrooi

Op 11 juni 1980 diende LR&D een octrooiaanvraag in voor t-PA (zie bijlage 3). Als uitvinders waren opgelijst: Désiré Collen, Dick Rijken en Osamu Matsuo.⁶⁵ De eerste aanvraag werd ingediend in Nederland, naderhand zou de rest van Europa volgen en de VS. Van cruciaal belang voor mijn t-PA-toekomst was die eerste indiendatum van 11 juni 1980, want een dag later zou ik op het *Fifth Congres on Fibrinolysis* in Malmö (Zweden) voor het eerst in het openbaar en in internationaal gezelschap spreken over de trombolytische mogelijkheden van t-PA. In Malmö zou het lot van t-PA een beslissende wending nemen. Maar wel op een geheel onverwachte manier ...

⁶⁵ De eerste aanvraag werd ingediend in Nederland op 11 juni 1980 en zou later opgenomen worden in US Patent 4,752,603, jun. 21, 1988, Collen et al. Plasminogen activator and pharmaceutical composition having thrombolytic activity.

Te vroeg, te laat ... of net op tijd

“Begin 1980 waren er in de VS geruchten dat een Europese professor een middel had gevonden om bloedklonters op te lossen. Die professor zou een voordracht geven op een congres in Zweden”, herinnert Diane Pennica zich⁶⁶. “Ik was op dat ogenblik een maand aan het werk bij *Genentech*. Ik kwam pas van de collegebanken, wist amper wat kloneren was, maar ik was jong, enthousiast en ... ik had een paspoort. Dus zei ik ‘Natuurlijk ga ik naar Zweden’ toen mijn baas vroeg of ik naar een zekere professor Collen wilde gaan luisteren.”

“Omdat ik zeker wilde spelen, was ik een dag vroeger vanuit Californië naar Malmö afgereisd. Ik kwam op 12 juni rond de middag in het hotel aan met een kanjer van een jetlag. Bij het inchecken vroeg ik terloops aan de receptioniste waar de volgende dag de conferentie zou plaatsvinden. Tot mijn verbazing antwoordde ze dat de ‘meeting van de dokters’ al begonnen was. Ik was helemaal overstuur. Mijn nieuwe werkgever had me de halve wereld rondgestuurd en ik kwam een dag te laat aan op een belangrijke conferentie! Wat moest ik mijn werkgever vertellen als ik de voordracht van Collen zou missen. Ik gooide mijn koffers in de hoek van mijn kamer, rende naar de meetingroom, opende zachtjes de deur en zette me in een stoel achteraan in de vergaderzaal. Ik was nog in mijn reisplunje: een lange broek en een knalroze sweater. Ik zag dertig mannen rond een tafel – waarvan er een aantal verbaasd in mijn richting keken – en net op dat ogenblik stond Désiré Collen op en startte zijn voordracht over t-PA. Ik viel van de ene verbazing in de andere: Collen had een cellijn, een antilichaam, gezuiverd eiwit, een diemodel ... de Belgische professor had het werkelijk allemaal dik voor mekaar!”

A piece of cake

“Tijdens de pauze kwam een van de deelnemers naar mij toe en vroeg of hij mij kon helpen. Ik stelde mezelf voor als Diane Pennica van *Genentech*, excuseerde me omdat ik te laat was voor de conferentie en dat ik het jammer vond om de ochtendsessie gemist te hebben. ‘Oh’, antwoordde de man, ‘dit is niet de echte conferentie. Die begint pas morgen.’ Het bleek dat ik een private preconference sessie was binnengeduikeld waarvoor alleen dertig toppers uit het cardiologisch onderzoek waren uitgenodigd. De enige reden waarom ik niet onmiddellijk was buitengezet, was omdat ze dachten dat ik de dochter van een van de sprekers was.”

⁶⁶ Mondelinge mededeling Pennica D. ‘De t-PA-story verteld door Diane Pennica’ tijdens ‘Heart for the Future’, 6 oktober 2008 en Pennica D. An anthology of scientific collaborations compiled at the occasion of the 65th birthday of Désiré Collen. Leuven 2008: 81-3.

“Gelukkig waren de heren van de preconferentie zo *gentlemanlike* om me uit te nodigen voor het diner. Ik raakte in gesprek met Désiré en verzekerde hem hoe graag ik t-PA zou kloneren. Volgens hem een quasi onmogelijke opgave want het was een groot eiwit. Ik was heel naïef en flapte er toch uit dat de wetenschappers van *Genentech* al menselijk insuline en groeihormoon hadden gekloneerd, dus waarom zou t-PA dan niet lukken? ‘Sure, we can do it’, verzekerde ik hem.”

“Ik zou nooit tot bij Désiré zijn geraakt indien ik niet naar die premeeting en het diner was gegaan. De volgende dag sprak Désiré voor meer dan 300 aandachtige toehoorders en nadien werd hij belaagd door mensen die nog allerhande vragen hadden. Daar was ik nooit doorheen gekomen.”

Een nieuwe industrie

Diane Pennica droeg zonder twijfel het enthousiasme en het voluntarisme in zich dat de Californische nieuwbakken biotechindustrie in haar begindagen kenmerkte. *Genentech* was een van de belangrijkste exponenten van die industrie. Het bedrijf werd in 1976 opgericht door Bob Swanson en Herbert Boyer. Swanson was toen 28, had een *bachelor of science* in chemie en een *master in business administration* beide van het prestigieuze *Massachusetts Institute of Technology* in Boston (VS). Na zijn opleiding ging hij werken in San Francisco bij een *venture-capital*²-bedrijf. Toen hij een boek had gelezen over hoe Francis Crick en James Watson in 1953 de structuur van DNA hadden opgehelderd, wilde hij een biotechnologiebedrijf oprichten. Herbert Boyer had meer *‘credentials’*. Hij was een bekend geneticus en professor biochemie aan de *University of California / San Francisco* (UCSF).⁶⁷

In april 1976 brachten beide stichters \$500 in als beginkapitaal van het nieuwe bedrijf. Tijdens de eerste negen maanden van *Genentech* bracht de risicokapitaalverschaffer *Kleiner, Perkins, Caulfield & Byers*, de vroegere firma van Swanson, nog eens \$100 000 bij elkaar. Met dat geld besteedden Boyer en Swanson hun onderzoek grotendeels uit aan wetenschappers van het UCSF en de *City of Hope* universiteit. Een eigen lab om onderzoek te doen, hadden ze immers niet.

Binnen het jaar slaagden ze er toch in om het menselijk gen voor somatostatine af te zonderen, over te brengen in een bacterie en de bacterie het menselijk eiwit te laten produceren. Deze procedure is wat wetenschappers ‘kloneren’ noemen. In 1977 konden Swanson en Boyer met twee wetenschappers aan de slag in hun eigen labs en een jaar later hadden ze menselijk insuline gekloneerd. In 1979 bouwden ze hun hoofdkwartier in het zuiden van San Francisco en tegen de lente

⁶⁷ Diebold J. *The innovators. The discoveries, inventions, and breakthroughs of our time.* Truman Talley Books/Plume, New York, 1990: 227-32.

van 1980 – ongeveer de tijd dat ik ‘overvallen’ werd door Diane Pennica – had *Genentech* naast somatostatine en insuline ook al de scalpen van α -interferon en menselijk groeihormoon aan de gordel hangen.

De beursgang van *Genentech* werd in het najaar van 1980 met de nodige fanfare aangekondigd. *Genentech* bracht op 14 oktober één miljoen aandelen naar de Amerikaanse beurs en kreeg een eerste notering van \$35. Twintig minuten later prijkte het aandeel al op \$88. Die dag sloot het af op \$71,25. De beursintroduktie van *Genentech* blijft tot op de dag van vandaag een memorabele gebeurtenis op Wall Street.⁶⁸

LR&D op pad gestuurd

Diane Pennica keerde van Malmö terug naar San Francisco en bracht haar enthousiasme voor t-PA over op haar bazen. Kort nadien had ik diverse telefoongesprekken met Herbert Heyneker van *Genentech*. Die bleef de interesse van *Genentech* herhalen om met ons samen te werken. Bij die telefoongesprekken was er ook een licht dreigende ondertoon: bij verdere terughoudendheid vanuit Leuven zou *Genentech* trachten alternatieve pistes te bewandelen om van t-PA een trombolytisch geneesmiddel te maken. Wij van onze kant hadden op dat ogenblik alleen de ingediende octrooiaanvraag, maar nog helemaal geen toegekend octrooi op t-PA.

In augustus 1980 verzocht ik Jos Bouckaert, de toenmalige directeur van LR&D, om naar *Genentech* te gaan. Hij kwam terug met een voorstel voor een niet-exclusieve samenwerking tussen *Genentech* Inc en LR&D, althans zo stelde hij het voor. In de context van deze overeenkomst zouden monsters van de Bowes-celijn, zuiver t-PA en antiserum tegen t-PA worden getransfereerd naar *Genentech* in ruil voor toegang tot recombinant (gekloneerd) t-PA, betrokkenheid bij al het verder onderzoek van *Genentech* op recombinant t-PA (rt-PA) en een royalty van 1% op de mogelijke commerciële opbrengst van rt-PA. In september 1980 werd deze overeenkomst (zie bijlage 4), met mijn goedkeuring, ondertekend door LR&D. Het volledige contract was anderhalve pagina lang, inclusief de handtekeningen. Vandaag zou een dergelijk contract, met verstrekende implicaties voor het onderzoek aan de K.U.Leuven maar ook voor een bedrijf als *Genentech*, minstens enkele tientallen pagina's in beslag nemen. Een leger van advocaten en *business developers* zouden er zich wekenlang over buigen. Het toont meteen aan dat in die dagen wetenschappelijke samenwerkingen nog vaak op onderling vertrouwen waren gestoeld en, toegegeven, dat we allemaal nog flink naïef en amateuristisch waren op dat vlak.

⁶⁸ Glick BR and Pasternak JJ. The molecular biotechnology revolution in *Molecular Biotechnology, Principals and Applications of Recombinant DNA*, Third Edition, ASM Press, Washington DC, 1998, 3.

Ik zou dan ook pas achteraf doorhebben dat het contract ook een *right of first refusal*-clausule bevatte. Eventuele overeenkomsten rond t-PA die we met andere partners zouden afsluiten, moesten we dus eerst aan *Genentech* voorleggen en zij hadden het recht om deze overeenkomsten af te blokken en aan dezelfde voorwaarden over te nemen. Gelukkig is de samenwerking met *Genentech* steeds vlot blijven verlopen, maar een dergelijke naïeve houding bij onderhandelingen zou ik zeker geen tweede keer aannemen.

18/24, 7/7

In San Francisco wordt Diane Pennica zich in het najaar van 1980 bewust van de opdracht die ze zichzelf op de hals heeft gehaald. t-PA kloneren bleek allesbehalve 'a piece of cake'. Gedurende vele maanden werkte zij, en de leden van haar team, 18 uur op 24, 7 dagen op 7, zonder een dag vakantie. Immers, andere bedrijven hadden eveneens de jacht op rt-PA ingezet. De enige manier om de competitie voor te blijven, was harder te werken dan zij. De maanden van teleurstelling en valse aanknopingspunten regen zich aan elkaar. Eindelijk, in oktober 1981, toen ze een DNA-deelsequentie van een van de zovele klonen zag, was er een herkenningspunt: een zeer ongewone streng van vijf aminozuren waarvan ze wist dat ze tot het t-PA-eiwit behoorden. De eerste kloon met een menselijk t-PA-gen, of tenminste een groot stuk ervan, was een feit.⁶⁹

Een mooi eiwit

In de volgende maanden werd de structuur van het t-PA-gen en het eiwit volledig ontrafeld door de *Genentech*-wetenschappers. De succesvolle klonering werd bekendgemaakt op het *Sixth Congress on Fibrinolysis* in 1982 in Lausanne (Zwitserland) en gepubliceerd door het tijdschrift *Nature* op 20 januari 1983 (zie bijlage 5).⁷⁰

Voor zij die erin geïnteresseerd zijn: het eiwit t-PA bestaat uit 527 aminozuren en heeft 35 cysteïneresidu's waardoor het zeventien potentiële zwavelbruggen kan vormen. Er zijn vier mogelijke N-glycosylatiesites, ze zijn gelokaliseerd op de aminozuren Asn117, Asn184, Asn218 en Asn448. Achteraf zou blijken dat het t-PA geïsoleerd uit Bowes-cellijn een derivaat was van het natuurlijke t-PA waar-

⁶⁹ Mondelinge mededeling Pennica D. 'De t-PA-story verteld door Diane Pennica' tijdens 'Heart for the Future', 6 oktober 2008 en Pennica D. An anthology of scientific collaborations compiled at the occasion of the 65th birthday of Désiré Collen. Leuven 2008: 81-3.

⁷⁰ Pennica D. et al. Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E. coli*. *Nature*. 1983 Jan 20;301(5897):214-21.

Een patent en een cont(r)act ... met de vermeende dochter van een professor

van de eerste drie aminozuren afgesplitst waren. Natuurlijk t-PA bevat dus eigenlijk 530 aminozuren, maar de oorspronkelijke nummering uit ons *Nature*-artikel werd toch vrij algemeen bewaard.

De genetische ingenieurs van *Genentech* slaagden er nadien in om het gen over te brengen naar een celsysteem van zoogdiercellen dat uiteindelijk werd gebruikt voor de productie van de 'geneesmiddelenversie' van recombinant t-PA.

Met de succesvolle klonering en expressie had *Genentech* zichzelf in poleposition gebracht om van rt-PA een succesvol trombolytisch geneesmiddel te maken.

De wind tegen

Dansende poppen

Zoals eerder al gesteld, gaf ik op 22 mei 1980, enkele weken voor ik naar Malmö ging, een presentatie van onze onderzoeksresultaten op het Rega Instituut. De wat lauwe ontvangst van de resultaten tijdens en na deze presentatie, en de uitdrukkelijke suggestie van Rector De Somer om een industriële partner te zoeken, waren voor mij belangrijke argumenten om met *Genentech* in zee te gaan. Daarbij kwam nog dat verschillende experts ons hadden geadviseerd dat de klonering en expressie van t-PA wel eens een project van lange adem kon worden en veel middelen zou vragen. LR&D en ik meenden dan ook, in alle eerlijkheid, dat we het best zouden samenwerken met een partner die sterke referenties kon voorleggen op het vlak van kloneren. *Genentech* was op dat ogenblik de wereldkampioen in deze discipline.

Maar eind 1980 gingen de poppen aan het dansen. Herbert Heyneker van *Genentech* was uitgenodigd om een voordracht te geven aan het Rega Instituut over recombinant interferon. Terloops meldde Heyneker de samenwerking met LR&D voor de klonering van t-PA. Bouckaert en ikzelf werden *stante pede* door Rector De Somer ontboden om ons samenwerkingsakkoord met *Genentech* te verantwoorden.

Tijdens deze discussie werden wij erover geïnformeerd dat het Rega een eigen onderzoeksgroep voor recombinant DNA-technologie had opgestart en dat ze t-PA als testcase wilde gebruiken om deze technologie in de vingers te krijgen. De nieuwe ambities van het Rega Instituut waren duidelijk ontstaan nadat Guido Volckaert en Ghislain Opdenakker in de zomer van 1980 het Rega Instituut hadden verwoegd.

Loyaliteit in collaboraties

Zowel Bouckaert als ikzelf hebben toen onze verbintenis met *Genentech* omstandig toegelicht en duidelijk gemaakt dat we een open en eerlijke relatie nastreefden met zowel *Genentech* als het Rega Instituut. Bovendien meenden wij dat de samenwerking met het Amerikaanse bedrijf op geen enkele manier interfereerde met enige andere verplichting ten opzichte van de universiteit. Verder bevestigde ik nogmaals expliciet dat ik alle eerder gemaakte afspraken zou nakomen, zoals ik tot dan toe had gedaan. Ik meen dat ik dat ook heb gedaan. Gedurende de hele periode dat Ghislain Opdenakker aan zijn doctoraat heeft gewerkt, hebben we hem technisch ondersteund met activiteitstests en hebben we alle verzoeken voor cruciale reagentia ingewilligd, waaronder antilichamen tegen t-PA en gezuiverd

t-PA. Zonder deze reagentia zou hij er volgens mij niet in geslaagd zijn om, op een zo korte tijdsperiode, boodschapper-RNA te isoleren van t-PA zoals beschreven in het artikel in de *European Journal of Biochemistry*.⁷¹ Toch meende hij in een beëdigde verklaring naar aanleiding van de gerechtelijke procedures die later in de VS en in Engeland zouden lopen rond de octrooien op t-PA en rt-PA, te moeten stellen dat hij alle werk zelfstandig had uitgevoerd, behalve enkele standaardtests. Hij ziet daarbij wel de cruciale rol van deze essentiële reagentia over het hoofd.

Gezien mijn relatie met *Genentech* en de eigen intenties van het Rega Instituut werden sinds eind 1980 al de verdere interacties met het Rega Instituut afgehandeld door mijn medewerker Roger Lijnen om elk belangenconflict in mijnen hoofde te vermijden. De voornaamste frustratie die ik hieraan overgehouden heb, is dat de steeds zeer collegiale samenwerking met Alfons Billiau bijna noodgedwongen is stilgevallen.

De laatste belangrijke bijdrage van onze onderzoeksgroep aan het t-PA-onderzoek op het Rega Instituut vond plaats in de tweede helft van 1981 toen we, na een expliciet verzoek, 12 mg gezuiverd t-PA (batch 110, opgezuiverd in de periode augustus-september 1981) overdroegen voor de partiële bepaling van de aminozuursequentie. Het materiaal werd door mijn medewerker Roger Lijnen op 10 oktober 1981 behandeld met trypsine waarna 11 peptides – eiwitfragmenten – werden afgezonderd en doorgestuurd naar Wilfried Rombauts van het Departement Biochemie. Rombauts beschikte toen over toestellen en een methode voor eiwitsequentiebepaling die gevoeliger was dan de onze.

Wij hadden met Rector De Somer een duidelijke afspraak, die terugging tot onze geanimeerde discussie op het einde van 1980, dat het Rega Instituut vrij kon beschikken over niet-confidentiële informatie voor onderzoeksdoeleinden. Ik ben er echter nooit over ingelicht geweest dat het Rega Instituut contacten had met het Britse biotechnologiebedrijf Celltech, totdat Guido Volckaert mij terloops op een receptie, dat moet ergens in 1985 zijn geweest, meldde dat hij over oligonucleotiden beschikte voor het opvissen van cDNA-klones van t-PA die afkomstig waren van Celltech. Ik was me er ook helemaal niet van bewust dat het Rega Instituut gezamenlijk met Celltech resultaten over t-PA-onderzoek zou publiceren, totdat hun gezamenlijke publicatie uitkwam.⁷² Tot overmaat van ramp bleek dat zij dezelfde pentapeptidesequentie hadden gebruikt als Diane Pennica een paar jaar eerder. Ik heb toen heel wat uitleg moeten geven aan *Genentech* met de gegevens van Roger Lijnen en Wilfried Rombauts in de hand om

⁷¹ Opendakker G, Weening H, Collen D, Billiau A, De Somer P. Messenger RNA for human tissue plasminogen activator. *Eur J Biochem.* 1982; 121: 269-74.

⁷² Harris TJ, Patel T, Marston FA, Little S, Emtage JS, Opendakker G, Volckaert G, Rombauts W, Billiau A, De Somer P. Cloning of cDNA coding for human tissue-type plasminogen activator and its expression in *Escherichia coli*. *Mol Biol Med.* 1986; 3: 279-92.

hen te overtuigen dat ik hiermee zelf niets te maken had, dat de fameuze penta-peptidesequentie onafhankelijk door Rombauts was bepaald en dat er geen sprake was van het doorgeven van confidentiële onderzoeksinformatie. Ik was me er tot dan niet van bewust dat er informatie, waartoe mijn onderzoeksgroep had bijgedragen, gebruikt werd in een collaboratie die mogelijk in competitie kon treden met *Genentech*.

Samenwerking met *Genentech* gaat onverminderd verder

Midden 1981 wordt het duidelijk dat *Genentech* er zal in slagen om t-PA te kloneren (zie vorig hoofdstuk). Sneller dan we ooit in Leuven hadden verwacht. Op vraag van *Genentech* en met mijn goedkeuring, werd daarom een nieuwe samenwerkingsovereenkomst gesloten tussen *Genentech* en LR&D. Deze overeenkomst zou het raamwerk vormen van de intense collaboratie tussen ons lab aan de K.U.Leuven en het Amerikaanse biotechbedrijf en tevens de basis leggen voor de exclusieve licentieovereenkomst van t-PA in 1983. De details van de overeenkomst uit 1981 werden uitgewerkt door Thomas Kiley van *Genentech* en mezelf, maar verscheidene tussenversies van het contract werden gelezen en gemendeerd door Jos Bouckaert, directeur van LR&D.

Deze overeenkomst hield in dat LR&D (en dus *in casu* mijn lab en ikzelf) voor een periode van twee jaar exclusief zouden samenwerken met *Genentech* op het vlak van t-PA. De overeenkomst ging in op 1 november 1981. Dit betekende echter nog niet dat *Genentech* exclusieve rechten kreeg op de mogelijke verkoop van rt-PA. Na die twee jaar konden we in principe met andere partners in zee gaan, alleen had *Genentech* wel het recht op voorkoop. Over een volledige exclusiviteit zou later nog onderhandeld worden.

De samenwerking hield in dat *Genentech* per jaar \$200 000 zou betalen voor de productie van 200 mg t-PA door ons laboratorium. Gezien de overeenkomst voor twee jaar gold zou *Genentech* \$400 000 betalen. De overeenkomst werd echter nadien nog eens verlengd voor twee jaar.

Het geproduceerde t-PA, afkomstig van de Bowes-celijn, zou gebruikt worden voor het opzetten van *in vitro* en *in vivo* studies. Bovendien zouden wij een reeks preklinische en klinische tests uitvoeren met t-PA waarbij we *Genentech* zouden informeren over de resultaten.

Een kopie van de overeenkomst tussen *Genentech* en LR&D werd overhandigd aan Pieter De Somer in zijn hoedanigheid van Rector van de universiteit, vóór de overeenkomst werd getekend door de verantwoordelijken van LR&D, met de goedkeuring van de verantwoordelijken van de K.U.Leuven. De storm was toen blijkbaar geluwd.

Een eerste patiënt

Op congres in Rotterdam

Het eerste gebruik van t-PA als trombolytisch geneesmiddel kwam er door toedoen van Alfons Billiau van het Rega Instituut. Billiau nam deel aan een congres in Rotterdam en ontmoette er de Nederlandse nefroloog Willem Weimar van het Dijkzigt Ziekenhuis. Billiau en Weimar doen het verhaal.^{73 74}

“Het was met gemengde gevoelens dat ik op 21 april 1981 samen met Pieter De Somer met de auto vanuit Leuven naar de *Annual Interferon Conference* in Rotterdam trok,” schrijft Billiau. “Het interferonproject op het Rega Instituut vertoefde in een kritieke fase. Op dat ogenblik werd ons interferon, geïsoleerd uit fibroblastculturen, getest in klinische studies bij patiënten met kanker, multiple sclerose en virale infecties. Bij een van die studies was Willem Weimar betrokken. De resultaten van die studies in het algemeen waren zeker niet negatief maar overdonderend positief waren ze evenmin. Mijn aanvankelijke enthousiasme, net als dat van mijn mentor, Pieter De Somer, nam echter elke dag beetje bij beetje af. Bovendien was de recombinant DNA-technologie in opmars en we voelden het aankomen dat deze technologie dé productietechnologie zou worden voor menselijk interferon. Wellicht moesten we onze plannen voor de commerciële exploitatie van interferon uit fibroblastculturen opbergen. Het was met enig leedvermaak dat ik naar de ‘milligrammen’-productie van Désiré’s t-PA keek terwijl ons interferon zich slechts in hoeveelheden van microgrammen liet produceren en opzuiveren. Tot overmaat van ramp bleek Willem Weimar niet op te dagen op de openingsreceptie van de conferentie.”

Een kritieke nierpatiënt

“Ik kwam te laat op de receptie in het Stadhuis van Rotterdam”, herinnert Weimar zich, “omdat ik me zorgen maakte over een patiënt die een niertransplantatie had ondergaan. De patiënt had een groot bloedstolsel ontwikkeld in de vena iliaca (de grote vene in het bekken). Die trombose dreigde fataal te worden voor de getransplanteerde nier. De nierfunctie was al aan het verminderen en we verwachtten in de loop van de volgende dag een volledig verlies. Alfons Billiau vertelde me tijdens de receptie over het werk van Désiré Collen en wees me op het

⁷³ Mondelinge mededeling Billiau A. ‘De t-PA-story verteld door Alfons Billiau’ tijdens ‘Heart for the Future’, 6 oktober 2008 en Billiau A. An anthology of scientific collaborations compiled at the occasion of the 65th birthday of Désiré Collen. Leuven 2008: 17-9.

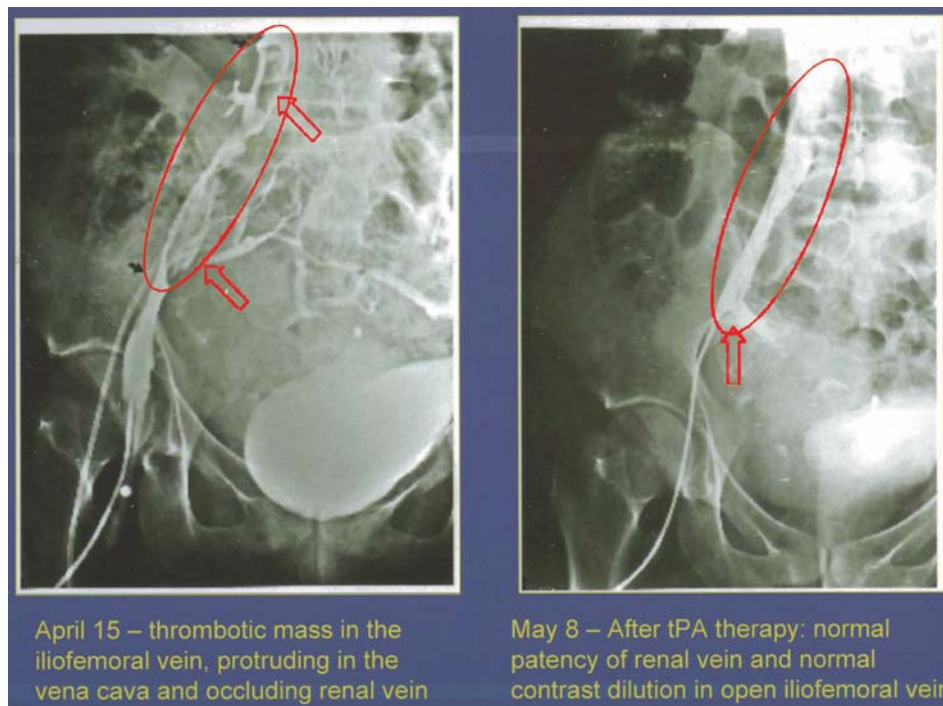
⁷⁴ Weimar W. An anthology of scientific collaborations compiled at the occasion of the 65th birthday of Désiré Collen. Leuven 2008: 123-4.

Een eerste patiënt

bestaan van t-PA. Collen en Billiau hadden blijkbaar juist de eerste batches voor klinische toepassing klaargemaakt. Ik begreep onmiddellijk dat dit t-PA de enige redding was voor mijn patiënt.”

Billiau: “In plaats van naar het congres te gaan, keerde ik de volgende ochtend met de auto terug naar Leuven. Ik belde Désiré en legde hem het probleem uit. Désiré gaf onmiddellijk zijn fiat, ik keerde terug naar Rotterdam en nog voor de middag werd de eerste batch t-PA geïnjecteerd bij de patiënt.”

Weimar: “Het effect was dramatisch! De bloedklonter verdween helemaal. We stonden verbaasd naar de Röntgenfoto te kijken. Kortom, de nierfunctie keerde terug, wij schreven een paper in de *Lancet*⁷⁵, Désiré werd beroemd, en bovenal is de patiënt, 27 jaar later, nog steeds in leven met een perfect functionerende nier.”



Röntgenfoto van het bekken van een niertransplantatiepatiënt voor en na de behandeling met t-PA. Links is te zien hoe de vena iliaca verstopt is door een bloedstolsel, rechts is de vena volledig open (radiografie genomen drie weken na behandeling).

⁷⁵ Weimar W, Stibbe J, van Seyen AJ, Billiau A, De Somer P, Collen D. Specific lysis of an iliofemoral thrombus by administration of extrinsic (tissue-type) plasminogen activator. *Lancet*. 1981; 2: 1018-20.

Willem Weimar zou later nog een tweede nierpatiënt behandelen met t-PA – voor die patiënt was de auto van Dick Rijken cruciaal. Dick kon een ritje naar Rotterdam als t-PA-koerier combineren met familie- en vriendenbezoek.

Dat bij die eerste patiënten volledige trombolysen optrad met infusies van slechts 5 en 7,5 mg t-PA mag achteraf gezien een wonder heten. De standaard trombolysesebehandeling van een hartinfarct zou later met 100 mg t-PA gebeuren. Hierop terugblikkend kunnen we alleen maar besluiten dat dergelijke minidoses effectief waren omdat in deze nierpatiënten de bloedklonters een bijzonder fragiele architectuur hadden.

Maar zonder twijfel hebben deze patiënten mij en mijn medewerkers gesterkt in de overtuiging dat we op de goede weg zaten met t-PA als potentieel trombolytisch geneesmiddel.

Preklinisch t-PA-onderzoek

Het onderzoek op t-PA ging onverminderd voort, met verdubbelde energie zelfs, zowel bij *Genentech* in San Francisco, op Gasthuisberg in Leuven, als elders in de wereld via tal van samenwerkingen. Door de overeenkomst met *Genentech* uit 1981 kreeg mijn onderzoeksgroep voldoende financiële middelen om de biochemie en de fysiologische karakteristieken van t-PA uit de Bowes-cel lijn verder te exploreren. Diverse *in vitro* en *in vivo* studies werden uitgevoerd ter voorbereiding van preklinisch en klinisch onderzoek met rt-PA van zodra dit beschikbaar zou zijn.

Amerikaanse honden

Een van de belangrijkste samenwerkingen in die tijd was met Steven Bergmann en Burton Sobel van de *Washington University School of Medicine* in Saint-Louis (VS). Vandaag is Burton Sobel directeur van het *Cardiovasculair Research Institute* aan de *University of Vermont* in Colchester (VS).

Via een hondenmodel voor coronaire trombose wilden we aantonen dat t-PA een even goed of beter trombolyticum was dan streptokinase en dat het minder bijwerkingen had. Bovendien wilden we nagaan in hoeverre t-PA ook effectief zou zijn als het intraveneus werd ingespoten in plaats van rechtstreeks toegediend in de coronaire slagader via een arteriële katheter. Intraveneuze injectie heeft als groot voordeel dat t-PA sneller kan toegediend worden aan patiënten. De arts hoeft immers niet te wachten tot de patiënt in een cathlab kan behandeld worden.

Zonder twijfel was een bijkomende meerwaarde van het onderzoek in Saint-Louis ook dat we naast een electrocardiogram en een angiografie ook positronemissietomografie (PET) gebruikten om de schade aan het hart te meten. Van deze technologie is nadien gebleken dat ze niet alleen bruikbaar is voor proefdieren, maar ook bij mensen met een hartinfarct goede diagnostische resultaten kan opleveren.

Voor het onderzoek werden 24 honden ingezet. Die werden eerst verdoofd en vervolgens werd experimenteel een bloedstolsel in een coronaire slagader verwekt door een koperen spiraaltje in te brengen via een arteriële katheter. Dan werden zij behandeld met streptokinase of t-PA, hetzij intracoronair, hetzij intraveneus.

Streptokinase intracoronair toegediend deed er gemiddeld 31 minuten over om het bloedvat opnieuw te openen, intraveneus streptokinase gemiddeld 85 minuten. Voor t-PA vielen deze cijfers veel gunstiger uit: zowel intracoronair als intraveneus toegediend t-PA opende de verstopte bloedvaten na gemiddeld 8 mi-

nuten. Tevens trad er bij de met t-PA behandelde honden geen systematische activering van het fibrinolytisch systeem op omdat t-PA alleen plasminogeen activeerde ter hoogte van het stolsel en niet elders in het lichaam. De experimenten van Bergmann en Sobel waren een succes over de hele lijn. We haalden er dan ook het tijdschrift *Science* mee.⁷⁶

Recombinant t-PA, niet te onderscheiden van natuurlijk Bowes melanoma t-PA

Eind 1982 kregen we voor het eerst de beschikking over rt-PA van *Genentech*. Onderzoek in de VS en in ons eigen lab bracht snel de overeenkomsten tussen t-PA uit de Bowes-cel lijn en rt-PA aan het licht. Niet alleen was hun sequentie identiek, ook biochemisch vertoonden ze dezelfde karakteristieken.^{77 78 79}

Maar dat op zich bewijst nog niet dat rt-PA ook trombolytische effecten zou hebben *in vivo*, in een proefdiermodel, bijvoorbeeld. Een eerste reeks experimenten op honden werd uitgevoerd door Burton Sobel in St. Louis en Frans Van de Werf in Leuven. Ze vergeleken beiden rt-PA met urokinase. Bij de negen honden behandeld met rt-PA, werd de bloeddorstomring hersteld na gemiddeld 13,7 minuten. Van de tien honden behandeld met urokinase trad slechts bij zeven trombolysen op en pas na gemiddeld 19,3 minuten. Bovendien kregen twee honden af te rekenen met ernstige bloedingen en was bij alle tien het stollingsbeeld van het bloed ernstig gewijzigd.⁸⁰ Het onderzoek betekende een flinke ruggeleuning om met rt-PA aan de klinische studies te beginnen.

Niet over één nacht ijs

Maar *Genentech* en ikzelf vonden dat we niet over één nacht ijs mochten gaan, en in parallel werd een derde onderzoeksteam ingeschakeld voor het preklinische onderzoek. Met name Herman Gold en Tsunehiro Yasuda van het *Massachusetts General Hospital* dat verbonden is aan de *Harvard Medical School* in Boston (VS). Tsunehiro Yasuda vertelt hoe het preklinisch onderzoek op honden uit twee lui-

⁷⁶ Bergmann SR, Fox KA, Ter-Pogossian MM, Sobel BE, Collen D. Clot-selective coronary thrombolysis with tissue-type plasminogen activator. *Science*. 1983; 220: 1181-3.

⁷⁷ Pennica D et al., Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E. coli*. *Nature*. 1983 Jan 20; 301(5897): 214-21.

⁷⁸ Zamarron C, Lijnen HR, Collen D. Kinetics of the activation of plasminogen by natural and recombinant tissue-type plasminogen activator. *J Biol Chem*. 1984; 259: 2080-3.

⁷⁹ Collen D et al. Biological properties of human tissue-type plasminogen activator obtained by expression of recombinant DNA in mammalian cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 1984; 231: 146-52.

⁸⁰ Van de Werf F et al. Coronary thrombolysis with intravenously administered human tissue-type plasminogen activator produced by recombinant DNA technology. *Circulation*. 1984; 69: 605-10.

ken bestond⁸¹: “In de eerste plaats wilden we nagaan wat de optimale rt-PA-dosis voor een succesvol herstel van de bloedstroom bij honden zou zijn. Bij elk van de honden werd een stabiel bloedstolsel aangebracht in een zijtak van de linker coronaire arterie. Als rt-PA-behandelingsdoses werden 5, 10, 15 en 25 microgram per minuut en per kilogram lichaamsgewicht gebruikt. Elk van de doses leidde tot een herstel van de bloedstroom, maar hoe hoger de dosis, hoe sneller het herstel optrad.”

Vervolgens zetten de onderzoekers een gerandomiseerde studie op die bovendien geblindeerd was.⁸² Concreet zouden een aantal van de honden rt-PA krijgen, andere dieren placebo onder de vorm van een zoutoplossing. Deze tweede groep vormde de controlegroep. De onderzoekers zelf waren niet op de hoogte welke dieren rt-PA of placebo kregen, slechts één technicus, Bob Holt, beschikte over de randomisatiesleutel. De eerste experimenten begonnen in maart 1983 en de procedure werd toegepast op twee tot drie honden per week. “De dagen dat Désiré in Boston was, zou hij al om zeven uur ’s ochtends aanwezig zijn en de hele dag blijven. Hij wilde zoveel mogelijk de experimenten zelf opvolgen. Tegen december 1983 wilde *Genentech* de resultaten kennen. Het laatste experiment werd uitgevoerd in de tweede week van december, nadien werd de blinding opgeheven en na een avond rekenen kenden we de resultaten. Die waren ronduit verbluffend: bij alle honden behandeld met rt-PA was de bloedstroom hersteld terwijl dit bij geen enkele hond uit de placebogroep het geval was. Deze zorgvuldig uitgevoerde, geblindeerde studie heeft me een enorm vertrouwen gegeven in rt-PA”, besluit Tsunehiro Yasuda.

Een verloren vriend

Herman Gold, ‘Chip’ voor wie hem kende, en zijn familie zouden zeer goede vrienden worden. Niet alleen verliep ons gezamenlijk onderzoek, zowel de preklinische als de klinische component (zie volgend hoofdstuk) succesvol, ook in het dagelijkse leven konden Chip en ik het goed met elkaar vinden. Ik werd als het ware ‘kind aan huis’ bij de familie Gold. Onze vriendschap was ook Tsunehiro opgevallen, want hij getuigt hierover: “Een andere belangrijke contributie van Désiré is dat hij Chip Gold overtuigde om een huis te kopen. Chip leefde met zijn vrouw Barbara Nath, een gastro-enterologe, en hun vijfjarige dochter Lisa in een 2-kamerappartement in *The Prudential Center* in Boston. Niet alleen was dat appartement veel te krap voor een gezin van drie. *The Prudential Center* is een

⁸¹ Mondelinge mededeling Yasuda T. ‘De t-PA-story verteld door Tsunehiro Yasuda’ tijdens ‘Heart for the Future’, 6 oktober 2008 en Yasuda T. An anthology of scientific collaborations compiled at the occasion of the 65th birthday of Désiré Collen. Leuven 2008: 127-9.

⁸² Gold HK et al. Coronary thrombolysis with recombinant human tissue-type plasminogen activator. *Circulation*. 1984; 70: 700- 7.

wolkenkrabber met voornamelijk kantoorgebouwen. Dus voor Lisa viel er daar niks te spelen, laat staan dat er vriendjes of vriendinnetjes in de buurt woonden. Barbara had haar oog laten vallen op een huis in Brooklyn in het westen van Boston, maar Chip moest niet weten van dat huis. Uiteindelijk werd Désiré om zijn mening gevraagd. Hij wist Chip ervan te overtuigen om het huis toch te kopen. De bezwaren die Chip opperde – dat het met 6 slaapkamers een veel te groot huis was – werden door Désiré gecounterd met de stelling dat die lege kamers snel zouden gevuld worden met allerlei rommel. Uiteindelijk zou Chip het huis kopen en zelfs de derde verdieping inrichten als semipermanente verblijfplaats voor Désiré.”

Inderdaad, de derde verdieping van Chips huis zou mijn uitvalsbasis worden de tientallen keren dat ik voor een paar dagen tot een paar weken in Boston was. De Gold-familie installeerde er een televisie (die ik nooit gebruikt heb) en richtte er een badkamer in (die ik zeker meer dan 100 keer gebruikt heb). Ik heb er meer tijd doorgebracht dan in eender welk specifiek hotel. Niet lang na de verhuizing kwam er ook een tweede kind, Jonathan Gold, die inmiddels een flinke tiener is geworden.

Chip is helaas overleden op 2 maart 2008, na een slepende ziekte. Met hem heb ik een van mijn allerbeste vrienden verloren.

De eerste klinische studies met t-PA

Dubbel record

20 januari 1983, 15 uur. Het cathlab in het Universitair Ziekenhuis van Leuven is overbevolkt. Iedereen is gespannen. Twintig tot dertig mensen wonen de procedure bij, ook ik. Voor het eerst wordt een patiënt met een acuut hartinfarct, de 58-jarige B.R., behandeld met t-PA onder het toezicht van cardioloog Frans Van de Werf. Op dat ogenblik werd nog t-PA gebruikt dat gezuiverd was uit de Bowes-cel lijn. Pas later zou rt-PA beschikbaar worden voor gebruik bij de mens.

De procedure werd een afknapper: noch intraveneuze, noch intracoronaire toediening van t-PA kregen het stolsel opgelost. De patiënt overleefde gelukkig wel zijn hartaanval, ook zonder succesvolle fibrinolyse. Flink twintig jaar later zal hij een pacemaker krijgen omdat hij hartritme stoornissen heeft. Uiteindelijk overlijdt hij op 83-jarige leeftijd, 25 jaar na de allereerste, maar helaas mislukte, t-PA-trombolysetherapie. In Leuven worden door Frans Van de Werf uiteindelijk nog vier andere patiënten met een hartinfarct behandeld. Alle vier met succes. Gelukkig maar. De gemiddelde tijd die nodig is om de bloedstolsels op te lossen bij deze vier patiënten, is respectievelijk 30, 37, 22 en 19 minuten. Ook Burton Sobel aan de *Washington University School of Medicine* in Saint-Louis (VS) behandelt twee patiënten met succes.

De ervaringen van beide teams worden gebundeld in een publicatie in de *New England Journal of Medicine* (zie bijlage 6).⁸³ Frans Van de Werf zegt over deze publicatie dat het de kleinste studie is – in termen van aantal behandelde patiënten – die ooit in de *New England Journal of Medicine* werd gepubliceerd. Bovendien behaalt de paper een wereldrecord afgemeten aan het aantal citaties per patiënt.⁸⁴

Eerste gerandomiseerde studie

De eerste gerandomiseerde studies met rt-PA zouden er ook snel aankomen. Na het succesvol kloneren van t-PA had *Genentech* zwaar geïnvesteerd in het opschaalen van de productie in zogenaamde CHO-cellijnen (*Chinese Hamster Ovary*).

⁸³ Van de Werf F et al. Coronary thrombolysis with tissue-type plasminogen activator in patients with evolving myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1984; 310: 609-13.

⁸⁴ Mondelinge mededeling Van de Werf F. 'De t-PA-story verteld door Van de Werf F.' tijdens 'Heart for the Future', 6 oktober 2008 en Van de Werf F. An anthology of scientific collaborations compiled at the occasion of the 65th birthday of Désiré Collen. Leuven 2008: 113-4.

Het bedrijf wilde zo snel mogelijk de eerste batches rt-PA voor klinisch onderzoek produceren. De experimenten in honden hadden immers aangetoond dat er in proefdiermodellen equivalentie was tussen t-PA uit de Bowes-celijn en rt-PA. Bovendien waren de eerste patiënten succesvol behandeld met t-PA in Leuven en St. Louis.

Nu stonden we voor de zware opdracht om aan te tonen dat rt-PA de lakmoesproef van de gerandomiseerde klinische studies zou overleven. We waren er ons allemaal van bewust dat dit de fase is waarin de meeste potentiële innovatieve geneesmiddelen sneuvelen.

De *Food and Drug Administration* (FDA) zette in 1983 het licht op groen voor een prospectieve, gerandomiseerde en placebogecontroleerde studie met rt-PA waaraan maximaal 50 patiënten deelnamen. De studie vond plaats aan drie topziekenhuizen in de Verenigde Staten: de *Washington University* (St. Louis), het *Massachusetts General Hospital* (Boston) en de *Johns Hopkins University* (Baltimore) onder leiding van respectievelijk Burton Sobel, Herman ‘Chip’ Gold en Myron Weisfelt. Het opzet van de studie was relatief complex, maar tegelijk geniaal omdat het met overtuiging de kracht van rt-PA in de verf zette⁸⁵: tweederde van de patiënten werden onmiddellijk behandeld met rt-PA, één derde met placebo. De placebopatiënten bij wie de bloeddorstrooming niet herstelde, zouden alsnog behandeld worden met rt-PA. Vijf bijkomende patiënten zouden niet gerandomiseerd worden, maar sowieso met rt-PA worden behandeld.

Bij 25 van de 33 met rt-PA behandelde patiënten (75%) herstelde de bloedstroom geheel of gedeeltelijk binnen een periode van 90 minuten na het opstarten van de behandeling. Van de veertien patiënten die met placebo werden behandeld, was er slechts één (7%) bij wie de coronaire occlusie verdween. De dertien patiënten die oorspronkelijk in de placebogroep zaten en bij wie geen reperfusie was opgetreden, werden alsnog behandeld met t-PA. De bloedstroom bij 9 onder hen (69%) zou uiteindelijk ook herstellen. Zes patiënten die niet reageerden op rt-PA werden in tweede instantie intracoronair behandeld met streptokinase, maar bij geen van hen resulteerde dit nog in enig effect.

Ondanks het succes van de studie, bracht ze ook animositeit teweeg tussen de onderzoekers. De eerste patiënt in deze studie werd behandeld door Eric Topol, een jonge specialist in opleiding in de afdeling van Myron Weisfelt in Baltimore. Topol zou uitgroeien tot een van de leidinggevende klinische onderzoekers in het domein van nieuwe behandelingen voor hartaanvallen.

⁸⁵ Collen D et al. Coronary thrombolysis with recombinant human tissue-type plasminogen activator: a prospective, randomized, placebo-controlled trial. *Circulation*. 1984 Dec; 70: 1012-7.

Na de eerste behandelde patiënt verspreidde de public relations afdeling van de *Johns Hopkins University* echter een ronkende persmededeling, wat tot hevig protest leidde van de twee andere centra. Het heeft Topol waarschijnlijk de eerste auteurspositie op de publicatie gekost, want toen het manuscript voltooid was, uitgaande van een eerste ontwerp dat ik samen met Elliott Grossbard, de toenmalige *Director of Clinical Research* van *Genentech*, geschreven had, konden de klinische onderzoekers het niet eens worden over de volgorde van de auteurs (de eerste en de laatste plaats worden aanzien als de belangrijkste). Er werd dan maar van lieverlede besloten, dat ik de eerste en Grossbard de laatste auteur zou worden. De studie werd gepubliceerd in het leidinggevend cardiologisch tijdschrift *Circulation* in december 1984. Hoewel ik actief aan het manuscript meegewerkt heb, heb ik geen enkele van deze patiënten ooit gezien, temeer daar ik geen toelating had om in de USA geneeskunde uit te oefenen.

Na deze open studie was de tijd van de geblindeerde studies angebroken.

Europese ECSG en Amerikaanse TIMI Studies

In Europa had Marc Verstraete in de jaren '70 een consortium van cardiologische onderzoekers bijeengebracht onder de naam *European Working Party on Streptokinase* om klinische studies uit te voeren rond trombolysen (voor een overzicht).⁸⁶ Marc Verstraete zette na de bemoedigende experimenten met t-PA en rt-PA op honden, apen⁸⁷ en de positieve ervaringen met de eerste behandelde patiënten in Leuven en St. Louis⁸⁸, een nieuw Europees consortium op om klinische studies uit te voeren met rt-PA. Het consortium voerde haar onderzoek uit onder de naam *European Cooperative Study Group (ECSG) for Recombinant Tissue-type Plasminogen Activator* en er namen meer dan 30 cardiologische en verwijzende centra uit ziekenhuizen verspreid over heel West-Europa aan deel.

De Europese studiegroep startte met een dubbelblinde, placebogecontroleerde studie waaraan 129 patiënten met een hartinfarct deelnamen: 64 patiënten kregen rt-PA intraveneus toegediend en 65 patiënten placebo. Na 90 minuten was bij 61% van de rt-PA-groep het verstopte coronair bloedvat weer open, terwijl dit slechts bij 21% van de controlegroep het geval was.⁸⁹

In een tweede studie zou rt-PA worden geëvalueerd ten opzichte van streptokinase. Dat eiwit had zich immers al de reputatie opgebouwd dat het een bruikbare bloedstolseloplosser was. De Amerikaanse autoriteiten hadden in 1982 bij monde van de FDA het intracoronair toedienen van streptokinase voor de behandeling van acuut hartinfarct immers al goedgekeurd. Over het gebruik van intravenues toegediend streptokinase had de FDA zich nog niet uitgesproken omdat er op dat ogenblik nog te weinig overtuigende gegevens waren over de effectiviteit van het geneesmiddel op deze manier toegediend.

In een nieuwe blinde, gerandomiseerde Europese studie werden 64 patiënten behandeld met rt-PA en 65 met streptokinase.⁹⁰ Na 75 tot 90 minuten was de verstopte coronaire arterie bij 75% van de rt-PA-patiënten opnieuw open, terwijl dit bij 55% van de patiënten behandeld met streptokinase het geval was. Het verschil tussen beide is evenwel niet statistisch significant ($p=0,054$). Bovendien

⁸⁶ Verstraete M. Trials of the European Working Party on streptokinase and of the European Cooperative Study Group on alteplase in patients with acute myocardial infarction. *European Investigators. J Interv Cardiol.* 1995; 8: 611-21. Review.

⁸⁷ Flameng W, Van de Werf F, Vanhaecke J, Verstraete M, Collen D. Coronary thrombolysis and infarct size reduction after intravenous infusion of recombinant tissue-type plasminogen activator in nonhuman primates. *J Clin Invest.* 1985; 75: 84-90.

⁸⁸ Van de Werf F et al. Coronary thrombolysis with tissue-type plasminogen activator in patients with evolving myocardial infarction. *N Engl J Med.* 1984; 310: 609-13.

⁸⁹ Verstraete M et al. Double-blind randomised trial of intravenous tissue-type plasminogen activator versus placebo in acute myocardial infarction. *Lancet.* 1985; 2: 965-9.

⁹⁰ Verstraete M et al. Randomised trial of intravenous recombinant tissue-type plasminogen activator versus intravenous streptokinase in acute myocardial infarction. Report from the European Cooperative Study Group for Recombinant Tissue-type Plasminogen Activator. *Lancet.* 1985; 1: 842-7.

was er ook geen verschil te meten in uiteindelijke mortaliteit. Er was wel een verschil voor het fibrinogeenniveau in het bloed: dat bleef hoger bij de rt-PA-patiënten (61% van het startniveau) ten opzichte van de patiënten behandeld met streptokinase (12% van het startniveau). Dat wijst erop dat rt-PA de stollingsfunctie van het bloed minder sterk aantast en men nam aan dat daardoor het gevaar op ernstige bloedingen lager is.

Tussen 1984 en 1992 zou het ECG consortium zes verschillende klinische studies uitvoeren waaraan een totaal van 2121 patiënten met een acuut hartinfarct deelnam. Die studies zouden leiden tot zes 'princeps'-publicaties en achttien ondersteunende publicaties (voor een overzicht).⁹¹ Er werd onder andere nagegaan in hoeverre een langdurige infusie met rt-PA de 'herocclusie' of het opnieuw verstopten van het coronaire bloedvat kon voorkomen⁹², of angioplastie (het openen van het bloedvat met een ballon) na trombolysen een meerwaarde bood⁹³, en of het bijkomend toedienen van heparine een effect zou hebben.⁹⁴ Samen met de Amerikaanse studies zouden deze onderzoeken de fundamenteen leggen voor de manier waarop rt-PA later optimaal gebruikt wordt in de cardiovasculaire geneeskunde.

NIH stapt in, TIMI-1

Aan de andere zijde van de Atlantische oceaan begonnen de Amerikaanse *National Institutes of Health* (NIH) al vanaf eind 1981 interesse te tonen in klinische trombolysen. Dat was nog voor intracoronair toegediend streptokinase door de FDA was goedgekeurd.

Op 20 mei 1982 keurde de *Advisory Council* van het *National Heart, Lung and Blood Institute* (NHLBI) het ontwerp van een eerste studie, de TIMI-1-studie, goed.⁹⁵ Aanvankelijk ging het om een onderzoek met drie patiëntengroepen: één patiëntengroep zou intracoronair behandeld worden met streptokinase, één groep intraveneus en de laatste groep zou placebo krijgen. De TIMI-1-studie komt onder leiding te staan van Eugene Braunwald van de *Harvard University*

⁹¹ Verstraete M. Trials of the European Working Party on streptokinase and of the European Cooperative Study Group on alteplase in patients with acute myocardial infarction. *European Investigators. J Interv Cardiol.* 1995; 8: 611-21. Review.

⁹² Verstraete M et al. Acute coronary thrombolysis with recombinant human tissue-type plasminogen activator: initial patency and influence of maintained infusion on reocclusion rate. *Am J Cardiol.* 1987; 60: 231-7.

⁹³ Simoons ML, Verstraete M, Wood D. Thrombolytic therapy and percutaneous coronary angioplasty. *Lancet.* 1988; 1: 1056.

⁹⁴ de Bono DP et al., Effect of early intravenous heparin on coronary patency, infarct size, and bleeding complications after alteplase thrombolysis: results of a randomised double blind European Cooperative Study Group trial. *Br Heart J.* 1992; 67: 122-8.

⁹⁵ Brody BA. Ethical issues in drug testing, approval, and pricing. *The clot dissolving drugs.* Oxford University Press, 1995, 29.

en er nemen dertien klinische centra aan deel, waaronder ook de onderzoeksgroep van Chip Gold in het *Massachusetts General Hospital*. Naast een stuurgroep met alle deelnemers en verantwoordelijken van het NHLBI, wordt de studie gesuperviseerd door een *Policy Advisory and Data Monitoring Board*, een onafhankelijke adviesraad voorgezeten door William Hood Jr. Dit soort complexe stuur- en toezichtstructuren is gebruikelijk in multicenterstudies die de NIH opzet.

Een eerste keer rt-PA tegen streptokinase

In de loop van 1983 wordt de oorspronkelijke opzet van de studie, als gevolg van de komst van rt-PA, echter grondig omgegooid. De TIMI-1-trial zal evolueren naar een vergelijkende studie tussen streptokinase en rt-PA. De Amerikaanse cardiologen vonden het inmiddels onzinnig om een breed opgezette klinische trombolysestudie uit te voeren zonder rt-PA erin op te nemen.

In deze bijgeschaafde versie van de TIMI-1 werden de eerste patiënten behandeld vanaf 20 augustus 1984. Het was de bedoeling dat 340 patiënten aan de studie zouden deelnemen, waarvan de helft behandeld met rt-PA en de andere helft met streptokinase. Als belangrijkste klinisch eindpunt werd het herstel van de bloedstroom (gehele of gedeeltelijke reperfusie en gemeten via angiografie) geselecteerd. Die angiografische meting werd uitgevoerd 90 minuten na het inzetten van de behandeling.

De studie zou twee keer ‘ad interim’ worden geëvalueerd, nadat 50% en 75% van de patiënten waren behandeld. Deze tussentijdse evaluaties moesten toelaten de studie eventueel stop te zetten als bleek dat er een te groot verschil bestond tussen de twee studiearmen. Bijvoorbeeld doordat één geneesmiddel veel doeltreffender is dan het andere of omdat er onaanvaardbare bijwerkingen ontstonden. Dergelijke interim reviews en voortijdige afbraakplannen worden vandaag bijna standaard ingebouwd in klinische studies.

Op 5 februari 1985, nadat 316 patiënten werden behandeld, zet het NHLBI de studie inderdaad stop op advies van de *Policy Advisory and Data Monitoring Board*. Het verschil tussen de twee armen van de studie is groter dan verwacht: 70% van de patiënten behandeld met rt-PA (100 van de 143) heeft na 90 minuten gehele of gedeeltelijke reperfusie; van de streptokinasegroep is dat 43% (63 van de 147). Die cijfers worden nog sprekender als alleen de groep van 232 patiënten wordt meegeteld die een volledige verstopping van een kransslagader hebben bij de start van de behandeling. Na 30, 60 en 90 minuten was de bloeddoorstroming geheel of gedeeltelijk hersteld bij respectievelijk 24%, 48% en 62% in de rt-PA-groep ten opzichte van 8%, 23% en 31% in de streptokinasegroep.

NEJM en Lancet

Een volledige analyse van de TIMI-studie zou pas in 1987 gepubliceerd worden in drie verschillende wetenschappelijke artikels.^{96 97 98} Geheel tegen haar gewoonte in zou het prestigieuze *New England Journal of Medicine* voor TIMI-1 een uitzondering maken en in haar nummer van 4 April 1985 al een tussentijdse update van de studieresultaten publiceren.⁹⁹ Normaal publiceert het tijdschrift alleen definitieve onderzoeksresultaten over een nieuw geneesmiddel, maar de *editorial board* vond de resultaten van rt-PA zo overtuigend dat het een uitzondering maakte.

Een flinke week later, op 13 april 1985, zou in de *Lancet*¹⁰⁰ het eerder geciteerde artikel van Marc Verstraete en de ECSG verschijnen (zie pag. 77). Hoewel deze studie op zich niet leidde tot statistisch significante verschillen tussen de rt-PA en streptokinasegroep, droeg ze toch flink bij tot de algemene perceptie dat rt-PA een beter trombolytisch geneesmiddel was dan streptokinase. Door de NEJM en Lancet-papers ontstond een ware hype rond rt-PA. Het toekomstige geneesmiddel werd door de lekenpers omschreven als het nieuwe wondermiddel tegen hartinfarcten. De lat voor rt-PA werd met andere woorden heel hoog gelegd, misschien wel té hoog.

⁹⁶ Mueller HS, Rao AK, Forman SA. Thrombolysis in myocardial infarction (TIMI): comparative studies of coronary reperfusion and systemic fibrinogenolysis with two forms of recombinant tissue-type plasminogen activator. *J Am Coll Cardiol.* 1987; 10: 479-90.

⁹⁷ Chesebro JH et al. Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) Trial, Phase I: A comparison between intravenous tissue plasminogen activator and intravenous streptokinase. Clinical findings through hospital discharge. *Circulation.* 1987; 76: 142-54.

⁹⁸ Sheehan FH et al., The effect of intravenous thrombolytic therapy on left ventricular function: a report on tissue-type plasminogen activator and streptokinase from the Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI Phase I) trial. *Circulation.* 1987; 75: 817-29.

⁹⁹ The Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) trial. Phase I findings. TIMI Study Group. *N Engl J Med.* 1985; 312: 932-6.

¹⁰⁰ Verstraete M et al. Double-blind randomised trial of intravenous tissue-type plasminogen activator versus placebo in acute myocardial infarction. *Lancet.* 1985; 2: 965-9.

Statistisch significant maar ook klinisch relevant?

In parallel met het enthousiasme nam echter ook de kritiek op de eerste TIMI-trial toe. Een aantal cardiologen vroegen zich af of het herstel van de bloeddorstrooming na 90 minuten wel het juiste klinische eindpunt was. In hoeverre is het bewezen dat een snelle heropening van het geblokkeerde bloedvat ook werkelijk klinisch relevant is? Dat het leidt tot een verbeterde hartfunctie en een langere overleving? Hoe zou met andere woorden de TIMI-studie eruit zien als andere eindpunten onderzocht waren geweest? Het waren vragen waarop in de jaren nadien antwoorden moesten komen.

Uit een meer uitgediepte analyse van de TIMI-1-resultaten kon alvast niet worden opgemaakt dat rt-PA ten opzichte van streptokinase leidde tot een verbetering van de ventriculaire hartfunctie op het ogenblik dat de patiënten het ziekenhuis verlieten. Er zijn minstens twee mogelijke verklaringen waarom rt-PA voor dit eindpunt in deze studie niet superieur was tegenover streptokinase. Ofwel had onmiddellijke reperfusie veel minder invloed op de uiteindelijke hartfunctie en de overleving van de patiënt, ofwel was het opzet van deze eerste TIMI-studie te kleinschalig om een eventueel verschil voor meer klinisch relevante eindpunten aan te tonen. Beide hypothesen zouden intensief worden uitgetest in de jaren die volgden.

Ethisch debat rond placebo

In de VS ontspoon zich in de schoot van de NIH een ethisch debat over de wenselijkheid van het verder uitvoeren van klinische trombolysiestudies met een placebogroep. Er waren aanvankelijk wel plannen om in TIMI-2, de opvolger van TIMI-1, met een placebogroep te werken, maar dat stuitte op verzet van enkele onderzoekers, ethici en NIH-verantwoordelijken.¹⁰¹ Volgens hen waren er voldoende aanwijzingen dat met name streptokinase zijn superioriteit ten opzichte van placebo had bewezen, zelfs als het intraveneus werd toegediend. Zij verwezen onder meer naar een meta-analyse van NIH-onderzoeker Salim Yusuf die alle klinische studies over intraveneus toegediend streptokinase ten opzichte van placebo van de voorbije 25 jaar had samengebracht en tot de conclusie kwam dat het geneesmiddel leidde tot 22% minder sterfgevallen in vergelijking met placebo.¹⁰²

¹⁰¹ Brody BA. Ethical issues in drug testing, approval, and pricing. The clot dissolving drugs. Oxford University Press, 1995, 33.

¹⁰² Yusuf S, Collins R, Peto R, Furberg C, Stampfer MJ, Goldhaber SZ, Hennekens CH. Intravenous and intracoronary fibrinolytic therapy in acute myocardial infarction: overview of results on mortality, reinfarction and side-effects from 33 randomized controlled trials. Eur Heart J. 1985; 6: 556-85.

Statistisch significant maar ook klinisch relevant?

Dat inzicht werd in 1986 en 1987 overduidelijk bevestigd door enkele grote trombolysiestudies waarin mortaliteit en herstel van hartfunctie de centrale eindpunten vormden. Het gaat in hoofdzaak om de Italiaanse GISSI-studie (*Gruppo Italiano per lo Studio della Streptochinasi nell'infarto Miocardico*)^{103 104 105} waaraan 12 000 patiënten deelnamen en de ISIS-2-studie (*Second International Study of Infarct Survival*)^{106 107} met 20 000 patiënten.

Een nieuwe reeks rt-PA-studies

Men kon redelijkerwijs aannemen dat rt-PA het minstens even goed zou doen als intraveneus streptokinase op het vlak van mortaliteit. Die aanname werd tussen mei 1986 en november 1987 hard gemaakt door het ESCG-consortium met een dubbelblind, gerandomiseerd, placebogecontroleerd onderzoek waarin de effectiviteit van rt-PA werd afgemeten aan de grootte van het infarct, het functioneel herstel van de hartfunctie en de overleving. Aan de studie namen naast het UZ Gasthuisberg in Leuven nog 25 andere klinische centra deel. De bedoeling was om patiënten binnen de vier uur na het optreden van de eerste symptomen intraveneus te behandelen met rt-PA (355 patiënten) of placebo (366 patiënten). Verder kregen alle patiënten ook 250 mg aspirine en 5000 eenheden heparine bij het begin van de procedure en de eerste dagen na de behandeling.

De mortaliteit na veertien dagen lag bij de rt-PA-groep op 10%, bij de placebogroep op 21%. Na drie maanden bedroeg het sterftecijfer respectievelijk 18% en 29%. rt-PA reduceerde met andere woorden het aantal sterfgevallen na drie maanden met 36%. Voor patiënten die sneller werden behandeld (minder dan drie uur na het optreden van de eerste symptomen) waren de verschillen nog opmerkelijker: na twee weken was in de rt-PA-groep 2% van de patiënten overleden, in de placebogroep 13%; na drie maanden respectievelijk 6% en 17%, een reductie met 59%. Ook voor de grootte van de infarctzone en het herstel van de hartfunctie scoorde rt-PA beter dan placebo, alleen ging rt-PA-behandeling gepaard met een frequenter optreden van hersenbloedingen (in 1,4% van de behandelde patiënten). Frans Van de Werf, de coördinator van het onderzoek, conclu-

¹⁰³ Effectiveness of intravenous thrombolytic treatment in acute myocardial infarction. Gruppo Italiano per lo Studio della Streptochinasi nell'Infarto Miocardico (GISSI). *Lancet* 1986; 1: 397-402.

¹⁰⁴ Long-term effects of intravenous thrombolysis in acute myocardial infarction: final report of the GISSI study. Gruppo Italiano per lo Studio della Streptochinasi nell'Infarto Miocardico (GISSI). *Lancet*. 1987; 2: 871-4.

¹⁰⁵ Rovelli F, De Vita C, Feruglio GA, Lotto A, Selvini A, Tognoni G. GISSI trial: early results and late follow-up. Gruppo Italiano per la Sperimentazione della Streptochinasi nell'Infarto Miocardico. *J Am Coll Cardiol*. 1987; 10: 33B-39B.

¹⁰⁶ Intravenous streptokinase given within 0-4 hours of onset of myocardial infarction reduced mortality in ISIS-2. *Lancet*. 1987; 1: 502.

¹⁰⁷ Randomised trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or either among 17,187 cases of suspected acute myocardial infarction: ISIS-2. ISIS-2 (Second International Study of Infarct Survival) Collaborative Group. *Lancet*. 1988; 2: 349-60.

deerde in de *British Medical Journal*¹⁰⁸: “rt-PA gecombineerd met heparine en aspirine vermindert de grootte van de infarctzone, houdt de linker ventriculaire functie beter intact en reduceert complicaties en overlijden als gevolg van een hartaandoening ten koste van een licht toegenomen risico op complicaties door bloedingen.”

Die conclusies werden nog hetzelfde jaar bevestigd door de ASSET-studie (*Anglo-Scandinavian Study of Early Thrombolysis*) die in het Verenigd Koninkrijk, Noorwegen, Zweden en Denemarken liep. Aan deze ‘rt-PA versus placebo’-studie namen 5011 patiënten deel. Eén maand na de behandeling was in de rt-PA-groep 7,2% van de patiënten overleden, bij de placebogroep 9,8%. Alhoewel er meer complicaties optraden bij de rt-PA-groep (vooral bloedingen) wogen die volgens de onderzoekers niet op tegen het overduidelijke klinische voordeel van rt-PA.¹⁰⁹

Tegelijk met de ESCG- en de ASSET-studies liepen er in de VS en Australië nog drie kleinere placebogecontroleerde studies waarin niet zozeer de mortaliteit het belangrijkste eindpunt was, wel de pompfunctie van het hart. Die functie kan worden gekwantificeerd door de zogenaamde ‘ejectiefractie’: de hoeveelheid uitgedrukt bloed, uitgedrukt als percentage van de hoeveelheid bloed in het gevulde hart. Deze studies werden uitgevoerd door Alan Guerci van de *Johns Hopkins University*¹¹⁰, de TICO-groep (*Group for the Study of Thrombolysis in Acute Coronary Occlusion*)¹¹¹ en de *National Heart Foundation of Australia*.¹¹²

In het licht van de GISSI-data – die aantoonde dat intraveneus streptokinase veel doeltreffender was dan placebo – en op basis van interimanalyses van de studies zelf, werden de Guerci- en de TICO-studies voortijdig stopgezet. De onderzoekers vonden het niet meer ethisch verantwoord om patiënten met een hartaanval placebo te geven. In hun ogen was het klinisch voordeel van streptokinase en rt-PA overduidelijk bewezen. In de studie van de *National Heart Foundation of Australia* werd besloten om de patiënten die sneller dan twee uur na

¹⁰⁸ Van de Werf F, Arnold AE. Intravenous tissue plasminogen activator and size of infarct, left ventricular function, and survival in acute myocardial infarction. *BMJ*. 1988; 297: 1374-9.

¹⁰⁹ Wilcox RG, von der Lippe G, Olsson CG, Jensen G, Skene AM, Hampton JR. Trial of tissue plasminogen activator for mortality reduction in acute myocardial infarction. Anglo-Scandinavian Study of Early Thrombolysis (ASSET). *Lancet*. 1988; 2: 525-30.

¹¹⁰ Guerci AD et al. A randomized trial of intravenous tissue plasminogen activator for acute myocardial infarction with subsequent randomization to elective coronary angioplasty. *N Engl J Med*. 1987; 317: 1613-8.

¹¹¹ O'Rourke M et al. Limitation of myocardial infarction by early infusion of recombinant tissue-type plasminogen activator. *Circulation*. 1988; 77: 1311-5.

¹¹² Coronary thrombolysis and myocardial salvage by tissue plasminogen activator given up to 4 hours after onset of myocardial infarction. National Heart Foundation of Australia Coronary Thrombolysis Group. *Lancet*. 1988; 1: 203-8. Erratum in: *Lancet* 1988; 2: 519.

Statistisch significant maar ook klinisch relevant?

het optreden van de klachten behandeld konden worden, niet langer toe te wijzen aan de placeboarm. Men zou hen onmiddellijk met rt-PA behandelen. Alleen patiënten die pas na twee tot vier uur konden behandeld worden, zouden nog gerandomiseerd worden.

80, 100 of 150 mg – terug naar TIMI

De TIMI-groep zou uiteindelijk nooit een placebogecontroleerde studie uitvoeren met mortaliteit als eindpunt, noch met rt-PA, noch met streptokinase. In de periode augustus 1985 en tot maart 1986 bestudeerde de TIMI-groep wel een nieuwe vorm van rt-PA. *Genentech* had namelijk zijn productiemethode aangepast om in de toekomst grotere hoeveelheden rt-PA te kunnen produceren. Die omschakeling had er echter voor gezorgd dat de structuur van het eiwit was gewijzigd: in plaats van een ‘bicatenair’-eiwit (twee ketens) was het een ‘monocatenair’-eiwit (één keten) geworden. De oude vorm werd aan de artsen als vloeistof aangeboden, de nieuwe vorm als een gevriesdroogd poeder dat door de arts moest opgelost worden.

Uit pilootstudies¹¹³ bleek dat de nieuwe, monocatenaire vorm minder doeltreffend was. De dosis moest van 80 milligram worden opgetrokken tot minstens 100 milligram. Misschien was méér zelfs nóg beter en sommigen suggereerden zelfs een dosis tot 150 milligram. Bij het ingaan van de TIMI-2-studie werd dan ook deze dosis van 150 milligram gebruikt. Dit leidde echter tot een onaanvaardbaar hoog aantal hersenbloedingen, zodat nog tijdens de studie de dosis werd verminderd tot 100 milligram. De TIMI-2-studie zou uiteindelijk nagaan in hoeverre het gecombineerde gebruik van trombolysen en coronaire angioplastie (het opensperren van de verstopte coronaire slagader) en het toedienen van bètablokkers na de behandeling tot betere klinische resultaten leidde.¹¹⁴

Het hierboven geschetste conglomeraat van parallelle en opeenvolgende klinische studies zou in 1987 resulteren in de goedkeuring van rt-PA als trombolytisch geneesmiddel door de FDA. Maar die erkenning zou er niet zonder slag of stoot komen.

¹¹³ Mueller HS, Rao AK, Forman SA. Thrombolysis in myocardial infarction (TIMI): comparative studies of coronary reperfusion and systemic fibrinogenolysis with two forms of recombinant tissue-type plasminogen activator. *J Am Coll Cardiol.* 1987; 10: 479-90.

¹¹⁴ Immediate vs delayed catheterization and angioplasty following thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. TIMI II A results. The TIMI Research Group. *JAMA.* 1988; 260: 2849-58.

1987, het jaar van de goedkeuring van rt-PA door de FDA

Het hoofddoel van klinische studies is op een gestandaardiseerde en wetenschappelijk gefundeerde manier na te gaan in hoeverre een nieuwe klinische praktijk – een nieuwe behandeling, een nieuw geneesmiddel, een alternatieve chirurgische ingreep enzovoort – beter is en minder nevenwerkingen heeft dan de beste bestaande praktijk. Als mogelijke patiënten vinden we het natuurlijk vanzelfsprekend dat een nieuw geneesmiddel grondig wordt getest alvorens het op de markt komt. Het is de overheid die daarover moet waken. In de Verenigde Staten is die overheidstoezichthouder de FDA (*Food and Drug Administration*), in Europa is dat vandaag in hoofdzaak het EMEA (*European Medicines Evaluation Agency*).

Vrijdag 29 mei 1987

Vooraleer rt-PA op de Amerikaanse markt kon komen, moest het dan ook een goedkeuring krijgen van de FDA. Een dergelijk proces verloopt in diverse stappen: de fabrikant dient een dossier in en dat dossier loopt via één of meerdere raadgevende commissies van (onafhankelijke) experts totdat uiteindelijk de FDA-staf een beslissing neemt over een mogelijke goedkeuring.

Zowel het dossier voor intraveneus toegediend streptokinase als voor rt-PA zouden eerst voor de *Cardio-Renal Advisory Committee* van de FDA moeten passeren. Het *Committee* zou op 29 mei 1987 samenkomen om in de ochtend eerst het intraveneus streptokinasedossier te bespreken en in de namiddag het rt-PA-dossier. Een overvolle dag, dat was al duidelijk vanaf het begin. De dag zou overigens zoveel commotie veroorzaken dat geen enkele betrokkene hem ooit nog zou vergeten. Ik was samen met een horde journalisten als toeschouwer aanwezig op deze voor het publiek toegankelijke zitting, die doorging in een overvol auditorium in Bethesda (MD), waar de FDA gevestigd is.

Ethicus Baruch Brody geeft in zijn boek *‘Ethical Issues in Drug Testing, Approval and Pricing, the Clot-dissolving drugs’*¹¹⁵ uitgebreid weer wat er die dag allemaal gebeurde op basis van de notulen van de vergadering en getuigenissen van de deelnemers. Samengevat komt het er op neer dat de ochtendsessie vrij vlot verliep en dat het raadgevend comité zonder verdere vragen het licht op groen zette voor intraveneus streptokinase als trombolytisch geneesmiddel tegen acuut hartinfarct (streptokinase coronair toegediend was al eerder goedgekeurd).

¹¹⁵ Brody BA. Ethical issues in drug testing, approval, and pricing. The clot dissolving drugs. Oxford University Press, 1995; 46-54.

De namiddagssessie verliep chaotischer en het comité zou bijkomend onderzoek opleggen aan *Genentech*. Het hield een onmiddellijk vervolg van de goedkeuringsprocedure voor rt-PA tegen. Dit besluit sloeg in als een bom, niet alleen bij de werknemers van *Genentech*; iedereen die van nabij rt-PA kende – ook de cardiologen die ermee gewerkt hadden – waren verrast. Zij waren er immers van overtuigd dat rt-PA minstens even goed, en vermoedelijk zelfs beter was dan streptokinase. Het besluit van het *Cardio-Renal Advisory Committee* zou duizenden levens kunnen kosten, meenden ze. Tot die bevinding kwam Eugene Braunwald, de cardioloog die de TIMI-trials leidde, al tijdens de meeting van 29 mei zelf. Hij maakte tegen de leden van het *Committee* de opmerking: “Ik denk dat u voorzichtig moet zijn dat u hier geen geneesmiddel afwijst dat twee keer zo effectief is als hetgene dat u enkele uren geleden heeft goedgekeurd”¹¹⁶, verwijzend naar streptokinase.

Ook in de pers was er veel onbegrip voor de beslissing van het *Cardio-Renal Advisory Committee*. In een editoriaal in de *Wall Street Journal* werden de leden van het *Committee* en de FDA als instituut zwaar op de korrel genomen. Het editoriaal eindigde met de open vraag “Zullen Amerikaanse artsen mensen laten sterven ter wille van de chi-square tests van het bureau voor geneesmiddelen?”¹¹⁷

Maar ook in de wetenschappelijke pers kwam er kritiek. Daniel E. Koshland, de editor van *Science* nam evenmin een blad voor de mond: “Als een clown in het circus struikelt en op zijn gezicht valt, wordt er gelachen. Als een regelgevend agentschap struikelt over een veelbelovend geneesmiddel tegen hartaanvallen, staat het niet alleen voor joker, het heeft ook bloed aan de handen. Complexe problemen, die op een simplistische manier worden behandeld, doen goede bedoelingen al snel lijken op administratief geknoei. De recente beslissing door de FDA, of het gebrek aan beslissing, in de controverseronde rond t-PA is in deze optiek een opmerkelijke zaak.”¹¹⁸

Een genuanceerde weergave van de feiten

Achteraf, goed twintig jaar later, valt er misschien met wat meer nuancering terug te kijken op die woelige dagen in mei 1987. Voorzeker heeft de FDA enkele fouten gemaakt. Maar ook *Genentech* en de onderzoekers van het *National Heart, Lung and Blood Institute* (NHLBI), onderdeel van de NIH, maakten die dag geen al te beste beurt.

¹¹⁶ “I think you have to be very careful that you are not rejecting a drug that is twice as effective as a drug that you approved a few hours ago”, in Brody BA. Ethical issues in drug testing, approval, and pricing. The clot dissolving drugs. Oxford University Press, 1995, 46.

¹¹⁷ “Are American doctors going to let people die to satisfy the bureau of drug’s chi-square studies?”, in “Human Sacrifices”, *Wall Street Journal*, June 2, 1987.

¹¹⁸ “When a circus clown steps on his toes and falls on his face, it is a cause for laughter. When a regulatory agency that licences drugs for heart attacks stumbles, it may have not only egg on its face but blood on its hands. Complex questions seen in an oversimplified way, however, can make good intentions look like bureaucratic bungling. The recent decision by the Food and Drug Administration (FDA), or lack thereof, in the tissue plasminogen activator (TPA) controversy, is an interesting case in point.”, Koshland DE. TPA and PDQ. *Science*. 1987; 237: 341.

Misschien is het goed om even de context te schetsen. In de eerste plaats beschikten de leden van het adviescomité nog lang niet over de resultaten van alle klinische studies die in vorig hoofdstuk aan bod kwamen. Zeker niet over de ECSG- en de ASSET-studies waarin rt-PA werd geëvalueerd tegenover placebo voor mortaliteit en andere klinisch relevante eindpunten. De resultaten van de GISSI-trial waarin streptokinase werd vergeleken met placebo met mortaliteit als belangrijkste eindpunt, waren wel beschikbaar.

Samengevat waren voor rt-PA de belangrijkste gegevens voor effectiviteit gebaseerd op de studies waarbij herstel van bloeddorstrooming werd nagegaan (bvb. de eerste TIMI-studie). Bijkomende bron van verwarring voor rt-PA was de aan de gang zijnde TIMI-2 studie. Die was gestart met een rt-PA-dosis van 150 milligram die gewijzigd werd naar 100 milligram omwille van de hoge frequentie van hersenbloedingen. De commissieleden waren wel op de hoogte van de nevenwerking van de 150 milligram dosis, maar tastten in het duister of de 100 milligram dosis van de ‘enkele keten’-vorm even doeltreffend en veilig was als de 80 milligram vorm van de ‘dubbele keten’-vorm die in alle voorgaande studies was gebruikt.

Op basis van al die onzekerheden zette het adviescomité dan ook de verdere goedkeuring van rt-PA in de wachtkamer met volgende drie argumenten¹¹⁹:

- Er is onvoldoende bewijs om de doeltreffendheid van de voorgestelde dosis van 100 milligram te ondersteunen, tenminste wanneer naar andere parameters dan trombolysen en bloeddorstrooming wordt gekeken. Voor toekomstige studies zou verbetering van ventriculaire functie als voldoende worden geacht. Mortaliteitsstudies worden niet opgelegd.
- Er is bezorgdheid over het voorkomen van hersenbloedingen. Een onacceptabel hoge incidentie van bloedingen had plaatsgevonden bij de dosis van 150 milligram rt-PA in de TIMI-2-studie. Het comité had graag beschikt over de cijfers van de bijwerking bij de 100 milligram dosis.
- Het geheel van de gepresenteerde gegevens is moeilijk te interpreteren omdat *Genentech* zowel de vorm waaronder het geneesmiddel werd aangeboden (dubbele keten in vloeibare vorm naar enkelvoudige keten in poedervorm), als de dosis (80, 100 en 150 milligram) had gewijzigd in de loop van cruciale klinische studies.

¹¹⁹ Kowey PR, Fisher L, Giardina EG, Leier CV, Lowenthal DT, Messerli FH, Pratt CM. The TPA controversy and the drug approval process. The view of the Cardiovascular and Renal Drugs Advisory Committee. JAMA. 1988; 260: 2250-2.

Een samenloop van onduidelijkheden

Genentech voelde zich met deze afloop verongelijkt. Voor een deel terecht want een andere divisie van de FDA, de *Biologics Division*, had in eerdere contacten met *Genentech* laten uitschijnen dat doeltreffendheid van rt-PA op basis van snelheid van herstel van bloeddorstrooming voldoende zou zijn voor een erkenning. De onverwachte switch die het *Cardio-Renal Advisory Committee* maakte door ook andere dan reperfusie-eindpunten te vragen, was voor *Genentech* een verrassing. Daarbij voelde *Genentech* zich gevangen tussen twee Amerikaanse overheidsinstituten: de NHLBI-NIH die ethische bezwaren had tegen het uitvoeren van placebogecontroleerde studies met als eindpunt mortaliteit of ventriculaire functie en de FDA die precies dit soort resultaten vroeg vooraleer het rt-PA wilde goedkeuren. Tot slot had de FDA op één en dezelfde dag – en bovenal een vrijdag dan nog – nooit én streptokinase én rt-PA mogen bespreken. Dat was op die dag zelf al duidelijk, want tijdens de bespreking van rt-PA zouden steeds meer leden van het overlegcomité de vergadering verlaten omdat ze nog een vliegtuig moesten halen. De hele procedure verliep dan ook in een chaotische sfeer die een goede besluitvorming zeker niet ten goede kwam.¹²⁰

Maar ook *Genentech* en de NIH gingen niet vrijuit. Zij waren vertegenwoordigd door respectievelijk Elliott Grossbard en Eugene Braunwald. Grossbard zou tijdens zijn presentatie wel resultaten geven van de door *Genentech* gesponsorde placebogecontroleerde studie van Guerci (de studie die aan de *Johns Hopkins University* had plaatsgevonden en vroegtijdig was afgebroken omwille van de positieve GISSI-resultaten), maar de comitéleden hadden deze studie niet lang genoeg op voorhand ontvangen en daarom werden de resultaten niet door alle leden even zinvol geïnterpreteerd.

Bovendien voelden Grossbard en Braunwald zich geremd om gegevens vrij te geven over de TIMI-2-studie over de neveneffecten van rt-PA bij een dosis van 100 milligram. Er was immers een afspraak met de NIH dat niet gepubliceerde gegevens van de TIMI-2-studie, ook al waren ze intern beschikbaar, niet zouden vrijgegeven worden, ook niet aan het adviescomité van de FDA. Zonder twijfel een hoogst merkwaardige beslissing want het betekent dat het ene Amerikaanse overheidsinstituut beschikt over gegevens die het niet wil uitwisselen met een ander Amerikaans overheidsinstituut waardoor honderden, misschien wel duizenden mensenlevens in gevaar worden gebracht. Vreemd toch.

¹²⁰ Brody BA. Ethical issues in drug testing, approval, and pricing. The clot dissolving drugs. Oxford University Press, 1995, 53.

Eind goed, al goed?

Uiteindelijk gingen in de daaropvolgende maanden *Genentech* en de FDA intensief samenwerken. Puttend uit de talrijke lopende studies zou *Genentech* de FDA weten te overtuigen dat rt-PA een prima trombolytisch geneesmiddel is en dat, toegediend in de gepaste dosis van 100 milligram, de bijwerkingen acceptabel zijn. De finale goedkeuring van rt-PA vond plaats op 13 november 1987. Diane Pennica herninnerde zich hierbij dat Genentech een grootse viering had opgezet met vuurwerk over de baai van South San Francisco.¹²¹ Ondertussen draaide de productie van rt-PA bij *Genentech* op volle toeren en onmiddellijk na de goedkeuring werd het volledige marketing- en verkoopdepartement ingezet om rt-PA aan de man te brengen. ‘Activase’ werd de merknaam waarmee *Genentech* rt-PA op de markt bracht. De verwachtingen waren hoog gespannen: de nieuwe ‘clot buster’ moest naar financiële maatstaven een ‘block buster’ worden.

In een tijdsspanne van 7 weken (tot eind 1987) verkocht Genentech voor \$58 miljoen Activase zodat Bob Swanson, de CEO van *Genentech* begin 1988 fier aan analisten verkondigde dat Activase “het meest succesvolle nieuwe geneesmiddel is dat ooit werd gelanceerd.”

¹²¹ Pennica D. An anthology of scientific collaborations compiled at the occasion of the 65th birthday of Désiré Collen, Leuven 2008: 81-3.

Even goed of beter, maar alleszins duurder

Met de goedkeuring van zowel streptokinase als rt-PA door de FDA stond het cardiologen vrij te kiezen welk trombolytisch geneesmiddel ze wilden gebruiken. Uit drie studies uit 1988 blijkt dat meer dan 90% van de geënquêteerde Amerikaanse ziekenhuizen een of andere trombolytische therapie toepaste, maar slechts bij 12% tot 17% van de patiënten die met een hartinfarct werden opgenomen.¹²² ¹²³ Als belangrijkste reden werd aangehaald dat heel wat patiënten niet in aanmerking kwamen omdat ze later dan zes uur na het optreden van de eerste symptomen in het ziekenhuis konden behandeld worden. Men nam algemeen aan dat in die omstandigheden trombolyse nog weinig zin had omdat het bedreigde hartweefsel dan al was afgestorven.

Opvallend was ook dat in meer dan de helft van de ziekenhuizen resoluut voor rt-PA werd gekozen, slechts in 19% tot 39% (afhankelijk van de studies) uitsluitend voor streptokinase, in 4% tot 25% werd er afgewisseld. Dat in 1988 cardiologen toch in meerderheid rt-PA verkozen, mag verrassend heten omdat rt-PA zowat tien keer duurder was dan streptokinase. Voor een trombolytische behandeling met 100 mg rt-PA rekende *Genentech* immers \$2 200, terwijl een behandelingsdosis streptokinase zowat \$200 kostte. Dit prijsverschil was dan ook aanleiding tot heel wat discussie.

Dichotomie privaat-publiek

Artsen die kozen voor rt-PA geloofden dat de hogere kostprijs verantwoord was omdat rt-PA sneller en doeltreffender was in het oplossen van verstoppende bloedstolsels (zie o.a. de eerste TIMI-studie) en het een lagere impact had op de normale stollingscapaciteit van het bloed zodat er minder bloedingen optraden. Cardiologen die daarentegen resoluut kozen voor streptokinase meenden dat de superioriteit van rt-PA helemaal niet bewezen was en gingen dus voor het goedkoopste geneesmiddel.

Er was een merkbaar verschil tussen artsen die in private en publieke ziekenhuizen werkten. Bij de eerste groep had 65% een voorkeur voor rt-PA, bij de tweede varieerde dit van 31% (in *federal public hospitals*) tot 53% (in *nonfederal public hospitals*). Dat verschil is in hoofdzaak toe te schrijven aan het specifieke financieringssysteem van de Amerikaanse gezondheidszorg. Amerikaanse ziekenhuizen worden vergoed door externe ziekteverzekeraars voor hun prestaties. Dat kun-

¹²² Grasela TH Jr, Green JA. A nationwide survey of prescribing patterns for thrombolytic drugs in acute myocardial infarction. *Pharmacotherapy*. 1990; 10: 35-41.

¹²³ Brody B, Wray N, Bame S, Ashton C, Petersen N, Harward M. The impact of economic considerations on clinical decisionmaking: the case of thrombolytic therapy. *Med Care*. 1991; 29: 899-910.

Even goed of beter, maar alleszins duurder

nen private verzekeraars zijn, maar voor Amerikanen ouder dan 65 bestaat er bijvoorbeeld Medicare, Amerika's grootste gezondheidsverzekeringprogramma waaronder ruim 40 miljoen Amerikanen vallen.

De duurdere private verzekeraars zijn eerder geneigd om innovatieve behandelingen voor hun klanten terug te betalen, zij zien het immers als een competitief verkoopsargument. Organisaties als Medicare zijn eerder restrictief in het terugbetalen van dure behandelingen. Zeker sinds de nieuwe vorm van terugbetaling die in 1983 werd ingevoerd en waarbij een ziekenhuis slechts een bepaald standaardbedrag krijgt voor de behandeling van een patiënt. In 1988 ontving een Amerikaans ziekenhuis tussen \$3 579 en \$4 200 om een Medicare-patiënt met een niet-gecompliceerd hartinfarct te behandelen en tussen \$5 449 en \$6 007 voor een patiënt met een hartinfarct waarbij complicaties optraden. De extra kostprijs van \$2 200 voor rt-PA zou door het ziekenhuis moeten gedragen worden omdat Medicare geen extra vergoeding toekent voor de cardiologische diensten die voor rt-PA kiezen in plaats van streptokinase. rt-PA betekende dus een significante meerkost op het ziekenhuisbudget indien het aan een Medicare-patiënt werd toegediend.¹²⁴

Kip met de gouden eieren?

Genentech had echter zwaar ingezet op rt-PA. Het moest en zou een gigantisch verkoopsucces worden. Begin 1988 blokkeerde het tijdschrift *Fortune* nog dat 'Genentech de kip met de gouden eieren in huis had'.¹²⁵ Volgens *Fortune* zou met rt-PA een nieuw tijdperk beginnen voor de behandeling van hartaandoeningen, de nummer 1-killer in de geïndustrialiseerde wereld. Beursspecialisten die het aandeel *Genentech* volgden voorspelden in *Fortune* dat de verkoop van rt-PA nog in 1988 zou oplopen tot \$350 miljoen en het jaar nadien tot \$600 miljoen om daarmee een van de meest succesvolle geneesmiddelen ooit te worden. In hetzelfde artikel werd *Genentech* een gouden toekomst voorspeld: in 1987 bedroeg de totale omzet nog \$231 miljoen en de winst \$42 miljoen; in 1988 zouden die stijgen tot respectievelijk \$500 miljoen en \$130 miljoen; in 1989 zou *Genentech* het plafond van de \$1 miljard omzet halen en daarmee het snelst groeiende bedrijf in de VS worden, nog steeds volgens de glazen bol van *Fortune*.

¹²⁴ Brody BA. Ethical issues in drug testing, approval, and pricing. The clot dissolving drugs. Oxford University Press, 1995, 55-58.

¹²⁵ Bylinsky G. *Genentech* has a golden goose. The blood-clot-busting drug t-PA is throwing off profits that will underwrite a host of new products. Watch for the company to join the big boys in pharmaceuticals. *Fortune*. 9 mei 1988. http://money.cnn.com/magazines/fortune/fortune_archive/1988/05/09/70518/index.htm

Het pakte echter anders uit. In het najaar van 1988 kopte de *Wall Street Journal* dat *Genentech* de productie van rt-PA tijdelijk stillegde omdat de verkoop afbrokkelde en er te veel stock was opgebouwd.¹²⁶ In september was de verkoop van rt-PA gedaald tot een dramatische \$11,2 miljoen, terwijl het in augustus nog \$13 miljoen bedroeg en juli \$15 miljoen. Terwijl de trend stijgend had moeten zijn, daalde de verkoop. De jaarverkoop zou wellicht uitkomen tussen de \$175 en \$180 miljoen in plaats van de voorspelde \$350 tot \$400 miljoen. Het werd steeds duidelijker dat de ‘gouden eieren’ van de rt-PA-kip nog niet voor onmiddellijk waren en dat *Genentech*, wilde het van rt-PA het marktsucces maken dat het verwachtte, kost wat kost moest bewijzen dat rt-PA superieur was ten opzichte van streptokinase, of ... het moest zijn prijzenpolitiek aanpassen en rt-PA goedkoper maken.

Op weg naar een ‘head-to-head’

De controverse over streptokinase versus rt-PA bleef tussen 1987 en 1990 voorpaginanieuws in de wetenschappelijke pers.¹²⁷ In een review in de *Annals of Internal Medicine*¹²⁸ sloot ik me aan bij het idee om vergelijkende studies op te zetten tussen rt-PA en streptokinase. Al was ik er zelf van overtuigd dat rt-PA een beter geneesmiddel was. In de review baseerde ik me op de op dat ogenblik gekende literatuurgegevens over de behandeling van acuut hartinfarct met streptokinase en rt-PA. Zeker als rt-PA heel vroeg na het optreden van de eerste symptomen kon toegediend worden, had het een hoger trombolytisch vermogen. Uit tal van experimentele en klinische studies, zowel grote als kleine, was voor mij immers duidelijk dat het klinisch voordeel van trombolyse wordt bepaald door het snelle herstel van de bloeddorstrooming in de verstopte coronaire slagader. Of de grotere doeltreffendheid van rt-PA onomstotelijk resulteert in een beter herstel van de hartfunctie en een lager sterftcijfer, zou evenwel moeten blijken uit prospectieve vergelijkende klinische studies waarin streptokinase en rt-PA rechtstreeks met elkaar worden vergeleken, kop tegen kop.

Anderzijds was ik een prijsvermindering van rt-PA zeker genegen. Gedurende de hele periode dat het geneesmiddel onder patent werd verkocht, heb ik het jammer gevonden dat rt-PA in feite het tromboliticum van de rijken, de beter goeden, is gebleven. rt-PA werd omwille van die hoge kostprijs voorbehouden voor geïndustrialiseerde landen als de VS, Canada, West-Europa en Japan. Voor het overgrote deel van de Oost-Europeanen, Zuid-Amerikanen, Aziaten en Afri-

¹²⁶ Chase M. *Genentech* halts TPA production for rest of '88. *Wall Street Journal*. 14 oktober 1988. <http://aidsinfobbs.org/articles/wallstj/88/335.txt>

¹²⁷ Marx J.L. Which clot-dissolving drug is best? *Science*. 1988; 242: 1505-6.

¹²⁸ Collen D. Coronary thrombolysis: streptokinase or recombinant tissue-type plasminogen activator? *Ann Intern Med*. 1990; 112: 529-38.

Even goed of beter, maar alleszins duurder

kanen is het geneesmiddel nooit beschikbaar geweest. Zelf zou ik in ons lab zwaar investeren in een plasminogeenactivator voor de 'armen'. Maar dat is een ander verhaal verderop in dit boek.

Kapers op de kust, rt-PA getest in de rechtszaal

rt-PA kreeg niet alleen af te rekenen met streptokinase als concurrerend trombolytisch geneesmiddel, maar ook met zichzelf. Andere bedrijven wilden immers hun variant van rt-PA op de markt brengen. LR&D en *Genentech* hadden echter hun rechten op t-PA en rt-PA in de VS beschermd door drie octrooien. Het eerste (U.S. Patent 4,752,603 toegekend op 21 juni 1988) was een “continuation in part” van het allereerste octrooi dat LR&D had ingediend in Nederland en met als uitvinders Désiré Collen, Dick Rijken en Osamu Matsuo (bijlage 3). Verder waren er nog twee octrooien op rt-PA die *Genentech* had ingediend – de zogenaamde ‘Goeddel-patenten’ (U.S. Patent 4,766,075 toegekend op 23 augustus 1988 en U.S. Patent 4,853,330 toegekend op 1 augustus 1989). Beide waren ingediend in 1982. Het valt op dat tussen indiening en toekenning meer dan zes jaar zijn verlopen. Een zoveelste voorbeeld van de traagheid van sommige Amerikaanse administratieve molens, zeker de molen van het *American Patent Office*.

Voor de volksjury

Op basis van deze patenten spande *Genentech* in 1988 een rechtszaak in tegen *Genetics Institute* en *Burroughs-Wellcome*, de Amerikaanse dochter van de Britse *Wellcome Foundation*. Volgens *Genentech* vormden de plannen van beide bedrijven om hun versie van rt-PA op de markt te brengen een inbreuk op de bescherming die *Genentech* genoot via onze en haar patenten.

Als tegenargument redeneerden de tegenpartijen dat hun versie van rt-PA niet helemaal dezelfde was als die van *Genentech*. Er waren immers enkele DNA-basen verschil tussen de t-PA-genen die zij gebruikten ten opzichte van de Bowes cDNA-kloon waaruit *Genentech* zijn rt-PA-eiwit produceerde. Bovendien gingen de tegenpartijen ook resoluut in de aanval: *Genentech* werd gedagvaard met een claim dat het op een frauduleuze manier de t-PA-markt, en de markt voor trombolytische geneesmiddelen in het algemeen, wilde monopoliseren. De zaak zou beslecht worden voor een rechtbank in Wilmington in de Amerikaanse staat Delaware. In deze staat was de hoofdzetel van *Genentech* geregistreerd.

In maart 1990 besloot de rechter van de *District Court* van de staat Delaware dat *Genetics Institute* en *Burroughs-Wellcome* alleszins niet naar de ‘letter van de wet’ een inbreuk hadden gepleegd op de octrooien van *Genentech* omdat de sequentie tussen de diverse rt-PA-kloons op enkele plaatsen verschilde. De rechter liet het aan een volksjury over om te beslissen of er een inbreuk was. De vraag die hij daarbij stelde was of de diverse rt-PA’s ‘equivalent’ waren in de zin dat ze ‘hetzelfde doen’, globaal gezien ‘tot hetzelfde resultaat komen’ en op ‘dezelfde manier volgens hetzelfde mechanisme werken’. Deze vraag naar ‘equivalentie’ gaat meteen naar de kern van de bescherming die door het octrooirecht wordt gebo-

den en die centraal staat in heel wat rechtszaken met als inzet biotechnologische producten. De rt-PA-zaak was met andere woorden een belangrijke testcase voor tal van latere biotechnologische disputen.

Drie weken in Wilmington

Omdat ik een belangrijke kroongetuige was, moest ook ik voor de rechtbank verschijnen. Drie weken lang woonde ik het proces bij dat in goede banen werd geleid door rechter Joseph J. Farnan. Ik moest, samen met nog een paar ‘*testimonial witnesses*’ van de drie partijen, onder andere aan Joe de loodgieter en Sue de schooljuf – leden van de jury – uitleggen wat biotechnologie was, hoe we t-PA uit de Bowes-cel lijn hadden geïsoleerd, wat trombolysis is enzovoort.

Meermaals trachtten de advocaten van de tegenpartij om mij en mijn lab in diskrediet te brengen. We werden er zelfs bijna van beschuldigd op een frauduleuze manier t-PA te hebben afgezonderd uit de Bowes-cel lijn. Een aantal van mijn (gewezen) medewerkers en ikzelf werden vooraf zwaar aan de tand gevoeld door de advocaten van Burroughs-Wellcome. Onder andere Dick Rijken, maar ook Ghislain Opdenakker en Guido Volckaert van het Rega Instituut moesten beëdigde verklaringen afleggen. Labnota’s werden doorgelicht en alle abstracts en papers over t-PA werden van naald tot draad uitgeplozen op zoek naar een foutje. Het hele rechtsgedoe leverde een dossier op groter dan het laadvermogen van een vrachtwagen en meer dan 3 000 pagina’s aan transcripten van het proces.

Over de hele lijn

Op 6 april 1990 sprak de jury zich uit ten voordele van *Genentech* (zie bijlage 7).¹²⁹ De jury vond dat de licht gewijzigde t-PA-genen en de resulterende rt-PA-eiwitten van *Burroughs-Wellcome* en *Genetics Institute* equivalent waren met de producten die beschermd werden door de patenten van LR&D en *Genentech*. *Genentech* en LR&D ontvingen evenwel geen schadevergoeding, vermoedelijk omdat het rt-PA van de tegenpartijen nog niet op de markt was. Verder vond de jury geen aanwijzing dat *Genentech* de markt op een ongeoorloofde manier monopoliseerde. Het werd met andere woorden een overwinning over heel de lijn voor ons en *Genentech*.

Burroughs-Wellcome kondigde enkele weken later aan dat ze de verdere ontwikkeling van hun rt-PA stopzette.

¹²⁹ United States District Court for the District of Delaware, Judgment in a civil case, Case number CA 88-330/89-407 JJF, 6 april 1990.

Grote crisis

Tussen 1988 en 1990 werd trombolytische reperfusetherapie volwassen. Steeds meer cardiologische centra behandelden hun hartinfarctpatiënten met een trombolytisch geneesmiddel. De medische en wetenschappelijke literatuur pulde in die periode uit van de artikels over trombolyse. Er kwam zelfs een derde geneesmiddel, APSAC (*anisoylated plasminogen streptokinase activator complex*), op de markt in concurrentie met rt-PA en streptokinase.

De nadruk kwam ook steeds meer te liggen op de snelheid van behandelen. De eerste schuchtere klinische richtlijnen werden opgesteld zodat gepaste therapie bij aankomst van de patiënt zo snel mogelijk kon opgestart worden.^{130 131} Er werden bovendien studies uitgevoerd, o.a. de MITI-trials, die nagingen in hoeverre het toedienen van een trombolytisch geneesmiddel in de ziekenwagen tot snellere reperfusie en minder hartletsel leidde.¹³²

Maar dé hamvraag, welk geneesmiddel leidt tot de laagste mortaliteit, bleef nog steeds onbeantwoord.

De koude douche van GISSI-2

Een antwoord op die vraag moest komen van de GISSI-2-studie. Een onderzoek dat in 1988 was begonnen met de rekrutering van patiënten in Italië, en dat in oktober 1988 werd uitgebreid naar andere landen. Het aantal patiënten dat uiteindelijk in de GISSI-2 werd behandeld groeide uit tot 20 000. Het onderzoek werd grotendeels gefinancierd door *Boehringer Ingelheim*, het farmaceutisch bedrijf dat de Europese distributierechten voor rt-PA had gekocht van *Genentech*.

In de GISSI-2-studie werden patiënten gerandomiseerd en onderverdeeld in een streptokinase- of een rt-PA-groep, al of niet gecombineerd met heparine. Verder kregen alle patiënten bètablokkers en aspirine. In de uitgebreide studie met 20 000 patiënten was het belangrijkste eindpunt mortaliteit.

¹³⁰ Leizorovicz A, Boissel JP, Robert F. Coronary reperfusion rates in acute myocardial infarction patients after thrombolytic treatment with anistreplase: correlation with the delay from onset of symptoms to treatment: a review of 424 case records of patients admitted to coronary reperfusion studies with anistreplase. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1992; 19: 34-9.

¹³¹ Sharkey SW, Bruneete DD, Ruiz E, Hession WT, Wysham DG, Goldenberg IF, Hodges M. An analysis of time delays preceding thrombolysis for acute myocardial infarction. *JAMA.* 1989; 262: 3171-4.

¹³² Weaver WD, Cerqueira M, Hallstrom AP, Litwin PE, Martin JS, Kudenchuk PJ, Eisenberg M. Prehospital-initiated vs hospital-initiated thrombolytic therapy. The Myocardial Infarction Triage and Intervention Trial. *JAMA.* 1993; 270: 1211-6.

De resultaten werden in juli 1990 gepubliceerd in het tijdschrift de *Lancet*.^{133 134} De mortaliteit bij rt-PA lag op 8,9%, bij streptokinase op 8,5%. Streptokinase was geassocieerd met meer bloedingen, rt-PA met meer beroertes. De verschillen bleken evenwel statistisch niet significant.

Deze resultaten waren zonder meer een teleurstelling voor iedereen die geloofde in rt-PA. In de Amerikaanse media werd rt-PA ten grave gedragen, alsook de toekomst van *Genentech*. Geen enkele verzekeraar en geen enkele patiënt zou nog bereid zijn om \$2 000 extra te betalen voor een geneesmiddel dat geen betere klinische resultaten gaf dan het goedkope streptokinase, was de redenering. Zonder rt-PA was *Genentech* bovendien een lege doos, vonden sommigen.

Een complexe waarheid

De waarheid was echter complexer en genuanceerder. Uit kleinere studies was immers de indruk ontstaan dat het belangrijkste klinische voordeel van rt-PA – het snelle herstel van de bloeddorstrooming – enkel behouden bleef als tegelijkertijd, of kort na de opstart van de behandeling, heparine werd toegediend.¹³⁵¹³⁶ Heparine is een middel dat de vorming van nieuwe bloedstolsels tegengaat. Patiënten die rt-PA krijgen, blijken immers meer last te hebben van nieuwe verstoppingen op dezelfde plaats in de kransslagader (reocclusies) dan patiënten die streptokinase krijgen. Dat is biochemisch perfect verklaarbaar: rt-PA heeft een relatief korte halfwaardetijd en is dus sneller verdwenen uit het bloed waardoor een nieuwe trombose gemakkelijker optreedt. Bovendien tast rt-PA de normale mechanismen van de bloedstolling minder sterk aan dan streptokinase. De klinici die de studies uitvoerden, hadden dan ook sterk de indruk dat elk klinisch voordeel van rt-PA verloren ging als gevolg van het frequenter optreden van nieuwe occlusies. In een andere reeks tests werd aangetoond dat een versnelde toedie-

¹³³ GISSI-2: a factorial randomised trial of alteplase versus streptokinase and heparin versus no heparin among 12,490 patients with acute myocardial infarction. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico. *Lancet*. 1990; 336: 65-71.

¹³⁴ In-hospital mortality and clinical course of 20,891 patients with suspected acute myocardial infarction randomised between alteplase and streptokinase with or without heparin. The International Study Group. *Lancet*. 1990; 336: 71-5.

¹³⁵ Hsia J, Hamilton WP, Kleiman N, Roberts R, Chaitman BR, Ross AM. A comparison between heparin and low-dose aspirin as adjunctive therapy with tissue plasminogen activator for acute myocardial infarction. Heparin-Aspirin Reperfusion Trial (HART) Investigators. *N Engl J Med*. 1990; 323: 1433-7.

¹³⁶ Bleich SD, Nichols TC, Schumacher RR, Cooke DH, Tate DA, Teichman SL. Effect of heparin on coronary arterial patency after thrombolysis with tissue plasminogen activator in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 1990; 66: 1412-7.

ning van de normale dosis van 100 mg rt-PA (in 90 minuten in plaats van drie uur, zoals conventioneel gebeurde) een snellere reperfusie tot gevolg had zonder dat de nevenwerkingen significant toenamen.^{137 138}

Tijdens de GISSI-2-studie waren deze gegevens nog niet bekend: heparine werd pas twaalf uur na de rt-PA-behandeling toegediend en men hanteerde het conventionele toedieningsprotocol. Onder deze omstandigheden was er dus geen voordeel voor rt-PA ten opzichte van streptokinase, maar GISSI-2 kon niet bewijzen of rt-PA in optimale omstandigheden toegediend, toch niet superieur was.

ISIS-3, een (fatale?) schep bovenop

In 1992 werden de resultaten van de ISIS-3-studie met 41 299 patiënten bekendgemaakt.¹³⁹ Daarin werd rt-PA vergeleken met streptokinase én met APSAC. De mortaliteit was 10,6% voor streptokinase, 10,5% voor APSAC en 10,3% voor rt-PA. Ook nu weer waren de verschillen niet statistisch significant, en hier kunnen dezelfde opmerkingen worden gemaakt: ondanks het grote aantal patiënten en het gebruik van mortaliteit als eindpunt zegt deze studie onvoldoende over de werkelijke klinische mogelijkheden van rt-PA. Heparine werd immers niet tijdig toegediend en het verouderde protocol van 100 mg rt-PA in drie uur werd gehanteerd. Bovendien doen de hoge mortaliteitscijfers – in vergelijking met andere studies zoals de GISSI-2 – vragen rijzen over het opzet en validiteit van de ISIS-3-studie.^{140 141}

De resultaten van de GISSI-2 en ISIS-3 waren natuurlijk voor *Genentech* slecht nieuws. rt-PA zou op deze manier de strijd om het absolute marktaandeel nooit kunnen winnen van streptokinase. Tenzij *Genentech* alles op alles zette en een laatste troefkaart uitspeelde ... de GUSTO.

¹³⁷ Carney RJ, et al. Randomized angiographic trial of recombinant tissue-type plasminogen activator (alteplase) in myocardial infarction. RAAMI Study Investigators. J Am Coll Cardiol. 1992; 20: 17-23.

¹³⁸ Cannon CP et al. Comparison of front-loaded recombinant tissue-type plasminogen activator, anistreplase and combination thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: results of the Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) 4 trial. J Am Coll Cardiol. 1994; 24: 1602-10.

¹³⁹ ISIS-3: a randomised comparison of streptokinase vs tissue plasminogen activator vs anistreplase and of aspirin plus heparin vs aspirin alone among 41,299 cases of suspected acute myocardial infarction. ISIS-3 (Third International Study of Infarct Survival) Collaborative Group. Lancet. 1992; 339: 753-70.

¹⁴⁰ Sobel BE, Collen D. After ISIS-3. Lancet. 1992; 339: 1225-6.

¹⁴¹ Sobel BE, Collen D. Questions unresolved by the Third International Study of Infarct Survival. Am J Cardiol. 1992; 70: 385-9.

De 1% van GUSTO

Het basisidee achter de GUSTO-studie (*Global Utilization of Streptokinase and TPA for Occluded Coronary Arteries*) was dat coronaire trombolysen een maximaal effect heeft op het hart en het leven van de patiënt als de coronaire verstopping snel en blijvend wordt weggenomen. De GUSTO-studie omvatte vier gerandomiseerde groepen van telkens 10 000 patiënten:

- groep 1 werd behandeld met streptokinase en subcutaan toegediend heparine;
- groep 2 met streptokinase en intraveneus heparine;
- groep 3 met een versnelde dosis rt-PA en intraveneus heparine toegediend nog tijdens de rt-PA behandeling;
- en groep 4 met een combinatie van streptokinase en rt-PA plus intraveneus heparine.

Het belangrijkste klinische eindpunt was mortaliteit na 30 dagen.

Megastudie

In het onderzoeksveld van de trombolysen wordt de GUSTO-1 nog altijd aanzien als de ‘moeder’ van de klinische trombolysenstudies. Er werden in totaal 41 021 patiënten opgenomen in de studie, afkomstig uit 1 081 ziekenhuizen uit vijftien landen: de VS (met 23 105 patiënten), Israël (2 944), Canada (2 898), Nederland (2 299), Australië (2 287), België (2 030), Duitsland (1 282), Frankrijk (1 239), het Verenigd Koninkrijk (1 050), Nieuw-Zeeland (666), Spanje (467), Polen (360), Zwitserland (209), Ierland (185) en Luxemburg (22).

De eerste patiënt werd behandeld op 27 december 1990, de laatste op 22 februari 1993. De studie stond onder leiding van cardioloog Eric Topol inmiddels verhuisd naar het *Cleveland Clinic Center* in Cleveland (VS). Hij had zoals eerder vermeld de eerste patiënt met rt-PA behandeld aan de *Johns Hopkins University*. In het *Steering Committee* zaten naast Topol nog 30 andere vooraanstaande cardiologen als vertegenwoordigers van de belangrijkste deelnemende centra.

De studie werd praktisch gecoördineerd door het *Duke University Medical Center* in de VS en de K.U.Leuven, respectievelijk Robert Califf en Frans Van de Werf fungeerden als klinische directeurs. De studie werd ook intensief begeleid door David Stump van *Genentech*. Daarnaast was er nog een *Data and Safety*

De 1% van GUSTO

Monitoring Board en een *Stroke Review Committee*. De sponsors van de studie waren de firma's *Bayer*, *CIBA-Corning*, *Genentech*, *ICI Pharmaceuticals* en *Sanofi Pharmaceuticals*.

Alle leden van de stuurgroep, de *Data and Safety Monitoring Board* en het *Stroke Review Committee* moesten schriftelijk verklaren dat noch zij, noch hun directe familieleden enig financieel belang hadden bij een van de sponserende organisaties onder de vorm van aandelen, uitbetalingen van honoraria voor consulentschappen, of reis- en onkostenvergoedingen ontvingen. Ook de *principal investigators* van alle deelnemende centra moesten verklaren dat ze geen aandelen bezaten in een van de betrokken bedrijven.

Naast de gewone GUSTO liep ook nog de GUSTO *Angiographic Study* die probeerde op een kwantitatieve manier na te gaan in hoeverre de snelheid van het herstel van de bloeddoorstroming ook aantoonbaar leidde tot een betere overleving van de patiënt. Deze studie vond plaats op een subgroep van 2 431 patiënten.

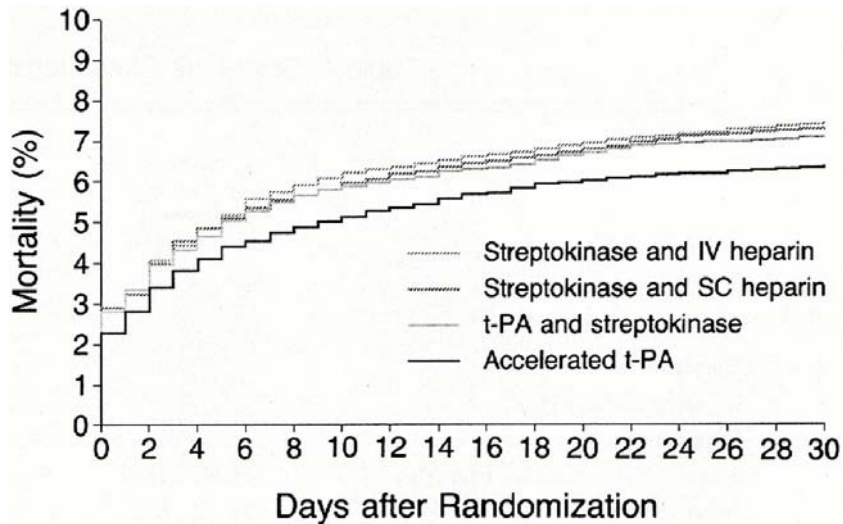
Resultaten samengebald

De resultaten van de GUSTO en de GUSTO *Angiographic Study* werden respectievelijk in september en november 1993 in *The New England Journal of Medicine* gepubliceerd¹⁴² ¹⁴³ en kunnen als volgt worden samengevat¹⁴⁴: de 30-dagenmortaliteit bedroeg 6,3% in de groep met de versnelde rt-PA-procedure met gelijktijdige toediening van heparine (groep 3); 7,2% in de streptokinasegroep met subcutaan heparine (groep 1); 7,4% in de streptokinasegroep met intraveneus heparine (groep 2) en 7,0% in de gecombineerde rt-PA / streptokinasegroep (groep 4). De mortaliteit in de rt-PA-groep is met andere woorden in absolute cijfers 1% lager (of in relatieve cijfers 14% lager) dan in de streptokinasegroepen. Dit verschil was statistisch significant ($p = 0,001$).

¹⁴² An international randomized trial comparing four thrombolytic strategies for acute myocardial infarction. The GUSTO investigators. *N Engl J Med.* 1993; 329: 673-82.

¹⁴³ The effects of tissue plasminogen activator, streptokinase, or both on coronary-artery patency, ventricular function, and survival after acute myocardial infarction. The GUSTO Angiographic Investigators. *N Engl J Med.* 1993; 329: 1615-22.

¹⁴⁴ Sobel BE en Collen D. Controversy and clarification : preliminary results of the GUSTO trial. In: "Coronary thrombolysis in perspective", Eds. BE Sobel and D Collen, Marcel Dekker Inc, New York, N.Y. 1993, p. 303-316.



Resultaten van de GUSTO-studie: dertig dagen mortaliteit in vier behandelingsgroepen. De groep met de versnelde rt-PA-toediening had de laagste mortaliteit.

Ook het netto klinische voordeel (*net clinical benefit* – overleving zonder invaliderende beroerte) was het hoogste in groep 3 met vermelde rt-PA toediening en gelijktijdig heparine (6,3% overlijden met 0,6% beroerte) ten opzichte van de andere groepen (groep 1 - 7,2% overlijden en 0,5% beroerte, groep 2 - 7,4% overlijden en 0,5% beroerte, groep 4 - 7,0% overlijden en 0,6% beroerte). Ook op het vlak van de incidentie van diverse andere hart- en vaatcomplicaties scoorde de behandeling van groep 3 het best.

Uit de GUSTO *Angiographic Study* kwam naar voor dat de mortaliteit het laagst was bij de groep patiënten waarbij reeds na 90 minuten een herstel van de bloedtoevoer was bereikt. Reperfusie trad het snelst op bij patiënten die werden behandeld met rt-PA. Hiermee werd de jarenlange controversie beslecht dat sneller herstel van de bloedstroom ook werkelijk leidt tot betere overleving.

De resultaten van beide GUSTO-studies zijn niet alleen overtuigend omdat ze statistisch significant zijn, maar ook omwille van hun interne consistentie over de verschillende geanalyseerde subgroepen.

1% minder sterfte tegen een redelijke prijs

Misschien vraagt de buitenstaander zich af of een verschil in mortaliteit van 1% wel zo belangrijk is. In hoeverre is een mortaliteitsverlaging van 7,3% naar 6,3% beduidend voor de samenleving? In deze optiek mogen we het hoge aantal mensen niet vergeten die jaarlijks een hartinfarct krijgen en die gebaat zijn bij snelle

trombolyse. Als we aan de hand van gepubliceerde incidentiecijfers even doorrekenen, betekent dit mortaliteitsverschil concreet dat rt-PA in de VS alleen al zes mensenlevens per dag redt die niet met streptokinase hadden gered kunnen worden. Over een jaar bekeken zijn dit 2 000 mensenlevens, in de VS alleen al.

Omdat rt-PA duurder is dan streptokinase betaalt de samenleving voor deze geredde mensenlevens een prijs. Enig eenvoudig rekenwerk leert ons dat om één mensenleven met rt-PA méér te redden dan met streptokinase, er 100 mensen moeten behandeld worden. De kostprijs voor één gered mensenleven loopt met andere woorden op tot \$200 000. Dat is natuurlijk een smak geld en in de Amerikaanse media werd de vraag gesteld of een mensenleven wel zoveel waard is. In 1993 zorgde een dergelijke vraag nog voor heel wat opschudding. Voor veel mensen staat er immers geen prijs op een mensenleven en gezondheid is een onbetaalbaar goed. Aan de andere kant zijn de budgetten voor gezondheidszorg niet onuitputtelijk en kan de \$200 000 die wordt besteed aan het redden van een patiënt met een hartinfarct niet voor iemand met een andere aandoening worden ingezet. In een goed gezondheidsbeleid moeten er met andere woorden prioriteiten worden gesteld.

Vandaag wordt een dergelijke vraag veelvuldig gesteld door gezondheidseconomen. En ook voor rt-PA werd een antwoord gezocht op die vraag. Een van de eerste belangrijke farmaco-economische analyses van rt-PA werd uitgevoerd door de Nieuw-Zeelanders L.B. Barradell en K.L. Goa¹⁴⁵. Op basis van de GUSTO-gegevens berekenden zij dat voor de Amerikaanse patiënt de zogenaamde cost-effectiviteitsratio voor versnelde rt-PA-therapie ten opzichte van streptokinase \$32 687 per gewonnen levensjaar bedroeg (in dollars van 1993). Deze meerprijs valt onder de grens van \$50 000/gewonnen levensjaar die in de meeste Westerse landen worden gehanteerd als maatstaf voor het aanvaardbaar inzetten van middelen in de gezondheidszorg. Vandaag worden tal van medische behandelingen uitgevoerd die per gewonnen levensjaar heel wat duurder zijn. Kortom, rt-PA als trombolytisch geneesmiddel is op klinisch vlak een superieur geneesmiddel ten opzichte van streptokinase en kan toegediend worden tegen een aanvaardbare meerprijs.

Na de GUSTO-studie werd rt-PA dan ook het geneesmiddel naar keuze van de meeste Westerse cardiologen. Voor *Genentech* was het resultaat van de GUSTO-studie in ieder geval reden om een speciale Chandon 'Cuvée Gusto' te bottelen.

¹⁴⁵ Barradell LB, Goa KL. Alteplase: a pharmacoeconomic evaluation of its use in the management of myocardial infarction. *Pharmacoeconomics*. 1995; 8: 428-59.



Château Genentech – Cuvée Gusto 1993.

rt-PA, epiloog

Na de publicatie van de GUSTO-trial zal het klinische gebruik van rt-PA flink toenemen. *Genentech* ziet de verkoop van rt-PA, dat onder de commerciële merknaam Activase (productnaam alteplase) op de markt wordt gebracht, toenemen van \$182,1 miljoen dollar in 1992 tot \$236,3 miljoen in 1993. Ook het marktaandeel schiet van 50% naar 66% op een jaar tijd. De jaren die volgen zullen commerciële topjaren worden voor rt-PA. Vooral 1995 steekt erbovenuit met een verkoop ter waarde van \$301 miljoen en een marktaandeel tot tegen de 80%. De \$600 miljoen jaarlijkse verkoop die het tijdschrift *Fortune* ooit voorpelde, zou echter nooit gehaald worden.

Tussen de dag van de goedkeuring van rt-PA als trombolytisch geneesmiddel in 1987 en vandaag zal *Genentech* voor meer dan \$4,7 miljard aan trombolytische geneesmiddelen verkopen. Sinds 2005 maken trombolytica overigens een opmerkelijke remonte, niet zozeer als geneesmiddel voor hartpatiënten maar wel voor de behandeling van patiënten met een beroerte en andere vormen van trombose. Voor *Genentech* stijgen de verkoopcijfers alleszins opnieuw tot \$275 miljoen in 2008 komende van \$180 miljoen in 2002.¹⁴⁶

De hoeveelheid rt-PA verkocht in de rest van de wereld is, te oordelen naar de jaarlijkse royaltyrapporten van Genentech aan LR&D, bijna even groot als de hoeveelheid in de VS.

Aan royalty's vloeit er over de hele periode van 1987 tot 2006, wanneer de oorspronkelijke octrooien en overeenkomsten vervallen, \$144 miljoen naar LR&D en zijn verschillende beneficianten.

De kinderen van rt-PA

Recombinant t-PA onder de vorm van alteplase (Activase) krijgt vanaf het tweede deel van de jaren '90 een aantal opvolgers en concurrenten. Reteplase is de eerste. Het is een mutante vorm waarbij een deel van het oorspronkelijk t-PA-eiwit werd verwijderd. Dit heeft als voordeel dat het eiwit stabiel is wanneer het intraveneus wordt geïnjecteerd.^{147 148 149} In tegenstelling met alteplase, dat in

¹⁴⁶ Alle cijfers op basis van de jaarcijfers gepresenteerd door *Genentech* tussen 1987 en 2009, www.gene.com/gene/ir/financials/earnings-releases/index.jsp

¹⁴⁷ Bode C, et al. Randomized comparison of coronary thrombolysis achieved with double-bolus reteplase (recombinant plasminogen activator) and front-loaded, accelerated alteplase (recombinant tissue plasminogen activator) in patients with acute myocardial infarction. The RAPID II Investigators. *Circulation*. 1996; 94: 891-8.

¹⁴⁸ Smalling RW, Bode C, Kalbfleisch J, Sen S, Limbourg P, Forycki F, Habib G, Feldman R, Hohnloser S, Seals A. More rapid, complete, and stable coronary thrombolysis with bolus administration of reteplase compared with alteplase infusion in acute myocardial infarction. RAPID Investigators. *Circulation*. 1995; 91: 2725-32.

¹⁴⁹ Bode C, Kohler B, Moser M, Schmittner M, Smalling RW, Strasser RH. Reteplase (r-PA): a new plasminogen activator. *Expert Opin Investig Drugs*. 1997; 6: 1099-104.

een tijdspanne van 90 minuten onder de vorm van een infuus wordt gegeven, kan reteplase via twee opeenvolgende injecties worden toegediend. De GUSTO III-trial, waaraan meer dan 10 000 patiënten deelnemen en waarin reteplase rechtstreeks wordt vergeleken met alteplase, kan echter niet aantonen dat reteplase superieur is aan alteplase.¹⁵⁰

Een andere opvolger, die overigens door *Genentech* zelf werd ontwikkeld en verkocht, is tenecteplase (ook bekend onder TNK-t-PA). Deze vorm van rt-PA vertoont drie mutaties (T103, N117, KHRR296-299) waardoor het eiwit langer stabiel blijft in het bloed, de fibrinespecificiteit nog versterkt wordt en de inhibitie in het bloed trager verloopt. Door deze wijzigingen kan TNK-t-PA via één enkele injectie worden toegediend in plaats van via een infuus. In een rechtstreekse vergelijking op basis van meer dan 16 000 patiënten blijkt tenecteplase evenwaardig te zijn aan zijn moedermolecule alteplase voor wat betreft 30-dagen mortaliteit. Voor patiënten die pas vier uur na het optreden van de eerste symptomen worden behandeld, scoort tenecteplase zelfs beter.¹⁵¹ Voor wat betreft de frequentie van hersenbloedingen is er nauwelijks verschil tussen beide (0,93% voor tenecteplase tegenover 0,94% voor alteplase).¹⁵²

Het belangrijkste voordeel van tenecteplase ten opzichte van alteplase is de snelheid waarmee het kan toegediend worden. Uit een experiment in het Verenigd Koninkrijk blijkt dat tenecteplase sneller kan klaargemaakt worden (gemiddeld 10,5 minuten sneller) waardoor het aantal patiënten dat een trombolytische behandeling krijgt binnen de 30 minuten na aankomst in het ziekenhuis stijgt van 58% naar 78%.¹⁵³

Trombolysie of dotteren en stenten

Ondanks het feit dat trombolytische therapie het leven van tienduizenden hartpatiënten heeft gered, kent standaard trombolysetherapie ook belangrijke beperkingen. Het duurt immers een tijdje vooraleer de bloedklonter is opgelost (doorgaans 45 tot 60 minuten na het inzetten van de behandeling) en slechts bij 50%

¹⁵⁰ A comparison of reteplase with alteplase for acute myocardial infarction. The Global Use of Strategies to Open Occluded Coronary Arteries (GUSTO III) Investigators. *N Engl J Med.* 1997; 337: 1118-23.

¹⁵¹ Assessment of the Safety and Efficacy of a New Thrombolytic (ASSENT-2) Investigators, Van De Werf F, Adgey J, Ardissino D, Armstrong PW et al. Single-bolus tenecteplase compared with front-loaded alteplase in acute myocardial infarction: the ASSENT-2 double-blind randomised trial. *Lancet.* 1999; 354: 716-22.

¹⁵² Van de Werf F, et al. ASSENT-2 Investigators. Assessment of the Safety and Efficacy of a New Thrombolytic. Incidence and predictors of bleeding events after fibrinolytic therapy with fibrin-specific agents: a comparison of TNK-tPA and rt-PA. *Eur Heart J.* 2001; 22: 2253-61.

¹⁵³ Leah V, Clark C, Doyle K, Coats TJ. Does a single bolus thrombolytic reduce door to needle time in a district general hospital? *Emerg Med J.* 2004; 21: 162-4.

tot 60% van de patiënten wordt volledige heropening van het bloedvat bekomen.¹⁵⁴ Verder treedt bij 5% tot 15% van de patiënten een nieuwe verstopping op¹⁵⁵ en er blijft de bezorgdheid over het optreden van hersenbloedingen, vooral bij oudere patiënten.

Onder cardiologen bestaat in de 21^{ste} eeuw weinig twijfel dat bijtijds uitgevoerde percutane coronaire interventie (PCI) betere resultaten kan geven dan trombolyse. PCI wordt in de wandelgangen ook wel ‘dotteren en stenten’ genoemd: via een katheter, ingebracht in de lies, wordt de trombus weggehaald uit het verstopte bloedvat, eventueel wordt het bloedvat verder opengesperd met een ballonnetje en plaatst de interventionele cardioloog een stent – een metalen veertje dat het dichtklappen van de slagader moet voorkomen.

Percutane coronaire interventie, tenminste wanneer het wordt uitgevoerd door een interventionele cardioloog met een uitgebreide ervaring, leidt tot een lagere mortaliteit op korte termijn dan trombolyse (7% ten opzichte van 9%), een lager risico op een nieuw infarct (3% t.o.v. 7%) en een lagere frequentie van hersenbloedingen (1% t.o.v. 2%). Ook op langere termijn leidt PCI tot een lagere mortaliteit.¹⁵⁶

De grootste moeilijkheid is echter dat PCI dient uitgevoerd te worden in een gespecialiseerd cathlab en dus niet voor alle patiënten tijdig beschikbaar is. Patiënten moeten immers tussen de 90 en 120 minuten na het optreden van de eerste symptomen op de operatietafel liggen. In een land als België, met een goed uitgebouwd netwerk van ziekenhuizen met een hartcentrum en een goede wegeninfrastructuur, is het doorgaans wel haalbaar om een patiënt met een hartaanval tijdig een PCI-behandeling te geven. Als er kostbare tijd wordt verloren, is dat meestal omdat de patiënt zelf de symptomen niet herkent en zijn arts of de hulpdiensten laattijdig verwittigt. In andere landen, waar de afstanden tussen perifeer ziekenhuis en ziekenhuis met een gespecialiseerd hartcentrum veel groter zijn, is tijdige PCI niet altijd mogelijk en blijft trombolyse de voorkeursbehandeling.

Een tweede leven

Terwijl trombolytische therapie voor patiënten met een hartaanval steeds meer vervangen wordt door PCI, richt de focus van klinisch trombolytisch onderzoek zich steeds meer op de behandeling van beroertes of CVA's (cerebrovasculaire

¹⁵⁴ Van de Werf FJ, Topol EJ, Sobel BE. The impact of fibrinolytic therapy for ST-segment-elevation acute myocardial infarction. *J Thromb Haemost.* 2009; 7: 14-20. Review.

¹⁵⁵ Topol EJ. Acute myocardial infarction: thrombolysis. *Heart.* 2000; 83: 122-6. Review.

¹⁵⁶ Keeley EC, Boura JA, Grines CL. Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials. *Lancet.* 2003; 361: 13-20. Review.

accidenten). Beroertes zijn er in twee vormen: bij meer dan 80% van de gevallen gaat het om een belemmering van de bloeddorstrooming in een deel van de hersenen als gevolg van een bloedklonter die een bloedvat afsluit (ischemisch CVA). Bij de andere 20% gaat het om een hersenbloeding hetgeen het resultaat is van een scheurtje in een bloedvat waardoor bloed in de hersenen terecht komt (hemorragisch CVA).¹⁵⁷

Net als bij een hartinfarct heeft het gebrek aan zuurstof in het stroomafwaarts weefsel een nefaste invloed op de overleving van de hersencellen. Het is dus ook hier een kwestie om zo snel mogelijk de bloedtoevoer te herstellen.¹⁵⁸ Anderzijds is extra voorzichtigheid geboden omdat trombolytische therapie tegenaangewezen is in het geval van een hemorragisch CVA.

De eerste trombolytische behandelingen van beroertes waren geen onverdeeld succes. In de eerste plaats omdat de beeldvormingstechnieken uit die tijd niet toelieten om ondubbelzinnig het verschil te maken tussen een ischemisch of een hemorragisch CVA, of een andere oorzaak voor de symptomen, bijvoorbeeld de aanwezigheid van een tumor. Bovendien werden in die studies sommige patiënten heel laat behandeld, soms zelfs dagen of weken na het optreden van de eerste symptomen.¹⁵⁹

In het midden van de jaren '90 komt er evenwel schot in de zaak met de publicatie van een hele reeks gerandomiseerde en placebogecontroleerde klinische studies waarin diverse trombolytische geneesmiddelen worden getest, onder andere rt-PA.¹⁶⁰ Op basis van de resultaten van deze studie uitgevoerd door de Amerikaanse NIH wordt rt-PA in 1996 door de FDA als enig trombolytisch geneesmiddel voor de behandeling van ischemisch CVA goedgekeurd.

Een hele reeks andere studies zullen volgen. Uit de gepoolde gegevens blijkt dat rt-PA de invaliditeit als gevolg van beroerte op lange termijn reduceert met 33%. Daarbij is het evenwel belangrijk dat de trombolyse zo snel mogelijk wordt opgestart. Liefst binnen het uur na het optreden van de beroerte en zeker binnen de drie uur.¹⁶¹ Want rt-PA-behandeling heeft ook een keerzijde: in 6% van de met

¹⁵⁷ Albers GW, Amarenco P, Easton JD, Sacco RL, Teal P. Antithrombotic and thrombolytic therapy for ischemic stroke: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest*. 2004; 126: 483S-512S. Review.

¹⁵⁸ Siesjo B. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia: I. Pathophysiology. *J Neurosurg* 1992; 77: 169-84.

¹⁵⁹ Brott T, Broderick J, Kothari R. Thrombolytic therapy for stroke. *Curr Opin Neurol*. 1994; 7: 25-35. Review.

¹⁶⁰ Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. *N Engl J Med* 1995; 333: 1581-7.

¹⁶¹ Albers GW, Amarenco P, Easton JD, Sacco RL, Teal P; American College of Chest Physicians. Antithrombotic and thrombolytic therapy for ischemic stroke: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest*. 2008; 133: 630S-69S.

rt-PA-behandelde patiënten treedt een bijkomende hersenbloeding op.¹⁶² Mogelijk is die te wijten aan het te laat toedienen van rt-PA. Immers de bloedvaten en de neuronale weefsels achter de bloedklonter kunnen vanwege het gebrek aan zuurstof en de vrijstelling van stresshormonen al sterk verzwakt zijn. Voor die verzwakte weefsels zou rt-PA en andere trombolytische geneesmiddelen (wellicht met uitzondering van microplasmine – later daarover meer) toxisch kunnen zijn omdat het plasmine dat ze activeren ook de eiwitten degradeert die de zenuwcellen verbinden met de extracellulaire matrix. Het verbreken van deze verbindingen leidt bij de reeds gestreste cellen tot verhoogde sterfte.^{163 164 165}

De rigoureuze klinische richtlijn dat rt-PA niet meer mag toegediend worden later dan drie uur tot maximaal vier uur na het optreden van de eerste symptomen, betekent in de praktijk dat slechts 3% tot 5% van de CVA-patiënten in aanmerking komt voor een trombolytische behandeling.¹⁶⁶

Naast een leven als ‘clot buster’ voor hartinfarcten en beroertes, wordt rt-PA ook nog gebruikt voor het oplossen van bloedklonters in de longen (longembolie)¹⁶⁷ en veneuze trombose.¹⁶⁹ Recent ontdekten Amerikaanse onderzoekers dat rt-PA de bloeddorstrooming in bevroren ledematen van bergbeklimmers kan herstellen waardoor het aantal amputaties spectaculair daalt.¹⁷⁰

Wie weet welke levens rt-PA in de toekomst nog zal redden.

Terugkijkend op het t-PA-verhaal

Van het experiment in februari 1979, waarbij we voor het eerst de fibrinespecificiteit van de plasminogen activator gesecreteerd door de Bowes melanoma cellijn

¹⁶² Hacke W, Donnan G, Fieschi C, et al; ATLANTIS Trials Investigators; ECASS Trials Investigators; NINDS rt-PA Study Group Investigators. Association of outcome with early stroke treatment: pooled analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS rt-PA stroke trials. *Lancet*. 2004; 363: 768-74.

¹⁶³ Wang YF, Tsirka SE, Strickland S, Stieg PE, Soriano SG, Lipton SA. Tissue plasminogen activator (tPA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and tPA-deficient mice. *Nat Med*. 1998; 4: 228-31.

¹⁶⁴ Chen ZL, Strickland S. Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin. *Cell*. 1997; 91: 917-25.

¹⁶⁵ Nagai N, Vanlinthout I, Collen D. Comparative effects of tissue plasminogen activator, streptokinase, and staphylokinase on cerebral ischemic infarction and pulmonary clot lysis in hamster models. *Circulation*. 1999; 100: 2541-6.

¹⁶⁶ Delude C. Clot-Busters!! – Discovery of thrombolytic therapy for treating heart attack and stroke. *Breakthroughs in Bioscience, FASEB* 2004, 13.

¹⁶⁷ Wan S, Quinlan DJ, Agnelli G, Eikelboom JW. Thrombolysis compared with heparin for the initial treatment of pulmonary embolism: a meta-analysis of the randomized controlled trials. *Circulation*. 2004; 110: 744-9.

¹⁶⁸ Dong B, Jirong Y, Liu G, Wang Q, Wu T. Thrombolytic therapy for pulmonary embolism. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006; 2: CD004437. Review.

¹⁶⁹ Watson LI, Armon MP. Thrombolysis for acute deep vein thrombosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 18; 4: CD002783. Review.

¹⁷⁰ Bruen KJ, Ballard JR, Morris SE, Cochran A, Edelman LS, Saffle JR. Reduction of the incidence of amputation in frostbite injury with thrombolytic therapy. *Arch Surg*. 2007; 142: 546-51.

aantoonen, tot op de dag van vandaag is er een hele weg afgelegd. Meer dan drie miljoen hartpatiënten zijn inmiddels behandeld met rt-PA en het geneesmiddel redt nog steeds levens.

Vaak wordt me gevraagd of ik het niet jammer vind dat we de rechten op t-PA verkocht hebben aan *Genentech* en of ik niet liever mijn eigen ‘Collen Pharmaceutica’ had opgericht. Geneesmiddelen ontwikkelen was in de jaren '80 al een complexe business, en dat is het vandaag nog veel meer. Bovendien stonden we met t-PA voor een nieuw tijdperk, dat van de biotechnologische geneesmiddelen. We hadden in mijn opinie op dat ogenblik in Vlaanderen niet de expertise om een molecule als t-PA te kloneren, laat staan dat we beschikten over de technologie om in zoogdiercellen voldoende hoeveelheden rt-PA te produceren. Ik heb nooit spijt gehad van de overeenkomst die LR&D heeft afgesloten met *Genentech*. Integendeel, *Genentech* was en is een technologisch ‘power house’ en heeft alles in het werk gesteld om van rt-PA een succes te maken. Bovendien zijn ze gedurende het hele parcours, van het kloneren tot en met de marketing, een loyale partner gebleven die zijn beloftes grotendeels is nagekomen.

Deel III.

Ondernemen tussen academia en industrie

Van LR&D over Innovati tot Thromb-X en ThromboGenics Ltd

Recombinant t-PA heeft *Genentech* als biotechnologisch bedrijf groot gemaakt en heeft ook mij en ons laboratorium geen windeieren gelegd. Dat weet iedereen en ik heb dat ook nooit tegengesproken. De royaltystroom uit rt-PA – in totaal \$144 miljoen – werd echter grotendeels geïnvesteerd in nieuw onderzoek. Dat gebeurde steeds, zoals overeengekomen in 1976, na overleg en in samenspraak met de Raad van Bestuur van LR&D, die als gemandateerde van de K.U.Leuven, eigenaar van de octrooirechten was.

Toch hebben een aantal collega's en oversten hun ongenoegen over de gang van zaken nooit onder stoelen of banken gestoken. Een van de doelstellingen die ik met dit boek wil bereiken is op een transparante manier duidelijk maken dat de rt-PA-royalty's zo goed mogelijk werden besteed. Ze hebben het mogelijk gemaakt om onderzoek op wereldniveau te bedrijven in Leuven, zelfs om een industriële biotechnologische activiteit in Leuven uit te bouwen.

Fundamentele documenten

Drie documenten zijn belangrijk als startbasis voor mijn bespreking van de manier waarop de royalty's werden aangewend. Ze werden allen al eerder besproken in dit boek:

1. De overeenkomst die ik in februari 1976 afsloot met *Leuven Research & Development* waarin de rechten op mijn onderzoek werden overgedragen aan LR&D en waarin gesteld werd dat de verdelingsmodaliteiten van eventuele opbrengsten in onderling overleg tussen LR&D en mezelf zouden bepaald worden (bijlage 2). Daarin stond expliciet het volgende vermeld: *Dr. D. Collen en zijn medewerkers, tewerkgesteld aan de Katholieke Universiteit te Leuven, doen ten voordele van de vzw Leuven Research and Development afstand van alle juridische, commerciële en financiële rechten en de uitoefening ervan, die verbonden zijn aan onderzoeksresultaten die zij rechtstreeks of onrechtstreeks bekomen hebben in het kader van hun onderwijs- en onderzoekopdrachten aan de Katholieke Universiteit Leuven.*³

Eventuele inkomsten die LR&D genereerde op basis van onze onderzoeksresultaten zouden verdeeld worden op basis van volgende sleutel: de K.U.Leuven-overheid ontving 10% van de inkomsten, LR&D kreeg 7%, en na aftrek van alle kosten verbonden aan de uitoefening van zijn opdracht zal LR&D minimaal 50% van het resterende gedeelte ter beschikking houden voor verder onderzoek in ons laboratorium. Het resterende gedeelte kon aan de uitvinders en/of medewerkers als persoonlijke vergoeding worden uitgekeerd.

Het document sluit echter af met *‘De concrete verdelingsmodaliteiten zullen ten gepaster tijd in onderling overleg tussen LR&D en Dr. D. Collen bepaald worden en ter goedkeuring aan de raad van beheer van LR&D worden voorgelegd. De raad van beheer van LR&D kan ten allen tijde zijn standpunt hierin aanpassen aan de omstandigheden.’*

Dit betekent dat LR&D voor K.U.Leuven de enige eigenaar is van de juridische, commerciële en financiële rechten op ontdekkingen die in ons laboratorium worden gedaan, en dat we samen, in overleg, maar behoudens goedkeuring door de Raad van Beheer van LR&D, bepalen hoe de inkomsten op die ontdekkingen zullen verdeeld worden. Deze contractuele afspraak moet ik hier expliciet benadrukken opdat de overdracht van middelen naar o.a. de *D. Collen Research Foundation* en de *D. Collen Trust* door de fiscus zelfs niet gedeeltelijk zou gekwalificeerd kunnen worden als schenkingen ‘om niet’ in mijnen hoofde, die onderworpen zouden kunnen zijn aan schenkingsrechten of zelfs aan beperkingen tot het gereserveerde doel onder de Belgische erfeniswetgeving.

2. Het octrooi op t-PA ingediend op 11 juni 1980 door LR&D met als uitvinders Désiré Collen, Dick Rijken en Osamu Matsuo (bijlage 3). Het octrooi werd eerst in Nederland ingediend onder nummer 8003402 en zou later worden uitgebreid tot de US en toegekend worden onder patentnummer 4,752,603. Zonder dit octrooi zouden we nooit royalty’s hebben ontvangen op rt-PA.
3. De initiële niet-exclusieve samenwerkingsovereenkomst (*Cooperative Letter of Agreement*) die Jos Bouckaert, directeur van LR&D, in september 1980 afsloot met *Genentech* en waarin LR&D een royalty van 1% bedong uit de inkomsten die *Genentech* uit rt-PA ooit zou genereren. Op dat ogenblik was onze samenwerking met *Genentech* nog niet exclusief maar had *Genentech* wel een voorkooprecht (bijlage 4).

Deze drie documenten vormen de fundamente van alle latere afspraken en contracten die tussen de partijen zullen ontstaan.

Een nieuwe speler – Innovati

In februari 1982 sloot LR&D vzw een overeenkomst met de ‘innovatie-management-vennootschap’ Innovati nv om het beheer over een aantal LR&D-dossiers over te dragen. Innovati was bijna een jaar eerder opgericht en de vennootschap moet gezien worden in het bredere kader van de DIRV-actie (Derde Industriële Revolutie in Vlaanderen) die door de voorzitter van de Vlaamse deelregering Gaston Geens aan het begin van de jaren ’80 werd opgezet. In dezelfde periode en in een gelijkaardige context werd bijvoorbeeld ook de Gewestelijke Investeringsmaatschappij voor Vlaanderen (GIMV) opgericht.

De stille boodschap van de politici en het Vlaamse bedrijfsleven was om van Innovi een soort LR&D te maken, maar dan voor alle universiteiten. Innovi moest onder meer de valorisatie van het Vlaams academisch onderzoek op zich nemen en, in de mate van het mogelijke, Vlaamse bedrijven de mogelijkheid bieden om de vruchten van dit onderzoek te plukken. Officieel heette het dat Innovi tot doel had om ondernemingen bij te staan door diensten te leveren rond het opzoeken en identificeren van uitvindingen, technologieën, know-how; het verwerven van intellectuele eigendomsrechten; het plaatsen en beheren van ontwikkelingscontracten; en het afsluiten van licentieovereenkomsten met geïnteresseerde industriële en commerciële partijen. Innovi zou onder andere een rol spelen bij de oprichting van de Vlaamse biotechnologiebedrijven *Plant Genetic Systems* en *Innogenetics*.

Het was ook de bedoeling dat het t-PA-dossier werd overgedragen aan Innovi om er het administratief en technisch beheer over te voeren. Die overdracht greep formeel plaats op 12 juli 1982 waarbij LR&D Innovi gelastte om:

- de bestaande overeenkomsten met *Genentech* stipt uit te voeren;
- eventueel nieuwe overeenkomsten betreffende plasminogeenactivator af te sluiten met *Genentech* of met derden;
- op eigen verantwoordelijkheid de octrooiaanvragen in stand te houden en de procedure tot toekenning ervan op te volgen.

De overeenkomst stelt ook dat Innovi voor het management van de t-PA-contracten en t-PA-octrooien een vergoeding van 12% op de inkomsten mocht aanrekenen. LR&D stond haar 7% uit de overeenkomst van februari 1976 af aan Innovi en de K.U.Leuven zou de helft van haar 10% overdragen. Zelf zou de K.U.Leuven nog 5% overhouden van de opbrengst uit rt-PA.

Duwtje in de rug

Ik meende in die periode dat er goede redenen waren om het management van de t-PA-contracten over te dragen aan Innovi. In de eerste plaats omdat Jos Bouckaert LR&D zou verlaten en afgevaardigd-beheerder werd bij Innovi. Hij kende het t-PA-dossier bijzonder goed en ik geloofde dat er op dat ogenblik te weinig expertise binnen LR&D overbleef om mijn dossiers behoorlijk op te volgen, een vermoeden dat mij werd ingegeven door Jos Bouckaert. Bovendien begreep ik dat Jos bij de opstart van Innovi best een duwtje in de rug kon gebruiken – zeker toen bleek dat de toezeggingen door andere universiteiten uit niet veel meer dan lippendienst bestonden.

Het duwtje dat Innovi kreeg door t-PA werd echter steeds meer een ontrechte afroeping van schaarse onderzoeksmiddelen. Een voorbeeld: tussen juli 1982 en oktober 1985 mocht Innovi \$78 000 aanrekenen (12% van \$650 000) gebaseerd

op het bestaande contract tussen LR&D en *Genentech* van november 1981. Dat was mooi meegenomen voor Innovati, het enige wat het moest doen was elke drie maanden een factuur sturen naar *Genentech* en zien dat het gestorte geld werd verdeeld volgens de afspraken.

Exclusieve overeenkomst met *Genentech* – versie 1983

Op 18 maart 1983 werd een nieuwe overeenkomst met *Genentech* gesloten. Dit keer tussen Innovati en *Genentech*, met de goedkeuring van LR&D en mezelf. Nu ja, ‘gesloten tussen Innovati en *Genentech*’ is een behoorlijk overstatement. Ik had eigenhandig het nieuwe contract onderhandeld met Jim Gower van *Genentech* en de enige contributie van Innovati bestond erin dat Jos Bouckaert, in één enkele leessessie tijdens een diner bij mij thuis, zijn goedkeuring gaf.

Het contract van 18 maart 1983 was in hoofdzaak een verlenging en uitdieping van het eerdere contract uit 1981 met dat verschil dat *Genentech* de exclusieve verkoopsrechten kreeg op rt-PA, wereldwijd en tot zolang het octrooi van LR&D geldig was. In ruil voor die exclusiviteit zou *Genentech* 3% royalty’s afstaan op de verkoop in de VS en 2% op de verkoop in de rest van de wereld. *Genentech* verdubbelde tot verdrievoudigde met andere woorden de royalty’s.

Op dat ogenblik zijn we nog 4,5 jaar verwijderd van de erkenning van rt-PA als trombolytisch geneesmiddel door de FDA (november 1987) en ruim tien jaar voor de publicatie van de GUSTO-trial (november 1993). We hoopten mede op basis van de eerste resultaten bij patiënten dat rt-PA een succes zou worden, maar niemand kon dit voorzien. Ik herinner me nog duidelijk dat ik tijdens een gesprek met oud-minister Gaston Geens eind jaren 80, vol enthousiasme beweerde dat t-PA een miljard BEF aan royalty’s naar België zou doen vloeien, waarop hij mij met een ongelovige blik gelukwensde.

Breuk met Innovati

Ook LR&D en de K.U.Leuven zagen in dat Innovati wel heel rijkelijk werd beloond om in wezen slechts enkele eenvoudige administratieve taken uit te voeren. Op 14 juni 1984 werd met enige tegenstrubbeling een nieuwe regeling getroffen waarbij Innovati zijn vergoeding van 12% naar 10% liet zakken en het 2% van de opbrengst voortaan doorstortte aan LR&D om onder andere kosten in verband met personeelsadministratie op te vangen.

In feite bleef de bijdrage van Innovati beperkt tot een postbusfunctie want de nieuwe contracten waren door mij genegotieerd terwijl de verantwoordelijkheid voor het in stand houden en verdedigen van de t-PA-octrooien op 23 februari 1984 formeel was overgedragen aan *Genentech*. Op geen enkel ogenblik in de

periode tussen juli 1982 en oktober 1985 is er sprake geweest van enige significante professionele input vanuit het management van Innovati, noch heeft Innovati enig financieel risico genomen in het t-PA-verhaal. Niettemin streken ze, voor het nu en dan leveren van een beperkte administratieve dienst de hogervermelde \$78 000 op.

LR&D en ikzelf voelden aan dat de situatie in de toekomst nog schrijnender zou worden als rt-PA werkelijk een succesvol trombolytisch geneesmiddel werd. Innovati zou dan een tiende van de royaltystroom afkomen als administratieve overhead, wat vermoedelijk zou neerkomen op een bedrag van meerdere honderduizenden dollars per jaar of zelfs meer. Dat geld kon mijns inziens veel beter besteed worden. Nadat ik vernam dat Jos Bouckaert Innovati zou verlaten – hij trok naar de wijngaarden van California waar hij een succesvolle carrière als manager van een bedrijf in het genetisch veredelen van wijnstokken zou uitbouwen – stemde ik dan ook in dat LR&D de lastgevingsovereenkomst met Innovati opzegde. Dit gebeurde op 30 september 1985 door Jacques Vander Eecken, de toenmalige voorzitter van de Raad van Bestuur van LR&D.

Innovati uitgekocht

Deze opzegging van de overeenkomst wordt echter niet zonder slag of stoot aanvaard door Innovati. Ik heb toen mijn stoute schoenen aangetrokken en ben naar de voorzitter en verscheidene leden van de Raad van Bestuur van Innovati NV gegaan (waaronder R. Stouthuysen van Jansen Pharmaceutica, J. Hinnekes van de Boerenbond en G. Declercq van de Kredietbank) om hen eerst het geval uit te leggen en daarna, gezien hun gebrek aan toegeeflijkheid, hen op een beschaafde manier de huid vol te schelden. Het zal nog tot eind december 1988 duren voor de zaak helemaal van de baan is. Er komt zelfs een arbitrage voor de rechtbank aan te pas, die in het nadeel van LR&D uitdraait.

Uiteindelijk zit er niets anders op dan Innovati uit te kopen. Met dat doel richt Innovati de vennootschap nv t-PA op waarin het alle rechten en verbintenissen met betrekking tot t-PA onderbrengt. Een onafhankelijke commissarisrevisor schat de waarde van de n.v. t-PA op 32 001 000 BEF, meteen de kostprijs die LR&D betaalt om alle aandelen nv t-PA over te nemen en zo zijn volledige rechten op de royalty's op rt-PA opnieuw in handen te krijgen. Aan de ontvangende zijde staan de aandeelhouders van Innovati, zijnde de fine fleur van de Belgische en Vlaamse financiële en bedrijfswereld met onder meer de Generale Maatschappij, de GIMV, Ibel, Investco, Prominvest, Agfa Gevaert, Aveve, Bekaert, Bell, Janssen Pharmaceutica en MHO.

Mijn voorstel aan de Raad van Bestuur van LR&D om de nv t-PA over te nemen met centrale LR&D-middelen werd echter geweigerd, zodat nv t-PA gekocht werd door mijn 'Protein Research Division' binnen LR&D. Hierdoor kwamen de

10% van de toekomstige inkomsten uit t-PA ons laboratorium toe. Deze 32 miljoen BEF investering heeft later in totaal ongeveer 350 miljoen BEF opgebracht aan royalty's voor ons lab en *Thromb-X* (zie verder).

De nv t-PA

De nv t-PA zal nog enige jaren blijven bestaan en dus recht hebben op 10% van de royalty- instroom van rt-PA. De nv t-PA zal nu echter bestuurd worden vanuit LR&D en de Raad van Bestuur is bevolkt met vertegenwoordigers van LR&D en ook ik heb er voortaan een zitje in. Er wordt een overeenkomst met de K.U.Leuven gesloten waarin de nv t-PA het onderzoek naar therapeutische producten voor cardiovasculaire behandeling zal sponsoren aan het Centrum voor Trombose en Vasculair Onderzoek van de K.U.Leuven. Het eerste jaar (periode 15 januari 1990 - 14 januari 1991) stort de nv t-PA een bedrag door van 33 miljoen BEF. Dit bedrag omvat de tewerkstelling van de vereiste wetenschappelijke medewerkers, laboranten en daarnaast de gebruikelijke werkings-, investerings-, supervisiekosten en overhead. Deze overeenkomst zal nog drie keer hernieuwd worden en achtereenvolgens zullen 15 miljoen (1991), 22, 5 miljoen (1992) en 20 miljoen BEF (1993) de weg vinden naar het laboratorium. Over deze vier jaren gespreid, komt dat neer op een totaal van 90,5 miljoen BEF of een kleine € 2,25 miljoen.

De nv t-PA was op het eerste zicht een perfect systeem om royalty's uit rt-PA rechtstreeks te kunnen investeren in academisch, wetenschappelijk onderzoek. Alleen was de constructie niet geheel conform de zienswijze van de fiscale overheid die met toenemende argwaan naar deze onbelaste transferts keek. Doorsluizen van royalty's langs LR&D, een vzw, was inderdaad onderhevig aan een belasting van 25% op 85% van de ontvangen som. Daarom leek het ons voorzichtiger om op 4 november 1993 de nv t-PA te laten fusioneren met *Thromb-X*.

De fusie tussen de nv t-PA en *Thromb-X* komt er met goedkeuring van alle partijen, *in casu* de top van LR&D geruggensteund door de K.U.Leuven en mezelf. Het fusiedocument (zie bijlage 8) wordt voor de nv t-PA getekend door Jacques Vander Eecken en Karel Tavernier, die ook respectievelijk voorzitter zijn van LR&D en algemeen beheerder van de K.U.Leuven. Voor *Thromb-X* tekent Hans Claes. Concreet verandert er voor LR&D en de K.U.Leuven niet veel. LR&D was immers hoofdaandeelhouder van de nv t-PA en zij brengt die aandelen in bij *Thromb-X* waarvan ze ook aandeelhouder is voor de helft.

Thromb-X

Thromb-X was opgericht op 20 december 1991 als een naamloze vennootschap (zie bijlage 9). Er waren twee partners in de vennootschap, *Leuven Research & Development* (t.t.z. de *Protein Research Division* van LR&D) en ikzelf, als privé-

persoon, die elk inschreven op de helft van de aandelen. De inbreng van elke partner bedroeg 12,5 miljoen BEF in kapitaals aandelen van 10 000 BEF en daarboven evenveel stichters aandelen. Het kapitaal dat ik bijdroeg was afkomstig van mijn persoonlijk aandeel in de royalty's op rt-PA.

Hans Claes wordt vanaf het begin gedelegeerd bestuurder van *Thromb-X*. Het bedrijf heeft als doelstelling *'het uitoefenen van alle beheers- en financiële activiteiten en meer in het bijzonder: onderzoek naar, ontwikkeling van en verkoop van diagnostische en therapeutische stoffen voor de voorkoming of verwijdering van trombosen, en andere farmaca in het domein van de menselijke geneeskunde.'*

Met *Thromb-X* had ik een concreet doel voor ogen en tegelijk een droom. Mijn droom was een Vlaams mini-*Genentech* uit te bouwen, mijn doel een alternatief trombolytisch geneesmiddel te ontwikkelen dat ten minste even goed of beter was dan rt-PA maar dat verkocht kon worden voor een fractie van de kostprijs. Een kandidaat had ik op dat ogenblik al: stafylokinase (zie hoofdstuk Stafylokinase – t-PA voor arme mensen) dat ingelicenseerd werd van LR&D, van *Yakult Honsba* in Japan en van het vroegere Oostduitse Instituut voor Wetenschappen in Jena. *Thromb-X* moest het mogelijk maken om stafylokinase tot in de eindfase te ontwikkelen, dit wil zeggen vanaf het concept stadium en de biochemische karakterisering, over het preklinisch en klinisch onderzoek, tot aan de marktintroductie. Een geneesmiddel door die ontwikkelingsfases sluizen vanuit een academische omgeving is onmogelijk. Die heeft daar niet de expertise voor en nog minder de financiële middelen. Het t-PA-verhaal maakt duidelijk dat een industriële partner onontbeerlijk is. *Thromb-X* moest de ideale partner zijn: enerzijds genoot het van een deel van de instroom van royalty's die het verkreeg na de fusie met de nv t-PA en anderzijds zou het zoeken naar bijkomende kapitaalverschaffers. Over de volgende jaren heb ik persoonlijk de *Protein Research Division* van LR&D progressief uitgekocht uit *Thromb* aan 20 000 BEF voor de stichters aandelen en 30 000 tot 60 000 BEF voor de kapitaals aandelen. Hierdoor werd de virtuele waarde van de maatschappij opgedreven wat belangrijk was om dilutie door mogelijke toekomstige investeringen beperkt te houden.

In 1997 worden 54,5 percent van de toekomstig rt-PA-royalty's voor 675 miljoen BEF door LR&D aan *Thromb-X* verkocht en in 1998 worden de overblijvende 35,5 percent in onderling akkoord tussen LR&D en mezelf ondergebracht in een non-profit organisatie met Biggar Ltd die ze doorverkoopt aan *Thromb-X NV* voor 600 miljoen BEF (de overige 10% waren reeds aan *Thromb-X* verkocht door nv t-PA).

Thromb-X en 4C

Thromb-X heeft gedurende de tweede helft van de 90'er jaren en tot ongeveer 2006 translationeel onderzoek verricht op stamcellen. In 1996 werd Luc Schoonjans naar het laboratorium van Randall Moreadith in Dallas gestuurd om te pro-

beren transgene konijnen te maken. De procedure die werd gebruikt zag er als volgt uit: eerst wordt een gen gemanipuleerd in embryonale stamcellen, die cellen worden vervolgens ingebracht in dragerblastocysten (vroegstadige embryo's), daaruit worden chimere proefdieren opgekweekt die het gemanipuleerd gen aan hun afstammelingen doorgeven. Deze techniek wordt sinds het einde van de jaren 80 routinematig op muizen toegepast, maar is tot nog toe bij andere diersoorten niet gelukt. Na vele jaren intensief werk is Schoonjans er wel in geslaagd chimere konijnen te genereren, maar overdracht van de genetische wijziging naar de afstammelingen is uiteindelijk niet gelukt. Wel heeft hij sterk verbeterde kweekmedia en genetisch zuivere embryonale stamcellijnen van zogenaamd 'niet-permissieve' muizenstammen gemaakt, die hoogwaardige reagentia voor stamcelonderzoek gebleken zijn. Die reagentia werden inmiddels door *Thromb-X* uitgelicentieerd aan bedrijven die actief zijn in dit domein.

Toch een opmerkelijke anekdote in dit verband. Om Schoonjans' 'veredeld' kweekmedium op grote schaal te produceren zijn we bij *4C Biotech* (*4C*) in Senefé beland, een biotechbedrijfje gesticht door Alain Miller, biochemicus en professor aan de universitaire instelling van Mons. Oorspronkelijk wou *4C* nieuwe celkweektechnologie ontwikkelen, maar progressief was het naar een zuivere 'service provider' geëvolueerd. Het materiaal dat *4C* voor *Thromb-X* produceerde was van zeer goede kwaliteit en toen bleek dat de dagen van de stichter in zijn bedrijf geteld waren – er ging een reorganisatie plaatsgrijpen – sloten *Thromb-X* en Alain Miller een overeenkomst om de aandelen van Miller (gehouden door zijn managementvennootschap CIL) en de daaraan verbonden controle van *4C* over te nemen (zie bijlage 10).

De tekst van de overeenkomst was opgesteld in het Frans door de raadsman van Miller en tijdens een lunch met zijn zoon en raadgever Axel Miller, op de bovenste verdieping van de hoofdzetel van Dexia aan de kleine ring in Brussel, werd de koop in principe overeengekomen bij het degusteren van een schitterende fles Château Palmer (een Margaux van de bovenste plank, die voorzeker aan Dexia € 100 moet gekost hebben). De overeenkomst werd, na een finale teleconferentie met Miller, die toen op een congres in Italië was, in mijn kantoor op Gasthuisberg getekend op donderdag 3 oktober 2002 door mijzelf voor *Thromb-X* en door Dhr. Poskin, CFO van *4C* met telefonische goedkeuring door Miller, die bij de ondertekening aan de lijn was.

Coup de théâtre de volgende maandagmorgen: er wordt mij gemeld dat de verkoop van de CIL-aandelen van Miller aan *Thromb-X* niet doorgaat. *GSK* bleek *4C* te hebben opgekocht en zou het onderbrengen in *Henogen*. Ik wist wel dat *GSK* interesse in *4C* getoond had, maar voor Miller "was er geen sprake van" dat hij met *GSK* ging scheep gaan. Schijnbaar was er tijdens het weekend, na de terugkeer van Miller uit Italië, een voorstel van *GSK* gekomen dat voor hem plots wel aanvaardbaar was. Een telefoongesprek met zoon Axel Miller, en met Jean Stephenne, CEO van *GSK* in België, bracht geen zoden aan de dijk. Hoezeer ik ook benadrukte dat we een getekende verkoopsovereenkomst hadden met Mil-

ler. Er werd me zelfs laconiek meegedeeld dat ik de overeenkomst dan maar langs de rechtbank moest afdwingen. Vader Miller was niet bereikbaar, die was schijnbaar in de grond gekropen (van eerlijke schaamte?).

De koop doordrukken via de rechtbank, vond ik weinig zinvol. Om in Seneffe te werken in een vijandige omgeving, was niet direct een attractieve oplossing voor ons productieprobleem. Ik heb dan maar drie medewerkers van 4C, die niet erg enthousiast waren om voor GSK te werken, in Leuven aangeworven en we hebben een eigen zoogdiercellensysteem voor de productie van biotechnologische kandidaatgeneesmiddelen opgezet. Dat is achteraf zeer waardevol gebleken voor *ThromboGenics NV* en we gebruiken het nog steeds. Al met al nog een geluk, want met het geld dat we in de aankoop van apparatuur en de ontwikkeling van de technologie gestopt hebben – in plaats van in de overname van CIL-aandelen – hebben we hetzelfde bereikt maar nu uitsluitend in eigen beheer. De moraal van dit verhaal laat ik aan de lezer over. Ik houd er zelf aan over dat een hoge rang in de financiële/industriële wereld geen garantie is voor hoge ethische waarden.

Thromb-X en de vakbond

Midden van de jaren 90 hadden we in *Thromb-X* een fulltime boekhouder die zijn job kende en voor dagelijkse onkosten volmacht had op de kredietkaart. Helaas bleek de man enkele keren kleine sommen voor eigen gebruik af te halen en dit te boeken door ‘aanpassing’ van handgeschreven facturen. Toen dit uitkwam en toegegeven werd door betrokkene, werd hij onmiddellijk voor dwingende redenen ontslagen. De vakbond zag dat echter anders en suggereerde betrokkene verder te ontkennen, zodat we uiteindelijk voor de arbeidsrechtbank gedaagd werden. Onze vraag om een handschriftanalyse te laten uitvoeren op de ‘bijgewerkte’ facturen werd door de handelsrechter niet aanvaard en we werden veroordeeld wegens ‘procedurefouten’ bij het ontslag. We moesten ongeveer 750 000 BEF schadevergoeding betalen. Blijkbaar hadden de vakbonden het er niet op begrepen dat een boekhouder die in de kas grabbelt dient ontslagen te worden zonder verbrekingsvergoeding.

ThromboGenics Ltd

Om de zoektocht naar vers kapitaal vlotter te laten verlopen zal later in Ierland *ThromboGenics Ltd* worden opgericht met een startkapitaal van \$ 1 miljoen. Op het ogenblik van die oprichting was de Ierse wetgeving soepeler voor het aantrekken van risicokapitaal. *ThromboGenics Ltd* zal onder andere fondsen aantrekken van *East Hill University Spinouts Fund*, *Biggar ltd* en de *D. Collen Research Foundation* maar verder verloopt de zoektocht naar kapitaal zeer moeizaam.

Het bleek zelfs onvermijdelijk om de controle over *Thromb-X* onder te brengen in *ThromboGenics Ltd* door omzetting van *Thromb-X* aandelen aan hun aanschafswaarde in een equivalent aandeel *ThromboGenics Ltd* aandelen aan vijf Ierse Pond per aandeel. Zelfs dan bleek het niet evident om risicokapitaal aan te trekken. Het ontwikkelen van t-PA voor de arme man is nu niet direct iets waar 'Venture Capital' of 'Business Angels' in geïnteresseerd zijn, *Landon Clay* en *East Hill* niet te na gesproken. Uiteindelijk zullen we er niet in slagen om € 40 miljoen bijeen te krijgen om de pivotale fase III-studie met staphylokinase versus streptokinase, bij 10 000 tot 15 000 patiënten met acuut myocardinfarct te financieren.

Een paar keer werd ons tijdens onze 'roadshows' zelfs op het hart gedrukt dat *ThromboGenics Ltd* een 'one trick pony' was en dat ons enig programma geen goede investering was voor risicokapitaalverschaffers die eigenlijk zeer 'risicoavers' zijn. Deze pijnlijke ervaring was een belangrijke reden om in *ThromboGenics* actief te beginnen werken aan een productenportefeuille. Op 30 mei 2006 richtten we met de twee grootste aandeelhouders *East Hill* en *Biggar Ltd*, de nv *ThromboGenics* op. De bedoeling was om via de beurs van Brussel het nodige geld op te halen om de ontwikkeling van onze inmiddels flink uitgebreide portefeuille aan kandidaatgeneesmiddelen verder te bekostigen. *Thromb-X* en *ThromboGenics Ltd* zullen uiteindelijk overgaan in *ThromboGenics nv*. Maar daarover later meer.

De D. Collen Research Foundation

Na de bittere ervaring met Innovi zoeken de K.U.Leuven, nu met Rector Roger Dillemans aan het hoofd, LR&D en ikzelf naar een alternatief om de royalty's uit rt-PA in goede banen te leiden. Er komt inderdaad wat wrevel op gang aan de K.U.Leuven tegen een mogelijke claim van uitvinders en/of medewerkers op maximaal 41,5 percent van de toekomstige t-PA inkomsten. Het wordt immers meer en meer duidelijk dat die inkomsten zeer aanzienlijk zullen worden.

We besluiten om een vereniging zonder winstoogmerk op te richten met de naam *D. Collen Research Foundation* (DCRF). Geleerd van de vorige fouten halen we er ook externe expertise bij in de persoon van Lawrence Fouraker de gewezen 'Dean' van de zeer gereputeerde *Harvard Business School* uit Boston in de Verenigde Staten. Dat Fouraker een functie als bestuurder in de *D. Collen Research Foundation* aanneemt en waardevol advies verleent, heb ik te danken aan mijn goede vriend Herman 'Chip' Gold. Fouraker was ooit slachtoffer van een hartaanval en door Chip behandeld met rt-PA. Fouraker vond dat hij 'iets moest terugdoen' voor de ontdekker van het geneesmiddel dat zijn leven had gered.

Gemeenschappelijk bestuurd

En zo gebeurt het dat op 2 juli 1988 in de rectorale salons van de K.U.Leuven volgende personen de *D. Collen Research Foundation* oprichten (zie bijlage 11):

- ikzelf, die door de vergadering ook als statutair voorzitter wordt benoemd;
- voor de K.U.Leuven Rector Roger Dillemans en algemeen beheerder Karel Tavernier, die elk een zitje krijgen in de raad van bestuur;
- voor Leuven Research & Development voorzitter Jacques Vander Eecken, die eveneens in de raad van bestuur terecht komt;
- voor de *Harvard Medical School* Lawrence Fouraker, die later in de raad van bestuur zal vervangen worden door Harvard cardioloog Herman Gold (zie ook hoofdstuk 'pre-klinisch t-PA-onderzoek').

De vereniging heeft tot doel *'met uitsluiting van enig winstoogmerk, het uitvoeren, bevorderen en ondersteunen van wetenschappelijk onderzoek in het algemeen en biomedisch en biotechnologisch onderzoek in het bijzonder, onder andere door het toekennen van onderzoekstoelagen, onderzoeksmandaten, reisbeurzen, het organiseren van wetenschappelijke congressen en symposia, financiële steun bij publicaties en alle aanverwante activiteiten die de bevordering van de wetenschap ondersteunen of doen uitstralen. In die zin mag zij ook op bijkomstige wijze alle andere economische activiteiten uitoefenen, inclusief het verwerven van roerende en onroerende goederen, op voorwaarde dat de opbrengst daarvan uitsluitend besteed wordt aan het hoofddoel.'*



Oprichting van de D. Collen Research Foundation in de rectorale salons van de K.U.Leuven met v.l.n.r. Rector Roger Dillemans, Prof. Karel Tavernier, Prof. Désiré Collen, Prof. Lawrence Fouraker en Prof. Jacques Vander Eecken.

In de statuten zouden we dit vertalen naar volgende gerichte doelstellingen:

- Het verlenen van studiebeurzen aan Belgische onderzoekers voor verdere specialisatie in het buitenland op het gebied van de biotechnologie en biomedische wetenschappen;
- Het aantrekken van uitmuntende onderzoekers op gebied van de moleculaire biologie voor het geven van lezingen aan de K.U.Leuven;
- Bijdragen tot de uitbouw van de biotechnologische infrastructuur aan de K.U.Leuven en in Vlaanderen;
- Het uitbouwen van een wetenschappelijke samenwerking op het gebied van de moleculaire biologie tussen de K.U.Leuven en de *Harvard Medical School*.

In de periode dat DCRF actief is, vanaf de oprichting in 1988 tot 2006 wanneer zij overgaat in *Life Science Research Partners*, wordt de hoofdmoot van de t-PA-royalty's op een stabiele manier, volgens afgesproken sleutels en in onderling overleg tussen de K.U.Leuven, LR&D en mezelf als volgt verdeeld: 5% gaat rechtstreeks naar de K.U.Leuven, 2% naar LR&D, 10% ging aanvankelijk naar de nv t-PA (zie vorig hoofdstuk) en zal vanaf 1994 overgedragen worden aan *Thromb-X*, terwijl 41,5% aan de Foundation toekomt. Van het overblijvende deel wordt de helft (20,75 % van het totaal) voor de rechtstreekse ondersteuning van het Centrum voor Trombose en Vasculair Onderzoek gebruikt. De andere helft wordt toegekend aan D. Collen en aan de laboratoria van Dick Rijken in Leiden

en Osamu Matsuo in Osaka, Japan. Dick en Osamu waren immers mede-uitvinders op het t-PA-octrooi en ze hadden recht op een afgesproken deel van de royalty's. In 1997 en 1998 worden de toekomstige t-PA royaltyrechten verkocht aan *Thromb-X* voor een totaal bedrag van 1,275 miljard BEF.

Activiteiten van DCRF

De activiteiten van de *D. Collen Research Foundation* worden op een open transparante manier weergegeven in de jaarverslagen. Die activiteiten zijn overigens heel divers. Een greep uit het aanbod:

- Over de jaren heen zijn bijna 100 afgestudeerden en jonge onderzoekers met ondersteuning van de Foundation naar het buitenland kunnen gaan voor verdere specialisatie. Aanvankelijk ging het uitsluitend om afgestudeerden van de K.U.Leuven, vanaf 1993 werkte de Foundation samen met de *Belgian American Educational Foundation (BAEF)* en kwamen ook studenten van andere universiteiten in aanmerking. Thans en nog voor de volgende vier jaar kunnen jaarlijks vier jonge onderzoekers zich verder bekwamen in de Verenigde Staten met een door de Foundation gesponsorde beurs.
- DCRF verleende substantiële steun aan de *International Society on Thrombosis and Haemostasis*. De *International Society for Fibrinolysis and Proteolysis* werd opgericht met een subsidie van \$50 000 van de Foundation.
- Enkele tientallen congressen en symposia die door Leuvense hoogleraren werden georganiseerd kregen sponsoring van DCRF.
- Mijn leermeester Marc Verstraete, die na zijn emeritaat 'leerstoelen' voor de K.U.Leuven heeft verzameld (thans voor een totaal bedrag van meer dan 1 miljard BEF) heeft mij overhaald om twee leerstoelen aan vijf miljoen BEF elk te financieren. Eén hiervan is blijkbaar naar het lab van Alfons Billiau gegaan, waarbij ik me de bedenking maak dat dit eigenlijk maar een minimale compensatie is voor zijn bijdrage aan het t-PA-verhaal.
- Belangrijke nationale symposia op het vlak van life sciences en biotechnologie, waaronder '*Life, a Nobel Story*' georganiseerd door de Sectie Biotechnologie van het KVCV en '*Knowledge for Growth*' georganiseerd door *FlandersBio* ontvingen substantiële steun.
- Het onderzoek van dr. Jean-Marie Saint-Remy, dr. Nobuo Nagai en dr. Bart De Geest aan het Centrum voor Moleculaire en Vasculaire Biologie van de K.U.Leuven werd gedurende enkele jaren gesubsidieerd vanuit DCRF.
- De 9^{de} verdieping van het onderzoeksgebouw op de Campus van het UZ Gasthuisberg werd gebouwd mede met fondsen van DCRF. Bij de bouw van het Centraal Dienstengebouw, gefinancierd door Volksgezondheid, kregen

we inderdaad de mogelijkheid om een bijkomende verdieping bovenop het gebouw te financieren. Voorwaarde was dat een gift van 75 miljoen BEF overgemaakt werd aan de K.U.Leuven voor bijkomende versteviging van de funderingen en het wind- en waterdicht afwerken van de bovenverdieping van 3600 m². In ruil zou dan 1/3 van de afwerkte ruimte ter beschikking komen van DCRF (de totale afwerking zou 225 miljoen BEF kosten), 1/3 zou ter beschikking komen van ons universitair onderzoekslabo (Centrum voor Moleculaire en Vasculaire Biologie) in ruil voor het verlaten van de ons toegewezen onderzoeksruidten op de 7^{de} verdieping van het oude gebouw. Het laatste 1/3 werd initieel niet toegekend maar heeft DCRF later voor de helft verworven als labruimte in ruil voor een gift van 38 miljoen BEF en de andere helft voor het afwerken van het ‘state of the art’ ‘*Specific Pathogen Free Animalium Marc Verstraete*’ met een kostprijs van ongeveer 200 miljoen BEF.

- Op vraag van sommige bestuursleden van DCRF werd de universiteit een financieel handje toegestoken, byb. om het Universitair Orkest (Nieuw Belgisch Kamerorkest, nadien Beethoven Academie) te steunen, de Bibliotheek van Godgeleerdheid overeind te houden, het tijdschriftenabonnement van de Faculteit Geneeskunde uit te breiden of het fruitteeltcentrum van de K.U.Leuven door een financieel moeilijke periode te loodsen. Een universiteit heeft nu eenmaal een voortdurend gebrek aan middelen en klopt graag aan poorten aan waarachter ze vermoedt dat er nog wat geld zit.

De belangrijkste activiteit van de *Protein Research Division* van LR&D vzw en van de *D. Collen Research Foundation* werd echter het ondersteunen van wetenschappelijk onderzoek, initieel in ons universitair lab (eerst Centrum voor Trombose en Vasculair Onderzoek en nadien Centrum voor Moleculaire en Vasculaire Biologie) en later ook ons VIB-departement (Centrum voor Transgene Technologie en Gentherapie, recent omgedoopt tot Vesalius Research Center). Gedurende een aantal jaren werden tot een 30-tal onderzoekers en technici gefinancierd en ongeveer één miljoen dollar werd gebruikt om in het begin van de 90’er jaren met Peter Carmeliet de transgene technologie in muizen van het *Whitehead Institute* naar Leuven over te brengen.

In 2005 wordt de wetgeving op de vzw’s gewijzigd en dienden de Statuten van de Foundation aangepast te worden. Ook is het gebruik van de woorden ‘Foundation’ of ‘Stichting’ in de naam van een vzw niet meer toegelaten. Daarom werd als nieuwe naam gekozen voor ‘*Life Sciences Research Partners, vzw*’. Ook is, door het overlijden van Lawrence Fouraker en meer recent Chip Gold, *Harvard University* niet langer lid en bestuurder van de nieuwe vereniging.

Een ‘niet-zó’ rijke, maar eigengereide professor?

Mijn privéjet

In een interview met het tijdschrift Knack liet ik me ooit ontvallen dat universitaire collega's vaak hebben geroddeld over mijn 'rijkdom'. Ik was in hun ogen de best verdienende prof van de K.U. Leuven. Soms ging het geroddel zó ver, dat het grappig werd. De meest bizarre overdrijving ontstond toen ik in de VS in 1992 een tweedehandsvliegtuigje kocht. Op Gasthuisberg werd al snel het verhaal verteld dat 'Collen zichzelf een privéjet had aangeschaft om voortaan sneller op zijn vergaderingen in de V.S. te zijn'. In werkelijkheid ging het om een tweedehandse Cessna 210 Centurion gebouwd in 1982. Dat is een eenmotorig propellertoestel waarmee je vooral pleziervluchten maakt en zeker niet op regelmatige basis de Atlantische Oceaan oversteekt, aangezien de normale autonomie slechts iets meer dan 1 000 km bedraagt. Het toestel kostte amper meer dan een flinke auto (en zeker minder dan een Ferrari of een Bentley). Het vliegtuigje kreeg als 'call-sign' OO-TPA, waarbij de OO staat voor België, en TPA voor de financieringsbron.



De Cessna Centurion bij zijn aankomst in Zwartberg (EBZW) na de overkomst uit de VS onder het Amerikaanse call sign (N9808Y). Piloten zijn Désiré Collen en ervaren tweede piloot Michel Notelaers in hun overlevingspak.

Het enige ware aan het roddelverhaal is dat ik het vliegtuig inderdaad in de VS heb gekocht. Er werd op de plaats van de achterzetels een tijdelijke brandstoftank gemonteerd en ik heb het eigenhandig de oceaan overgevlogen samen met mijn instructeur als ervaren tweede piloot (anders had ik voorwaar geen clearance gekregen voor een transatlantische vlucht met dit toestel). Echt boeiend was die overtocht van Goose Bay in Canada naar Keflavik in IJsland door het gebruik van de automatische piloot en de GPS niet, zodat ik een deel van de acht uur durende vlucht heb geslapen.

Een 'niet-zó' rijke, maar eigengereide professor?

Met de Cessna naar buitenlandse vergaderingen vliegen, is overigens geen goed idee. Ik heb het wel tweemaal gedaan, naar Stockholm en naar Genève, maar het toestel is weergevoelig en kan niet altijd opstijgen omwille van slechte weersomstandigheden. Het was echter ook nooit de bedoeling om de Cessna daarvoor te gebruiken.



Dezelfde Cessna na zijn immatriculatie in België met het nieuwe call sign 00-TPA.

Toen *East Hill* in 2001 tot het aandeelhouderschap van *ThromboGenics* toetrad met een investering van \$12,8 miljoen werd als voorwaarde gesteld dat, naast de gangbare *Director's Insurance* ook een *Key Man Insurance* op mijn hoofd genomen werd van \$10 miljoen. De redenering was dat indien er mij iets overkwam, er voldoende bijkomende middelen moesten zijn om een gepaste vervanger aan te trekken. Er werden uiteindelijk twee Amerikaanse verzekeringsmaatschappijen bereid gevonden om deze polis te onderschrijven, maar om de jaarlijkse premie beperkt te houden tot \$100 000, moest ik mij contractueel verbinden om alleen nog te vliegen met een tweede 'safety pilot' aan boord. Hierdoor is mijn bewegingsvrijheid en onafhankelijkheid om te vliegen sterk beperkt met als gevolg dat ik van een gemiddeld aantal vliegreizen per jaar van 70 in de periode vóór 2001 naar ternauwernood 15 ben gedaald sindsdien. Aan dit tempo is mijn vliegerij, gezien de vaste kosten, wel een dure hobby aan het worden. De *Key Man Insurance*-polis is na de beursgang van *ThromboGenics* in 2006 niet verlengd, maar inmiddels ben ik door gebrek aan routine niet meer voldoende zelfzeker om op eigen houtje buitenlandse vluchten uit te voeren.

Soms denk ik met weemoed terug aan 1997 toen ik met collega privaotpiloot en vriend Albert Degens aan de 'International Air Rally of Malta' deelnam en zo waar 2^{de} eindigde in de algemene rangschikking en 1^{ste} in de tijdvlucht (op zestien deelnemers).

Solidariteitskassen aan de K.U.Leuven

Ik heb me alleszins weinig van roddels over privéjets en andere stupiditeiten aangetrokken. Maar het vooroordeel van de ‘rijke prof’ heeft mij en mijn medewerkers ongetwijfeld geschaad. Er werd immers vaak gesteld dat Collen en zijn onderzoeksgroep geld genoeg hadden en dat ze dan ook maar niet moesten meedingen om onderzoeksfondsen van de universiteit, de Vlaamse Gemeenschap, en de federale overheid te verwerven. Sommigen lieten zich zelfs ontvallen dat ik beschaamd moest zijn om me nog in de competitie voor die schaarse onderzoekskredieten te mengen. Meerdere collega’s hebben mij deze boodschap ondubbelzinnig gebracht.

Ik heb die ‘goedbedoelde’ raadgevingen meestal naast mij neergelegd. Ik zie overigens nog steeds niet in waarom onze onderzoeksgroep niet mag meedingen naar alternatieve financiering. In de eerste plaats omdat de royalty’s uit rt-PA ooit zouden opdrogen. Immers de bescherming door het octrooi was eindig in de tijd. Bovendien had ik de bijkomende fondsen nodig om ons laboratorium te bevolken met talentvolle onderzoekers die op wereldniveau kunnen meedraaien. Onderzoekstalent laten ontbolsteren tot productieve wetenschappers heeft namelijk een prijs. Niet zozeer de wedde van de onderzoeker zelf, maar wel de omgeving waarin die onderzoeker terecht komt. Topwetenschap, tenminste in de ‘life sciences’, gedijt vandaag alleen in de best mogelijke faciliteiten (met ‘up-to-date’ apparatuur en technologie) en ondersteund door ervaren en getrainde technici (een groot deel van mijn vroegere technici en laboranten hadden meer dan twintig jaar onderzoekservaring). Bovendien moeten wetenschappers vandaag steeds meer teamspelers worden in plaats van individuele zonderlingen. Dat betekent dat je hen moet onderdompelen in een omgeving met voldoende kritische massa. En dat alles kost handenvol geld.

Bovendien is het bij het aanvragen van onderzoekskredieten niet alleen te doen om het geld, maar ook om het kwaliteitslabel en de netwerken. Laat me even als voorbeeld de Interuniversitaire Attractiepolen (IUAPs) geven die worden opgezet door het Federaal Wetenschapsbeleid. Het doel van deze programma’s is om steun te verlenen aan excellente onderzoeksequipes uit de verschillende gemeenschappen van ons land. De voorwaarde is wel dat deze groepen fundamenteel onderzoek verrichten in netwerkverband. In de periode 2007 tot 2011 worden er 44 van die netwerken ondersteund in de gebieden biologie, geneeskunde, scheikunde, fysica, toegepaste wetenschappen, historische wetenschappen, sociale wetenschappen en menswetenschappen. Stel even dat netwerk P6/30 ‘Bloedvatvorming en vaatwandbiologie in pathologie en geneeskunde’ het zonder de expertise van Peter Carmeliet en zijn team moet stellen. Dat hij onder het mom van ‘toch al voldoende geld te hebben’ zou uitgesloten worden uit dit netwerk. Dit zou internationaal tot wenkbrauwfronsen leiden en België als onderzoeksland een merkwaardige reputatie bezorgen.

Een 'niet-zó' rijke, maar eigengereide professor?

Net zo goed zou het op het ridicule af zijn mocht ons IUAP-project van tien jaar geleden dat 'een geïntegreerde aanpak voorstond om de onderliggende mechanismen van atherotrombose te bestuderen'¹⁷¹ het zonder onze onderzoeksgroep had moeten stellen.

Solidariteitsfonds – ronde 1

Ik besef dat mijn koppigheid ook een keerzijde heeft. Mijn deelname aan projecten als de IUAPs e. a. betekende dat andere onderzoekers van de K.U.Leuven uit de boot vielen. Voor dergelijke programma's werd meestal slechts een maximaal aantal Leuvense deelnemers toegelaten. Ik heb dan ook een paar keer genereus uit eigen buidel de kas van het 'IUAP-solidariteitsfonds' van de K.U.Leuven gespijst zodat deze waardevolle drinkelingen financieel gecompenseerd konden worden. Dat dit meestal niet op de meest elegante manier gebeurde, wil ik toch even illustreren.

De eerste keer dat ik meedeed aan de IUAP was in de tweede ronde (in 1990) met een groep bestaande uit ons universitair lab, de groep Cardiologie (Frans Van de Werf) in Leuven, en twee Amerikaanse groepen (cardiologie met Chip Gold uit het *Massachusetts General Hospital, Harvard University*, Boston en structuurchemie met Al Tulinski uit Minnesota). Buitenlandse groepen konden toen nog in het netwerk worden opgenomen maar niet gefinancierd met Belgische middelen. Voorwaarde om te mogen meedoen, opgelegd door Rector Roger Dillemans en Onderzoekscoördinator Herman Vanden Berghe, was echter dat ik 'slechts' een jaarlijks budget van vijf miljoen BEF (voorzien voor projecten uit humane wetenschappen) in plaats van twaalf miljoen BEF (voorzien voor duurdere projecten uit de biomedische wetenschappen) zou aanvragen.

De evaluatie van ons project in Brussel was positief, maar met een door de overheid opgelegde verplichting dat het als biomedisch project moest erkend worden met een ondersteuning van twaalf miljoen BEF per jaar. In Leuven werd ik er echter aan herinnerd dat ik akkoord was gegaan met een lagere financiering. Anderzijds kon ik de uitgebreide steun uit Brussel ook niet weigeren. Uiteindelijk heb ik 35 miljoen BEF (vijf jaar a rato van zeven miljoen BEF) uit de t-PA-rechten van ons lab in de kas van de onderzoeksraad gestopt.

¹⁷¹ Ischemische beschadiging van endotheel, oxidatie van LDL en atherotrombose, Onderzoeksproject P4/34 (IUAP Onderzoeksactie P4) , <http://www.belspo.be/belspo/fedra/proj.asp?l=nl&COD=P4/34>

Solidariteitsfonds – ronde 2

De volgende ronde in de IUAP waren de spelregels veranderd: in plaats van buitenlandse groepen moest het nu een netwerk zijn van groepen uit de beide Belgische gemeenschappen. Aangezien we hier ten lande nooit een competitieve kritische massa in ons domein van fibrinolyse en trombololyse zouden kunnen oplijnen, werd het geweer van schouder veranderd.

We dienden een nieuw project in (R4/34), ‘Ischemische beschadiging van endotheel, oxidatie van LDL en atherothrombose’ waarin mijn medewerker Paul Holvoet een belangrijke rol zou spelen en waarin we een netwerk vormden met drie Franstalige onderzoekslaboratoria, *Notre Dame de la Paix* in Namur met José Remacle en twee laboratoria van de *Université Catholique de Louvain* met Claude Remacle en Yves-Jacques Schneider. Eerst was er nog een Antwerpse groep bij, maar omdat de toenmalige Antwerpse decaan (die duidelijk een ‘Collen-complex’ had) dreigde de carrière van zijn eigen onderzoeker te boycotten indien hij met ons in een IUAP zou stappen, heeft deze getalenteerde collega zich – met tranen in de ogen – enkele uren voor het indienen van het project teruggetrokken.

Ons onderzoeksvorstel werd opnieuw goedgekeurd en dit keer voor de aangepaste financiering zodat ik dacht dat alles in kannen en kruiken was. Tot twee dagen later de toenmalige onderzoekscoördinator van de K.U.Leuven, een studiegenoot en buur, zowel privaat als met onze laboratoria, mij met nauwelijks verholen leedvermaak meldde dat wij misschien wel in Brussel erkend waren als IUAP-netwerk, maar dat dit niet gold voor Leuven. Als reden voerde hij aan dat de UCL haar twee participerende laboratoria als één beschouwde omdat ze, hoewel qua personeel en onderzoek gescheiden, op dezelfde verdieping gelokaliseerd waren en bepaalde apparatuur gezamenlijk gebruikten. Als de UCL-labs als één werden beschouwd, doken we onder het minimum vereiste aantal labs om een IUAP-netwerk te vormen.

Ik ben toen in een echte ‘franse colère’ geschoten – een van de weinige keren - en heb een onderhoud geëist met de leidende ambtenaar op de diensten van de eerste minister. Mijn collega schrok wat en zei dat hij zelf de zaak nog zou trachten recht te trekken. Liever dat dan dat ik publiekelijk kabaal ging maken rond een voor de universiteiten zo belangrijke financieringsbron als de IUAP. Enkele dagen later meldde hij mij dan ook triomfantelijk dat de UCL er zich bij neergelegd had dat haar twee participerende groepen als onafhankelijke laboratoria erkend werden en dat ze als UCL-satellieten van de IUAP financiering zou genieten (weliswaar ten koste van andere groepen aan de UCL).

In Leuven was er inmiddels echter een ander probleem gerezen. De gelden die naar de groep van Holvoet moesten gaan, waren ondertussen (schijnbaar) reeds toegezegd aan een groep uit de humane wetenschappen. Indien ik deze groep

Een 'niet-zó' rijke, maar eigengereide professor?

financierde zou iedereen gelukkig zijn, wij met ons IUAP-label en ons netwerk, en de groep die nu uit de boot zou vallen, met de levensnoodzakelijke alternatieve financiering. Dit soort oplossingen begint natuurlijk naar gesjoemel te ruiken, maar uiteindelijk heb ik toch 25 miljoen BEF uit onze afdeling in LR&D aan de onderzoeksraad overgemaakt omdat ik oordeelde dat het hiermee gefinancierde project inderdaad een belangrijke intrinsieke kwaliteit had.

Ik heb dit verhaal steeds discreet gehouden en neem zelfs aan dat de 'gesponsorde' collega nooit heeft geweten waar zijn/haar fondsen vandaan kwamen. Aan collega Holvoet heb ik de gang van zaken summier uitgelegd toen de beslissing voor ons IUAP-project eerst positief, dan negatief, en uiteindelijk toch positief was. De andere deelnemers aan ons netwerk hebben, voor zover ik mij herinner, hiervan nooit iets geweten.

Coup de théâtre en ontrechte insinuaties

Het verhaal kreeg echter nog een staartje. Ergens in 2004 schrijft Holvoet een brief aan de academische overheid waarin hij stelt dat hij in ons laboratorium misdeeld wordt wat betreft deelname aan de structurele middelen. Zelfs IUAP-middelen die aan hem toekwamen, werden door mij, als afdelingshoofd, naar andere groepen gedeveerd. Van die brief toonde hij eerst een kopie aan Jos Vermeylen en mezelf.

Toen ik hem herinnerde aan het 'losgeld' van 25 miljoen BEF dat ik voor zijn IUAP had betaald en dat verder al 'zijn' middelen onder 'zijn' controle besteed werden, viel hij min of meer uit de lucht. Het kwaad was echter geschied en er diende een andere thuishaven voor de groep rond collega Holvoet gezocht, waarbij hij alle middelen die hem toekwamen mocht meenemen.

Eind goed, al goed!? Niet helemaal. Bij de volgende IUAP-ronde moest het geheel opnieuw van schouder veranderd worden door het vertrek van Holvoet met zijn onderzoeksprogramma. Een nieuw onderzoeksvoorstel werd opgesteld rond Peter Carmeliet in het domein van de angiogenese (bloedvatvorming). De voorgestelde satelieten waren Michel Foidart / Agnes Noel uit Luik, Marc Mareel uit Gent, Dirk Brutsaert uit Antwerpen en Jean-Marie Boeynaems van de ULB.

Hoewel het project van zeer grote wetenschappelijke waarde was, gingen de poppen opnieuw aan het dansen. Dirk Brutsaert en Marc Mareel, hoewel internationaal erkende onderzoekers, waren minder dan vijf jaar voor hun emeritaat en werden op deze gronden gediskwalificeerd. De naaste medewerker van Dirk Brutsaert verhuisde naar Gent, waar men beweerde hem nog niet goed genoeg te kennen om hem reeds via een IUAP te financieren. In Luik kreeg men vanuit Leuven het signaal dat men niet meer in Collen wilde investeren omdat hij publieke universitaire middelen devieerde naar private industriële activiteiten

(Sic!!!). Toen de Luikse deelnemer Michel Foidart mij telefoneerde terwijl ik in de wachtzaal op het vliegveld van Rome op een terugvlucht wachtte en mij vertelde wat hij van zijn Rector vernomen had, kon ik mijn oren niet geloven. Voor zijn groep was er evenwel geen probleem, stelde Foidart, want de Universiteit van Luik, die wél respect had voor zijn onderzoek, zou hem desnoods wel reclaseren naar een andere IUAP, gezien hij thuis een solide erkenning genoot.

Het reële probleem in Leuven bleek echter dat er voor Paul Holvoet, in zijn nieuwe omgeving, geen alternatieve financiering beschikbaar was om zijn aflopende IUAP te compenseren. Daarom werd het verhaal bekostigd dat zijn deelname aan ‘onze’ IUAP het tekort aan groepen na de diskwalificatie van Mareel en Brutsaert zou remediëren. Ik heb hierop geweigerd nog woordvoerder voor de volgende IUAP te zijn en heb mijn jas aan de haak gehangen met de bedenking ‘trop is te veel en te veel c’est trop’.

De ongegronde insinuatie dat ik overheidsgeld naar private industriële doeleinden overhevelde was me zwaar in het verkeerde keelgat geschoten. Ik had enkele jaren voordien (in januari 2000) gevraagd om van gewoon hoogleraar over te gaan naar het buitengewoon kader (met 25% residuele wedde) en ik had ontslag genomen als adjunct-kliniekhoofd (omgevormd tot consultant 1/11 met 9% residuele wedde). Met dit verzoek wilde ik destijds de perceptie van overdreven cumul met mijn *Thromb-X*- en *ThromboGenics*-activiteiten ontzenuwen. De hierdoor vrijkomende middelen konden dan op een andere wijze in onze laboratoria gebruikt worden. Na de totaal onterechte insinuatie heb ik onmiddellijk mijn terugkeer van het buitengewoon naar het gewoon kader geactiveerd. Dit na vier jaar in plaats van de geplande zes jaar of definitief.

Alles samengenomen, zijn wij aan de K.U.Leuven relatief dun bediend met onderzoeksfondsen, zeker als je de output van ons laboratorium in rekening brengt. Als ik voor de zoveelste keer iets niet kreeg, ging het er wel eens hard tegen onzacht aan toe, en als puntje bij paaltje kwam, betaalde ik gewoon zelf. Vaak tot grote frustratie van de academische overheid want op die manier kreeg ze nooit vat op mij. Ik had mezelf onafhankelijk van hen gemaakt en eigenlijk maar goed ook.

Eerlijkheidshalve moet ik zeggen dat het tij in de post-Oosterlinck-periode gekeerd is. Mijn opvolgers zijn nu wel in de prijzen gevallen met Methusalem, Odysseus en Excellentiefinanciering, naast Europese en andere internationale financieringen. Gelukkig maar, want de t-PA-royalties zijn inmiddels opgedroogd.

Geen leerstoel en ...

In mijn hele carrière als professor heeft men mij in de faculteit geneeskunde nooit de kans gegeven om mijn talenten als lesgever tentoon te spreiden. Met mijn twee diploma’s – een PhD in de chemie en een MD/PhD in de geneeskunde –

Een 'niet-zó' rijke, maar eigengereide professor?

kwam ik in het begin helemaal niet aan de bak. De Faculteit Geneeskunde zag in mij een scheikundige en de Faculteit Wetenschappen een arts. Zij lieten hun vakken door 'hun eigen mensen' geven. De enige plaats waar ik ooit welkom was om les te geven, was op het 'sportkot' waar ik scheikunde en biochemie heb gedoceerd. Maar in de wetenschappen of geneeskunde heb ik mijn didactische kwaliteiten nooit kunnen botvieren. Toen ik er ooit tegen Rector Dillemans een opmerking over maakte, antwoordde die sussend: "Ach Désiré, blijf jij toch bij je onderzoek, dat doe je zo goed. De K.U.Leuven heeft vele anderen die ook les kunnen geven."

Op andere plaatsen schatte men blijkbaar mijn talenten hoger in: ik was tussen 1984 en 2005 '*Professor of Biochemistry and Medicine*' aan de *University of Vermont College of Medicine* in Burlington (VS) en tussen 1987 en 1994 '*Visiting Professor of Medicine*' aan de *Harvard Medical School* in Boston (VS). Af en toe heb ik mij toch afgevraagd of het afwijzen van een mogelijke carrière in *Harvard* wel mijn beste beslissing is geweest.

... geen rector

In het voorjaar van 1995 kreeg ik de, achteraf bekeken 'stupid', ingeving om me kandidaat te stellen voor het rectoraat. In feite werd het idee ingegeven door frustratie. Ik was in die periode heel vaak in Harvard waar ik talentvolle Leuvense jongeren als Peter Carmeliet, Wim Robberecht, Stefan Janssens en anderen zag passeren. Zij kregen allen de mogelijkheid om na hun postdoctorale training in de VS in het Harvard-systeem te blijven. Daartegenover stond dat ze thuis – in Leuven of op andere plaatsen in België – zeer weinig middelen kregen om hun onderzoekscarrière uit te bouwen (hoewel het de drie bovengenoemden uiteindelijk toch gelukt is). Dat frustreerde me, vandaar mijn kandidaatstelling. Ik meende dat ik als rector een impact kon hebben om onze universiteit tot een echte onderzoeksinstelling om te vormen.

De rectorverkiezing werd echter geen succes. Ik lag er in de eerste ronde al uit met slechts 15% van de stemmen. Ik heb uiteraard tegen sommige mensen de verkeerde dingen gezegd. Ik was ook niet zo'n 'belover'. Toen de studentenvertegenwoordigers kwamen vragen of ze meer zitjes konden krijgen in de Raad van Bestuur van de universiteit, antwoordde ik dat het al erg genoeg was dat er een meerderheid aan professoren in de Raad zat. Of toen men me op de Campus Kortrijk vroeg naar mijn visie over de uitbouw van de campus, ik me liet ontvallen dat deze campus beter zo snel mogelijk zou opgedoekt worden. In een debat voor studenten stelde ik onomwonden dat er 7000 studenten – die geen universitair niveau haalden – te veel waren in Leuven en toen ik mijn curriculum rondstuurde – waar toen enkele honderden onderzoeksartikels in wetenschappelijke tijdschriften en een kleine 100 reviews op stonden – werd dat door tal van collega's geïnterpreteerd als een uiting van opschepperij, eerder dan van mijn

engagement om van de K.U.Leuven een sterke onderzoeksuniversiteit te maken. Ook de nadruk die ik legde op de Universitaire Ziekenhuizen als economische regionale motor en dienstverleningscentrum werd door de academici uit de ‘zachtere’ sectoren niet in dank afgenomen. Bij de studenten sloeg ik een derde keer de bal mis omdat ik ‘geen weet had van specifieke problemen in de sociale sector’, temeer daar een ‘tuition fee’ (inschrijvingsgeld) van geeneens € 500, schril afstak tegen de investering van de maatschappij in een universitaire opleiding, zelfs als de gegadigden nadien sociale zekerheid en belastingen betaalden.

Vakschool en/of onderzoeksinstelling?

Ik heb er altijd een punt van gemaakt dat de Belgische universiteiten zich te veel als alleen ‘vakscholen’ profileren.¹⁷² We leveren goede artsen, economen, rechtsgeleerden, ingenieurs e.a. af. Maar aan de andere kant hebben we te weinig traditie op het vlak van creatief en competitief wetenschappelijk onderzoek en zijn we geen echte onderzoeksinstellingen. De universiteit wil de universiteit zijn van iedereen, maar dat botst met de ambitie om excellent onderzoek voort te brengen. Deze stelling werd in een onbewaakt moment zelfs luidop gesteld door Rector Oosterlinck tijdens een Raad van Bestuur van het VIB waaraan ik als waarnemer voor de Wetenschappelijke Directeurs deelnam, met de woorden: “Ik moet als rector niet alleen zorgen voor de primadonna’s van het onderzoek maar ook voor Piet en Paul en Jan.” Ik heb toen nog juist op mijn tong kunnen bijten om niet te zeggen dat ik aan de K.U.Leuven nooit een ‘Prima Donna’ geweest ben maar veeleer een ‘Assepoester’. Als je iedereen die boven het maaiveld uitsteekt, ook onmiddellijk wil wegmaaien en ondermaatse figuren blijft pampieren en ondersteunen is er een reëel probleem met onze universiteiten. Al moet ik eerlijkheidshalve wel toegeven dat Oosterlinck wel ernstig getracht heeft om het tweede probleem, tenminste voor sommige schrijvende gevallen, aan te pakken.

Het probleem is dat we voor iedereen goed willen doen. Akkoord, universiteiten zijn er om breed basisonderzoek te doen, in veel disciplines, maar je moet ook de durf hebben om programma’s te definiëren waarin je écht wil uitblinken en daar een aparte financiering voor te regelen. Ik geloof niet dat die denkwijze ondemocratisch is, hoewel lineair doorgetrokken democratie in mijn opinie een garantie is voor middelmatigheid. Overigens ben ik grote voorstander van democratie op regionaal, nationaal en Europees niveau. Hierdoor worden autocratische ontsporingen minder waarschijnlijk en groeien alle landen op middellange termijn naar elkaar toe. Het wordt zeer onwaarschijnlijk dat onze Lage Landen nog zullen dienen als oorlogstoneel zoals dat honderden jaren het geval is geweest, en de grenzen zullen gelukkig progressief vervagen, zelfs als we niet (nog niet?) het

¹⁷² Prionet E. Leuven wil geen klein Harvard zijn. Interview in Knack, 1 oktober 2008, 50-53.

Een 'niet-zó' rijke, maar eigengereide professor?

voordeel van een gemeenschappelijke taal hebben. De vraag is wel of we zelf nog echt willen mee timmeren aan het vergroten van onze kennis. Willen we over enkele decennia in Vlaanderen en Europa alleen nog de geneeskundige ontwikkelingen uit Harvard, Stanford of Johns Hopkins toepassen, of willen we zelf dingen ontwikkelen? Willen we uitvoerder zijn of componist? Dat is de keuze. Ik heb altijd gedacht dat de K.U.Leuven een klein Harvard kon zijn, de meerderheid van de academici wil dit duidelijk niet, want dat is een aanslag op hun comfortzone.

Gelukkig – en wellicht noodgedwongen – veranderen de tijden. Onder druk van buiten beginnen de begrippen 'evaluatie', 'audit', 'visitatie' stilaan ingang te vinden aan de Belgische universiteiten. Dat academici om de zoveel jaar geëvalueerd worden en hun prestaties – vooral op vlak van origineel onderzoek en geven van opleiding – getoetst en vergeleken worden met anderen, is in mijn ogen een normale zaak. We vinden het vandaag toch voor de hand liggend dat elke professional op regelmatige tijdstippen rekenschap aflegt van zijn of haar prestaties. Waarom zouden academici aan die regel ontsnappen?

In ieder geval was de K.U.Leuven tijdens de rectorverkiezing in 1995 niet klaar om te streven naar onderzoeksexcellentie. Nadat ik was afgevallen, heb ik de kandidatuur van André Oosterlinck gesteund omdat zijn programma het dichtst aansloot bij mijn ideeën. Van de toenmalige tegenkandidaat kon veeleer het tegenovergestelde worden verwacht.

Naar Londen

In 2000 heb ik mijn hoogleraarschap ingeleverd en mijn domicilie overgebracht naar Londen om van daaruit *ThromboGenics* Ltd te leiden. Ook in 2000 werd ik 'buitengewoon hoogleraar' – een functie met een beperkte (25%) bezoldiging. In 2004 heb ik mijn gewoon hoogleraarschap opnieuw opgenomen en mijn domicilie terug naar België gebracht, naar aanleiding van de IUAP-perikelen en -insinuaties. Natuurlijk leidde ik in die tussentijd nog wel het Centrum voor Moleculaire en Vasculaire Biologie en het VIB-departement (daarover later meer). Ik behield immers mijn bureel op Gasthuisberg. Logisch, want het bevond zich op de verdieping die ik zelf had meegefinancierd.

Overdracht van LR&D naar DCRF

Op initiatief van Rector Oosterlinck trok LR&D zich uit elke samenwerking met mij, ons laboratorium en *Thromb-X* terug. Mijn decennialange, en voor alle partijen vruchtbare samenwerking met LR&D, nam een einde op 20 juni 2001 met

de overdracht van het hele t-PA- en *Thromb-X*-dossier naar de *D. Collen Research Foundation*. Beide dossiers werden beheerd binnen de *Protein Research Division* van LR&D en die afdeling was eigenlijk niet meer gewenst binnen LR&D.

De overdracht en de opdoeking van de *Protein Research Division* kaderde volgens de notulen van de 20 juni-vergadering¹⁷³ in de ‘op korte termijn geplande reactivering van risicodragende valorisatie-activiteiten binnen LR&D en dit los van bestaande activiteiten van de *Protein Research Division* die op dat ogenblik de voornaamste activiteit van LR&D vzw uitmaakte. Deze overdracht impliceerde alle gelieerde activiteiten van de *Protein Research Division* met inbegrip van de medewerkers en personeel, uitrusting, octrooien en octrooi-aanvragen, een deel van de werkingsfondsen, de lopende research- en licentieovereenkomsten met en voor de K.U.Leuven en met derde contractspartijen’. LR&D is nadien echter een slapende vzw zonder noemenswaardige activiteiten gebleven.

De Raad van Beheer van LR&D merkt verder op dat ‘het doel van de vzw *D. Collen Research Foundation*’ enerzijds overeenkomt met dat van LR&D, en daarenboven wegens de specifieke nadruk op biomedisch en biotechnologisch onderzoek beter aangepast is aan de specifieke activiteiten van de *Protein Research Division van LR&D*’. In het licht van het non-profit oogmerk van de beide vzw’s, beslist de raad van beheer dan ook met eenparigheid van stemmen om de overdracht van de *Protein Research Division* van LR&D naar de vzw *D. Collen Research Foundation* goed te keuren en dit via een overdracht ten kostenloze titel. Deze overdracht wordt ondertekend door Raymond De Bondt, als voorzitter van LR&D, en verder de LR&D-bestuurders G. Langouche, G. Declercq, D. Collen en Rector A. Oosterlinck die ook als volmachthouder tekent voor de afwezige bestuursleden V. Goedseels, G. Mannaerts en R. Bouillon.

Na de ondertekening neem ik logischerwijze ontslag als bestuurder van LR&D. Hetgeen waar het uiteindelijk al de tijd om te doen was, want de echte reden was volgens mij dat ik als bestuurder problemen had met sommige transacties in LR&D. Ik wil echter de aandacht voor dit boek niet afleiden van de centrale thema’s door hier verder op in te gaan. Bovendien wens ik de huidige gang van zaken in KULRD, die onder invloed van Koen De Backere en zeer professionele, waardevolle en efficiënte technologietransferorganisatie geworden is, op geen enkele wijze in diskrediet te brengen. Het enige dat ik nog kwijt wil is dat ik met de *Protein Research Division* van LR&D niet ‘weggelopen’ maar ‘afgevoerd’ ben naar de *D. Collen Research Foundation*.

¹⁷³ Leuven Research & Development, Notulen van de vergadering van de raad van beheer gehouden op 20 juni 2001.

Anker toch niet gelicht

Uit al het voorgaande mag duidelijk zijn dat ik in de periode 1995-2005 met sommige bestuurders van de universiteit geleefd heb in wat het best omschreven kan worden als een LAT (living alone together)-relatie. Maar ik stond aan het hoofd van het Centrum voor Moleculaire en Vasculaire Biologie en was directeur van het VIB-departement Transgene Technologie en Gentechnologie (nu het Vesalius Research Center). Dat waren genoeg verantwoordelijkheden – vooral ten opzichte van al mijn medewerkers die mij duidelijk liever zagen blijven dan gaan – om het anker in Leuven niet definitief te lichten. Uit mijn ervaring in 1980, zoals in het eerste deel van dit boek beschreven, wist ik dat een carrière als klinisch bioloog in de periferie voor mij geen optie was.

Ik heb steeds getracht een loyaal partnerschap met onze voornaamste werkgevers-financiers te ontwikkelen. Met het VIB is dat, zoals verder wordt beschreven, na wat initiele strubbelingen perfect gelukt. Met de K.U.Leuven spijtig genoeg minder.

Misschien kan uit het bovenstaande de indruk ontstaan dat de rt-PA-royalty's vooral kommer en kwel, en ruzie en onenigheid met zich mee hebben gebracht. Dat is hoegenaamd niet zo. Mede en voornamelijk door de royalty's hebben we in Leuven baanbrekend onderzoek kunnen verrichten. Onderzoek dat leidde tot meer dan 650 originele onderzoeksartikels en bijna 200 reviews. Een groot aantal daarvan in toptijdschriften en meer dan 140 papers haalden 100 of meer citaties.

We hebben niet enkel doorbraakonderzoek verricht op het vlak van fibrinolyse en trombolysie, maar ook in domeinen als transgenese, angiogenese, hart- en vaat-aandoeningen, kanker, zenuwaandoeningen, gentherapie en andere. Onderzoek dat bovendien in de toekomst een reeks nieuwe geneesmiddelen kan opleveren die een veelvoud van de patiënten kunnen helpen in vergelijking met degenen die met rt-PA werden behandeld. Het gaat om middelen tegen hartaanvallen (stafylokinase), oogaandoeningen en beroertes (microplasmine), diepe veneuze trombose en longembolie (anti-FVIII), kanker (anti-PlGF) en andere. Hun ontwikkeling wordt in het vervolg van dit boek verder toegelicht.

Stafylokinase – t-PA voor arme mensen

Een déjà vu

Op het congres van de *International Society on Thrombosis and Haemostasis* in augustus 1989 in Tokyo vertelde Osamu Matsuo me over enkele *in vitro* experimenten die hij had uitgevoerd met de plasminogeenactivator uit de bacterie *Staphylococcus aureus*. Tot zijn verbazing was dit eiwit – stafylokinase genoemd – in staat een fibrineklonter in aanwezigheid van plasma op te lossen zonder dat het vrije circulerende fibrinogeen werd aangetast. Dit wees erop dat stafylokinase, naar analogie met t-PA, alleen plasminogeen activeerde als het gebonden was op de bloedklonter.

Onmiddellijk vroeg ik me af of stafylokinase een waardige opvolger kon zijn van t-PA. Stafylokinase is een bacterieel eiwit en de productie ervan zou een flink pak goedkoper zijn dan van een humaan eiwit als t-PA. Een deel van de hoge kostprijs voor rt-PA werd veroorzaakt doordat het eiwit in zoogdiercellen moest aangemaakt worden. Het nadeel is wel dat stafylokinase lichaamsvreemd is en dat na een eerste toediening het menselijk lichaam waarschijnlijk reageert met de aanmaak van antilichamen tegen het eiwit. Bij een tweede hartaanval reageert de patiënt mogelijk minder goed op stafylokinase.

Net als met t-PA waren we ook nu niet de eersten die stafylokinase in handen kregen. De fibrinolytische eigenschappen van bepaalde stammen van *Staphylococcus aureus* waren al rond 1950 beschreven¹⁷⁴ ¹⁷⁵ en het eiwit zelf werd afgezonderd in 1963.¹⁷⁶ Op het ogenblik van het gesprek met Osamu in Tokyo was het stafylokinase-gen zelfs al gekloneerd¹⁷⁷ en tot expressie gebracht in verschillende bacteriën, waaronder *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* en *Streptococcus sanguis*.¹⁷⁸

Over de fibrinolytische eigenschappen van het eiwit waren minder gunstige resultaten gepubliceerd. In 1964 hadden Jessica Lewis en John Wilson in Pittsburgh¹⁷⁹ ¹⁸⁰ een aantal honden behandeld met stafylokinase. Bij vier van de zes

¹⁷⁴ Lack CH. Staphylokinase; an activator of plasma protease. *Nature*. 1948; 161: 559.

¹⁷⁵ Lewis JH, Ferguson JH. A proteolytic enzyme system of the blood. III. Activation of dog serum profibrinolysin by staphylokinase. *Am J Physiol*. 1951; 166: 594-602.

¹⁷⁶ Glanville KL. A simple method of purifying staphylokinase. *Biochem J*. 1963; 88: 11-4.

¹⁷⁷ Sako T, Sawaki S, Sakurai T, Ito S, Yoshizawa Y, Kondo I. Cloning and expression of the staphylokinase gene of *Staphylococcus aureus* in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*. 1983; 190: 271-7.

¹⁷⁸ Behnke D, Gerlach D. Cloning and expression in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus sanguis* of a gene for staphylokinase--a bacterial plasminogen activator. *Mol Gen Genet*. 1987; 210: 528-34.

¹⁷⁹ Lewis JH, Kerber CW, Wilson JH. Effects of fibrinolytic agents and heparin on intravascular clot lysis. *Am J Physiol*. 1964; 207: 1044-8.

dieren was de bloedklonter geheel of gedeeltelijk opgelost, maar dit was gepaard gegaan met ernstige bloedingen. Zij besloten uit het experiment dat het eiwit flink toxisch was en dat nam bij veel onderzoekers de appetijt weg om verder met stafylokinase als potentieel tromboliticum te experimenteren.

Lab in overdrive

Matsuo en zijn Japanse collega's zouden hun experimenten een jaar later publiceren in het tijdschrift *Blood*.¹⁸¹ Ondertussen waren mijn medewerker Roger Lijnen en ikzelf al een intense samenwerking met Matsuo gestart rond stafylokinase. Roger en zijn team werkten zich uit de naad; er werden ontzaglijk veel uren geklopt en bijna elke reeks experimenten leidde tot een publicatie.

In een eerste reeks experimenten achterhaalden we het mechanisme van de plasminogeenactivering door stafylokinase.^{182 183 184} Het blijkt dat, in tegenstelling met t-PA, stafylokinase zelf geen enzymatische activiteit heeft.¹⁸⁵ Concreet wil dit zeggen dat plasminogeen niet geactiveerd wordt doordat stafylokinase plasminogeen knipt. Wel binden beide eiwitten met elkaar waardoor plasminogeen van structuur wijzigt en zijn actieve site vrijkomt. Dit stafylokinase/plasminogeen-complex zorgt zelf voor de activering van andere plasminogeneiwitten door ze te knippen tot plasmine.

Het activeringsmechanisme van stafylokinase lijkt bijzonder sterk op dat van streptokinase, alleen is streptokinase veel minder fibrineselectief dan stafylokinase. Als streptokinase gemengd wordt met menselijk plasma waaraan een bloedstolsel is toegevoegd, vormt het een complex met alle plasminogeen, zowel het vrij circulerend als het aan fibrine gebonden plasminogeen. Er ontstaat met andere woorden een kettingreactie waarbij na verloop van tijd alle plasminogeen geactiveerd wordt. De normale inhibitor van plasmine, α_2 -antiplasmin, raakt volledig uitgeput en de overmaat plasmine begint naast fibrine ook andere eiwitten te knippen waaronder fibrinogeen. Op die manier raakt het normale bloedstollingsstelsel compleet van slag.

¹⁸⁰ Lewis JH, Shirakawa M. Effects of fibrinolytic agents and heparin on blood coagulation in dogs. *Am J Physiol.* 1964; 207: 1049-52.

¹⁸¹ Matsuo O, Okada K, Fukao H, Tomioka Y, Ueshima S, Watanuki M, Sakai M. Thrombolytic properties of staphylokinase. *Blood.* 1990; 76: 925-9.

¹⁸² Lijnen HR, Van Hoef B, De Cock F, Okada K, Ueshima S, Matsuo O, Collen D. On the mechanism of fibrin-specific plasminogen activation by staphylokinase. *J Biol Chem.* 1991; 266: 11826-32.

¹⁸³ Lijnen HR, Van Hoef B, Matsuo O, Collen D. On the molecular interactions between plasminogen-staphylokinase, alpha 2- antiplasmin and fibrin. *Biochim Biophys Acta.* 1992; 1118: 144-8.

¹⁸⁴ Lijnen HR, De Cock F, Matsuo O, Collen D. Comparative fibrinolytic and fibrinogenolytic properties of staphylokinase and streptokinase in plasma of different species in vitro. *Fibrinolysis.* 1992; 6: 33-7.

¹⁸⁵ Collen D, Schlott B, Engelborghs Y, Van Hoef B, Hartmann M, Lijnen HR, Behnke D. On the mechanism of the activation of human plasminogen by recombinant staphylokinase. *J Biol Chem.* 1993; 268: 8284-9.

Als stafylokinase wordt gemengd met plasma waaraan een stolsel is toegevoegd, reageert het nauwelijks met vrij circulerend plasminogeen, maar wel heel sterk met plasminogeen dat gebonden is aan het fibrineoppervlak. Zolang het stafylokinase/plasminogeencomplex gebonden blijft op fibrine wordt het nauwelijks geïnactiveerd door α_2 -antiplasmin. Van zodra het echter in oplossing komt, wordt het snel geneutraliseerd.

Met stafylokinase hadden we met andere woorden een eiwit in handen dat bloedklonters oplost volgens hetzelfde mechanisme als streptokinase, maar met de fibrinespecificiteit van t-PA. Het netwerk van moleculaire interacties tussen stafylokinase, plasminogeen, plasmin, α_2 -antiplasmin en fibrine is uniek en tot nu toe bij geen enkel ander trombolytisch eiwit teruggevonden.^{186 187 188}

Kloon en gen

Omdat we niet zeker waren van een constante en voldoende hoge aanvoer van stafylokinase vanuit Japan, kloneerden we zelf het gen rechtstreeks uit een lysogene stam van *Staphylococcus aureus*¹⁸⁹ om op die manier onze eigen productie op te zetten. Daaruit vloeiden een reeks studies voort over de gen- en eiwitstructuur van stafylokinase. Het gen codeert voor een eiwit van 163 aminozuren dat tot een matuur eiwit van 136 aminozuren wordt omgevormd met een enkelvoudige eiwitketen zonder zwavelbruggen.¹⁹⁰ Het zal nog tot 1997 duren vooraleer de drie dimensionale structuur van het eiwit wordt gepubliceerd.¹⁹¹

¹⁸⁶ Lijnen HR, Van Hoef B, Vandenbossche L, Collen D. Biochemical properties of natural and recombinant staphylokinase. *Fibrinolysis*. 1992; 6: 412-25.

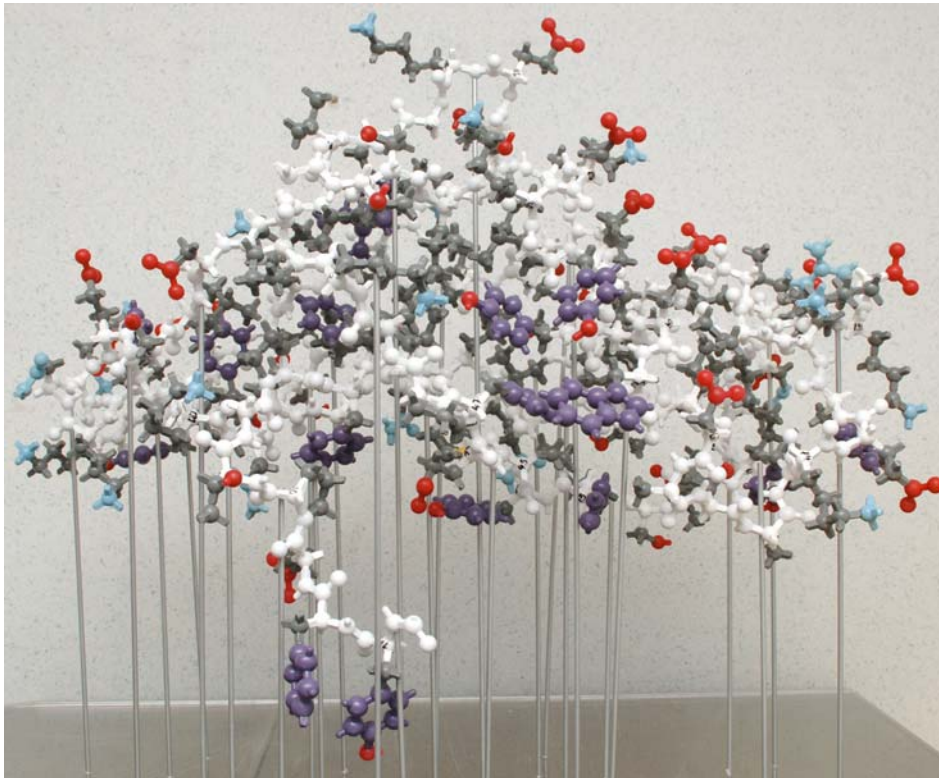
¹⁸⁷ Silence K, Collen D, Lijnen HR. Regulation by alpha 2-antiplasmin and fibrin of the activation of plasminogen with recombinant staphylokinase in plasma. *Blood*. 1993; 82: 1175-83.

¹⁸⁸ Silence K, Collen D, Lijnen HR. Interaction between staphylokinase, plasmin(ogen), and alpha 2-antiplasmin. Recycling of staphylokinase after neutralization of the plasmin-staphylokinase complex by alpha 2-antiplasmin. *J Biol Chem*. 1993; 268: 9811-6.

¹⁸⁹ Collen D, Silence K, Demarsin E, De Mol M, Lijnen HR. Isolation and characterization of natural and recombinant staphylokinase. *Fibrinolysis*. 1992; 6: 203-13.

¹⁹⁰ Collen D., Zhao ZA, Holvoet P, Marijnen P. Primary structure and gene structure of staphylokinase. *Fibrinolysis* 1992; 6: 226-231.

¹⁹¹ Rabijns A, De Bondt HL, De Ranter C. Three-dimensional structure of staphylokinase, a plasminogen activator with therapeutic potential. *Nat Struct Biol*. 1997; 4: 357-60.



Structuurmodel van stafylokinase.

Preklinisch onderzoek

Onmiddellijk na de ontmoeting met Matsuo in Tokyo voerden we in twee diermodellen voor veneuze trombose – hamster en konijn – een vergelijkende studie uit tussen de trombolytische en farmacokinetische eigenschappen van stafylokinase en streptokinase.¹⁹² De eerste resultaten wezen erop dat stafylokinase een potent trombolytisch geneesmiddel is met een even goede activiteit als streptokinase. De resultaten waren van die aard dat een investering in bijkomend onderzoek aangewezen was.

¹⁹² Lijnen HR, Stassen JM, Vanlinthout I, Fukao H, Okada K, Matsuo O, Collen D. Comparative fibrinolytic properties of staphylokinase and streptokinase in animal models of venous thrombosis. *Thromb Haemost.* 1991; 66: 468-473.

Experimenten in de reageerbuis met plasma van mens, baviaan, konijn, hamster, rat en hond lieten heel verrassende resultaten zien¹⁹³: het fibrinolytisch plasma-systeem van bavianen, konijnen en hamsters bleek op stafylokinase te reageren zoals dat van de mens. Het systeem bij de rat bleek resistent – stafylokinase slaagde er nauwelijks in om bloedklonters op te lossen. Bij honden ging stafylokinase volkomen uit de bocht: het was een veel sterkere plasminogeenactivator die bovendien totaal niet fibrinespecifiek was. Verder onderzoek wees nog uit dat het α_2 -antiplasmine van honden het complex stafylokinase/plasmine tien keer minder snel inactiveert dan menselijk α_2 -antiplasmine. Dit experiment geeft meteen een verklaring voor de minder gunstige trombolyseresultaten die Jessica Lewis en John Wilson in 1964 hadden bekommen¹⁹⁴ ¹⁹⁵ bij hun honden. De hypothese die decennialang de ronde deed dat stafylokinase ook bij mensen massaal zou leiden tot ernstige bloedingen naar analogie met de hondenexperimenten, berustte op een misverstand. Honden waren gewoon ongeschikt als preklinisch model om de trombolytische activiteit van stafylokinase te bestuderen. Het onderzoek naar stafylokinase had met andere woorden meer dan 25 jaar ten onrechte stilgelegen.

In ons laboratorium zou Jean-Marie Stassen er op overtuigende wijze in slagen om de *in vivo* trombolytische eigenschappen van stafylokinase in diverse proefdiermodellen aan te tonen. In hamsters met longembolie was de trombolytische activiteit van stafylokinase vergelijkbaar met die van streptokinase.¹⁹⁶ Wanneer we bloedstolsels gebruikten die verrijkt waren met bloedplaatjes (1,5 miljoen plaatjes per microliter) was stafylokinase zelfs vijf keer actiever. Dat is belangrijk want trombi die een hartslagader blokkeren, bevatten meestal veel bloedplaatjes.

Ook bij bavianen kon Jean-Marie Stassen aantonen dat intraveneus toegediend stafylokinase minstens even goed bloedklonters oplost als streptokinase.¹⁹⁷ Ook nu weer werden klonters rijk aan bloedplaatjes beter opgelost door stafylokinase dan door streptokinase. Bovendien wekte stafylokinase minder snel antilichamen op en lokte het minder allergische reacties uit.

De eerste patiënt

Midden 1992 waren we klaar om de eerste patiënt met stafylokinase te behandelen. Dat was minder dan drie jaar na het gesprek met Matsuo. Op drie jaar tijd hadden we in ons eigen laboratorium het actiemechanisme van stafylokinase vol-

¹⁹³ Lijnen HR, De Cock F, Matsuo O, Collen D. Comparative fibrinolytic and fibrinogenolytic properties of staphylokinase and streptokinase in plasma of different species in vitro. *Fibrinolysis*. 1992; 6: 33-7.

¹⁹⁴ Lewis JH, Kerber CW, Wilson JH. Effects of fibrinolytic agents and heparin on intravascular clot lysis. *Am J Physiol*. 1964; 207: 1044-8.

¹⁹⁵ Lewis JH, Shirakawa M. Effects of fibrinolytic agents and heparin on blood Coagulation in dogs. *Am J Physiol*. 1964; 207: 1049-52.

¹⁹⁶ Collen D, De cock F, Vanlinthout I, Declerck PJ, Lijnen HR, Stassen JM. Comparative thrombolytic and immunogenic properties of staphylokinase and streptokinase. *Fibrinolysis*. 1992; 6: 232-42.

¹⁹⁷ Collen D, De Cock F, Stassen JM. Comparative immunogenicity and thrombolytic properties toward arterial and-venous thrombi of streptokinase and recombinant staphylokinase in baboons. *Circulation*. 1993; 87: 996-1006.

ledig ontrafeld, de biochemische karakteristieken van stafylokinase met al zijn bindingspartners – fibrine, plasminogeen, plasmine, α_2 -antiplasmine – in kaart gebracht, het gen gekloneerd en tot expressie gebracht, een reeks preklinische studies uitgevoerd én zuiver recombinant eiwit geproduceerd dat gebruikt kon worden in klinische studies.¹⁹⁸ Dat is een prestatie die mag gezien worden.

Op 25 juni 1992 behandelde Frans Van de Werf in Leuven de eerste hartpatiënt met recombinant stafylokinase – we zouden het product SakSTAR noemen. In dezelfde prospectieve studie zouden nog vier patiënten volgen.¹⁹⁹ Elk van hen kreeg intraveneus 10 mg SakSTAR toegediend over een periode van 30 minuten. In vier van de vijf patiënten was gehele of gedeeltelijke trombolysie opgetreden na 40 minuten. Het plasmafibrinogeen en de waarde aan α_2 -antiplasmine bleven na de behandeling ongewijzigd. Wel werden na twee weken antilichamen teruggevonden in het bloed van alle patiënten, een element dat we verder moesten opvolgen. Deze eerste klinische tests waren een onverhoopt succes (zie bijlage 12).

Thromb-X en ThromboGenics

Om stafylokinase verder te ontwikkelen, werd door de *Protein Research Division* van *Leuven Research & Development* en mezelf de n.v. *Thromb-X* opgericht (zie ook vorig hoofdstuk). We traden als gelijke partners op en brachten elk de helft van het kapitaal in. Aanvankelijk zouden de fondsen die *Thromb-X* ter beschikking had voor het stafylokinase-onderzoek komen uit het recht op 10 % van de royalty's op rt-PA, maar het lag wel in mijn bedoeling om andere partners aan te trekken zodat we tegen redelijke voorwaarden aan voldoende financiële middelen konden geraken om van stafylokinase een volwaardig geneesmiddel te maken. Om die zoektocht naar bijkomend kapitaal tot een goed einde te brengen, richtte ik eind 1997 samen met enkele partners *ThromboGenics Ltd.* op in Dublin, Ierland.

Hulp van buitenaf

Hoewel we intern een huzarenstukje hadden geleverd, besepte ik dat we hulp van buitenaf moesten halen om stafylokinase verder te ontwikkelen. We liepen immers tegen de limieten van onze eigen mogelijkheden aan: onze methode voor de aanmaak van recombinant stafylokinase was niet robuust genoeg om voldoende eiwit te produceren voor de klinische studies die op het programma stonden.

¹⁹⁸ Collen D, De Mol M, Demarsin E, De Cock F, Stassen JM. Isolation and conditioning of recombinant staphylokinase for use in man. *Fibrinolysis*. 1993; 7: 242-7.

¹⁹⁹ Collen D, Van de Werf F. Coronary thrombolysis with recombinant staphylokinase in patients with evolving myocardial infarction. *Circulation*. 1993; 87: 1850-3.

Ik zocht een uitweg bij de voormalige groep van Detlev Behnke aan het *Institute for Molecular Biology (IMB)* in Jena (Duitsland) die een expressiesysteem in *E. coli* had ontwikkeld waarmee uitzonderlijk hoge opbrengsten van stafylokinase konden bekomen worden.²⁰⁰

Er was initieel wel wat aarzeling van mijn kant toen bleek dat Detlev Behnke bij de eenmaking van Duitsland zijn job verloren had omdat hij een Stasi-verleden had. Zijn naaste medewerkers, die aan zijn vroeger instituut werkzaam gebleven waren, verzekerden mij echter dat Behnke nooit een echte collaborateur van de Stasi geweest was, maar de schijn gaf dat hij het spel meespeelde om meer bewegingsvrijheid voor onder meer reizen naar het buitenland te krijgen.

Bovendien bleek dat het *IMB* de stafylokinase know-how en octrooiaanvraag reeds uitgelicentieerd had aan een farmaceutisch bedrijfje *medac GmbH* uit Hamburg. Na een periode van onderhandelen werd een samenwerkingsovereenkomst afgesloten tussen *Thromb-X* en *medac* in december 1992 waarin “*medac GmbH accepts to transfer in full property all its present and future staphylokinase patent applications to Thromb-X NV. In exchange, medac GmbH shall become the owner of 5% of all shares of Thromb-X NV and shall obtain an irrevocable exclusive marketing and distribution license for an indefinite period in Germany, at a royalty rate of 3% of its net sales*”.

De samenwerking met de Duitsers verliep oorspronkelijk zeer vlot. Het in Jena geproduceerde materiaal werd gebruikt om diverse bijhorende biochemische en initiële klinische studies uit te voeren.^{201 202 203 204} In oktober 1993 voelden de uitvinders in Jena zich echter misdeeld. Zij hadden een overeenkomst met *medac* afgesloten waarin hen een royalty op de verkoop door *medac* toegezegd was en zij wensten dit uitgebreid te zien buiten het medacterritorium. Uiteindelijk werd, mede doordat het werk zo goed vooruitging, een compromis bereikt waarbij ik hen, uit mijn eigen aandelenbestand, 5% van alle *Thromb-X* aandelen gratis aanbod, waarmee zij blijkbaar zeer gelukkig waren.

²⁰⁰ Schlott B, Hartmann M, Gührs KH, Birch-Hirschfeld E, Pohl HD, Vanderschueren S, Van de Werf F, Michael A, Collen D, Behnke D. High yield production and purification of recombinant staphylokinase for thrombolytic therapy. *Biotechnology* 1994; 12: 185-9.

²⁰¹ Collen D, Van Hoef B, Schlott B, Hartmann M, Gührs KH, Lijnen HR. Mechanisms of activation of mammalian plasma fibrinolytic systems with streptokinase and with recombinant staphylokinase. *Eur J Biochem.* 1993; 216: 307-14.

²⁰² Collen D, Schlott B, Engelborghs Y, Van Hoef B, Hartmann M, Lijnen HR, Behnke D. On the mechanism of the activation of human plasminogen by recombinant staphylokinase. *J Biol Chem.* 1993; 268: 8284-9.

²⁰³ Lijnen HR, De Cock F, Van Hoef B, Schlott B, Collen D. Characterization of the interaction between plasminogen and staphylokinase. *Eur J Biochem.* 1994; 224: 143-9.

²⁰⁴ Schlott B, Hartmann M, Gührs KH, Birch-Hirschfeld E, Gase A, Vettermann S, Collen D, Lijnen HR. Functional properties of recombinant staphylokinase variants obtained by site-specific mutagenesis of methionine-26. *Biochim Biophys Acta.* 1994; 1204: 235-42.

In maart 1996, toen wij volop aan het onderhandelen waren met een groot farmabedrijf betreffende een exclusieve licentie op stafylokinase kwam de aap echter uit de mouw. In mei 1993 hadden *medac* en de uitvinders een overeenkomst afgesloten waarbij hen in totaal 4% royalty's op de nettoverkoop toegezegd werd en "*Sollte medac den Vertragsgegenstand an Dritte veraussern, so hat medac für die Übernahme der in diesen Vereinbarung enhalteren Rechten und Pflichten Sorge zu tragen*". Tot onze stomme verbazing bleek dat de uitvinders zowel als *medac* bij het afsluiten van onze overeenkomsten en de overdracht van aandelen deze essentiële informatie achtergehouden hadden, wat klaarblijkelijk met bedriegelijke intenties gebeurd was en waardoor het stafylokinaseproject onverkoopbaar werd. Ik heb toen van lieverlede alle royaltyrechten en *Thromb-X*-aandelen van de Jena-uitvinders teruggekocht voor de totale som van 26 miljoen BEF, waarna ik in een poging om het stafylokinaseproject te redden, hun exorbitante royaltyclaim ten opzichte van *Thromb-X* liet vallen. Het vertrouwen was echter volledig verdwenen en in augustus 1999 kocht *Thromb-X* alle rechten van *medac* terug voor \$ 1 miljoen en kocht de *DCRF* al hun aandelen in *Thromb-X* voor 14,8 miljoen BEF. Deze termination agreement bevatte een clausule "*medac irrevocably guarantees that it shall hold Thromb-X NV harmless of any proprietary or financial claim relating thereto and including inventor rights from the patents and applications transferred to Thromb-X*".

Ik heb dus in mijn opinie een claim van 26 miljoen BEF, waarmee ik de jongens uit Jena uitgekocht had, die langs deze overeenkomst aan *medac* tegenstelbaar is, en die ik ook heb trachten af te dwingen. Het kwam echter tot een arbitrage waarin door de arbiter besloten werd dat de claim van D. Collen op *medac* losstond van de termination agreement tussen *Thromb-X* en *medac*. Ik heb zelfs een procedure tegen *medac* gestart bij de handelsrechtbank in Leuven, maar toen bleek dat *medac* *Thromb-X* als derde partij in deze zaak zou betrekken, heb ik mede op advies van onze toenmalige hoofdaandeelhouders in *ThromboGenics Ltd* (intussen 100% moedermaatschappij van *Thromb-X*), de zaak laten uitdoven. Uit dit verhaal mag blijken dat oneerlijkheid soms wel loont, tenminste als men weinig of geen scrupules of principes heeft. Uiteraard hebben wij sinds deze ontluisterende ervaring alle contacten met *medac* en Jena verbroken. De verdere ontwikkelingen van stafylokinase, waarvan wij tenminste alle know-how en intellectuele rechten nu in volle eigendom hebben, worden volledig onder eigen beheer doorgevoerd. Na alle tribulaties blijf ik er van overtuigd dat stafylokinase een goedkoop levensreddend geneesmiddel zou kunnen zijn.

Klinische studies

Een eerste gerandomiseerde studie²⁰⁵ met stafylokinase waaraan 100 patiënten deelnamen, greep plaats in zeven Belgische ziekenhuizen. Naast het UZ Gasthuisberg namen ook het AZ Middelheim (Antwerpen), AZ Imelda (Bonheiden), AZ St-Jan (Genk), AZ St.-Elisabeth (Ukkel), AZ St-Jan (Brugge) en het AZ Virga Jesse (Hasselt) deel. Van de 100 patiënten met een hartaanval kregen er 52 rt-PA, zij dienden als vergelijkingsgroep. Verder kregen 25 patiënten 10 mg SakSTAR en 23 patiënten 20 mg SakSTAR. De conclusie van het onderzoek was dat recombinant stafylokinase even effectief is voor vroege trombolysie bij een hartinfarct als rt-PA voor wat betreft het herstel van de bloeddoodstroming. Bovendien bleek stafylokinase beduidend meer fibrinespecifiek te zijn dan rt-PA. Nadien behandelden we nog vijf patiënten met een dosis van 40 mg SakSTAR, wat tot nog overtuigender resultaten leidde.

Vervolgens werd op dertien patiënten een pilootstudie uitgevoerd met een 'bolus'-injectie van stafylokinase in plaats van een continu infuus.²⁰⁶ Deze studie werd gevolgd door een vergelijkende studie tussen rt-PA (52 patiënten) en een dubbele bolus van 15 mg stafylokinase (50 patiënten) met een tussenpauze van 30 minuten.²⁰⁷ Complete reperfusie na 90 minuten werd bekomen in 68% van de patiënten die stafylokinase kregen ten opzichte van 57% van de patiënten behandeld met rt-PA.

Bijkomend voerden we ook een klinische test uit op een groep van 30 patiënten met perifere arteriële occlusies.²⁰⁸ Bij 25 onder hen trad volledige reperfusie op, bij twee partiële.

Immunogene karakter

Stafylokinase is een eiwit dat vreemd is voor ons lichaam. Dat betekent dat we antistoffen aanmaken als we geconfronteerd worden met het bacteriële eiwit. Bovendien kunnen mensen die nooit behandeld werden met stafylokinase toch al, hoewel doorgaans zeer lage hoeveelheden, antilichamen hebben omdat ze

²⁰⁵ Vanderschueren S, et al. A randomized trial of recombinant staphylokinase versus alteplase for coronary artery patency in acute myocardial infarction. The STAR Trial Group. *Circulation*. 1995; 92: 2044-9.

²⁰⁶ Vanderschueren S, Collen D, van de Werf F. A pilot study on bolus administration of recombinant staphylokinase for coronary artery thrombolysis. *Thromb Haemost*. 1996; 76: 541-4.

²⁰⁷ Vanderschueren S, Dens J, Kerdsinchai P, Desmet W, Vrolix M, De Man F, Van den Heuvel P, Hermans L, Collen D, Van de Werf F. Randomized coronary patency trial of double-bolus recombinant staphylokinase versus front-loaded alteplase in acute myocardial infarction. *Am Heart J*. 1997; 134: 213-9.

²⁰⁸ Vanderschueren S, Stockx L, Wilms G, Lacroix H, Verhaeghe R, Vermeylen J, Collen D. Thrombolytic therapy of peripheral arterial occlusion with recombinant staphylokinase. *Circulation*. 1995; 92: 2050-7.

ooit een infectie met *Staphylococcus aureus* hebben doorgemaakt. Dit zou er kunnen toe leiden dat patiënten allergisch reageren op een behandeling met stafylokinase of dat het toegediende stafylokinase wordt geneutraliseerd.

Op zich is het voorkomen van dergelijke antilichamen niet onoverkomelijk, want hetzelfde fenomeen doet zich ook voor met streptokinase, terwijl dat als trombolytisch geneesmiddel al aan honderdduizenden patiënten is gegeven. Toch hebben we, in parallel met het biochemisch, preklinisch en klinisch onderzoek ook een onderzoekslijn opgezet die het immunogene karakter van stafylokinase onder de loep nam.

Allereerst zagen we dat in de algemene bevolking het voorkomen van antilichamen tegen stafylokinase lager is dan voor streptokinase.^{209 210} Bovendien waren we uit het klinisch onderzoek op 300 patiënten te weten gekomen dat ernstige allergische reacties tegen recombinant stafylokinase niet voorkomen of tenminste zeer zeldzaam zijn. Anderzijds was wel aangetoond dat de meeste behandelde patiënten neutraliserende antilichamen aanmaakten, zodat ‘herbehandeling’ voor een twee of derde infarct minder efficiënt zou verlopen.

Daarom hebben we ook pogingen ondernomen om het immunogene karakter van stafylokinase te onderdrukken via ‘site-directed mutagenesis’, het plaatsgericht aanbrengen van mutaties in het stafylokinasegen. We slaagden erin om verscheidene varianten van SakSTAR te genereren die veel minder snel antilichamen opwekken maar toch eenzelfde activiteitsprofiel behouden.^{211 212 213 214 215}

²⁰⁹ Declerck PJ, Vanderschueren S, Billiet J, Moreau H, Collen D. Prevalence and induction of circulating antibodies against recombinant staphylokinase. *Thromb Haemost.* 1994; 71: 129-33.

²¹⁰ Vanderschueren SM, Stassen JM, Collen D. On the immunogenicity of recombinant staphylokinase in patients and in animal models. *Thromb Haemost.* 1994; 72: 297-301.

²¹¹ Collen D, Bernaerts R, Declerck P, De Cock F, Demarsin E, Jenné S, Laroche Y, Lijnen HR, Silence K, Verstreken M. Recombinant staphylokinase variants with altered immunoreactivity. I: Construction and characterization. *Circulation.* 1996; 94: 197-206.

²¹² Collen D, Moreau H, Stockx L, Vanderschueren S. Recombinant staphylokinase variants with altered immunoreactivity. II: Thrombolytic properties and antibody induction. *Circulation.* 1996; 94: 207-16.

²¹³ Collen D, De Cock F, Demarsin E, Jenné S, Lasters I, Laroche Y, Warmerdam P, Jespers L. Recombinant staphylokinase variants with altered immunoreactivity. III: Species variability of antibody binding patterns. *Circulation.* 1997; 95: 455-62.

²¹⁴ Collen D, Stockx L, Lacroix H, Suy R, Vanderschueren S. Recombinant staphylokinase variants with altered immunoreactivity. IV: Identification of variants with reduced antibody induction but intact potency. *Circulation.* 1997; 95: 463-72.

²¹⁵ Laroche Y, Heymans S, Capaert S, De Cock F, Demarsin E, Collen D. Recombinant staphylokinase variants with reduced antigenicity due to elimination of B-lymphocyte epitopes. *Blood.* 2000; 96: 1425-32.

Kortom, rond de eeuwwisseling stonden we klaar om het grotere klinische studiewerk aan te vatten. De zoektocht van *Thromb-X* en *ThromboGenics Ltd.* naar partners en bijkomende financiële middelen, verliep echter minder vlot dan gehoopt. Het werd duidelijk dat we daarvoor uit een ander vaatje moesten tappen. De fondsen ophalen via de beurs, leek de enige mogelijkheid.

Het Vlaams (Interuniversitair) Instituut voor Biotechnologie

Begin jaren '90 waren geen al te beste tijden voor Belgische wetenschappers. De lamentabele financiering van wetenschappelijk onderzoek in België en Vlaanderen is een thema dat ik al eerder in de verf zette in dit boek. Er werd in die tijd nauwelijks geïnvesteerd in wetenschappelijk onderzoek en het woord 'innovatie' moest door de betrokken Vlaamse politici nog worden uitgevonden. De algemene beleidstrend was 'de beste manier om wetenschappers productief te houden, is ze op zwart zaad te zetten' of 'wetenschappers moeten (financieel) hongervlijden, dat houdt hen scherp en creatief'.

Het gebrek aan middelen en perspectief leidde in 1992 zelfs tot een betoging in Brussel waaraan 3 000 wetenschappers – van doctoraatstudenten tot eminente professoren – deelnamen. Het is zeer uitzonderlijk dat wetenschappers op straat komen om te betogen. De Vicerector van de K.U.Leuven, Herman Vanden Berghe, persifleerde tijdens het televisiejournaal de toenmalige slagzin van de Vlaamse regering 'wat we zelf doen, doen we beter' tot 'wat we zelf vernietigen, vernietigen we beter'.

VLAB

Er waren weliswaar enkele lichtpunten in de beleidsduisternis waaronder het 'Vlaams Actieprogramma Biotechnologie' (VLAB), een kanaal waarlangs een aantal Vlaamse universitaire '*centers of excellence*' werden betoelaagd. Onder meer de onderzoeksgroepen van Walter Fiers en Marc Van Montagu in Gent, Herman Vanden Berghe en mijn groep in Leuven, en enkele kleinere equipes ontvingen via dit kanaal onderzoekstoelagen. Het VLAB werd bestuurd vanuit het IWT en was nog een uitvloeisel van het DIRV-programma van Vlaams minister-president Gaston Geens.

Met het VLAB als uitgangspunt zou op het kabinet van Geens' opvolger, minister-president Luc Van den Brande, het idee rijpen om een Vlaams Interuniversitair Instituut voor Biotechnologie (VIB) op te richten. Dit instituut zou er komen naar analogie met het IMEC (het Interuniversitair Micro-electronica Centrum) in Leuven en het VITO (Vlaamse Instelling voor Technologisch Onderzoek) in Mol. De redenering van Van den Brande was dat biotechnologie in Vlaanderen een breed draagvlak kende en dat we enkele eminente biotechnologische wetenschappers hadden. Dat hadden ook de evaluaties van de excellentiecentra van het VLAB aangetoond. Bovendien was Van den Brande regelmatig op economische missie in het buitenland en het gebeurde dan al eens dat hij op het vliegtuig gezelschap kreeg van Fiers, Van Montagu, Vanden Berghe of mezelf. Ons lobbywerk heeft ongetwijfeld veel bijgedragen tot de oprichting van het VIB.

Van den Brande zou bijna één miljard Belgische frank vrijmaken voor het VIB en dat gedurende vijf jaar. Maar er bleven tal van vragen. Zou het VIB een instituut in beton en baksteen worden zoals IMEC en VITO? En waar zou dat instituut dan komen? In Gent, met een focus op plantenbiotechnologie? Of in Leuven, met een focus op rode biotechnologie? Of elders?

Compromis ‘à la belge’

Naar mijn gevoel was de eerste bedoeling de oprichting van een gloednieuw instituut in Gent. Dan had Leuven zijn IMEC en Gent zijn VIB. De Vlaamse overheid droeg midden jaren '90 echter nog het juk van de enorme schuldenberg die in de jaren '70 en '80 was opgebouwd en er waren onvoldoende middelen om een heel nieuwe onderzoekscampus op te zetten rond biotechnologie. Bovendien kwam tegen het scenario van een Gents VIB protest uit alle hoeken, niet in het minst uit de Leuvense.

Er kwam een compromis uit de bus: het VIB werd een virtueel instituut zonder muren. Er zou wel een centrale administratieve structuur komen, met standplaats in Gent, maar de onderzoekers zouden verdeeld blijven over diverse universiteitscampussen. Op die manier bleven ze ingebed binnen de laboratoria van hun universiteiten, konden ze blijven gebruik maken van bestaande infrastructuur, zou er geen *brain drain* van de universiteiten naar het VIB plaatsvinden, bleef de kennisdoorstroming intact en kon het VIB rekenen op een permanente bron van talentvolle jonge onderzoekers uit de academische wereld waaruit het kon rekruteren.

Een bankgarantie !?

De volgende vraag was wie er mocht genieten van de VIB-financieringstroom. De ‘*big four*’ – Vanden Berghe, Collen, Van Montagu, Fiers – alleszins, maar ook anderen? Ook binnen de K.U.Leuven was er onenigheid over die vraag. Wat bijvoorbeeld met het Rega Instituut? Dat was toch ook een groot onderzoekscentrum met wereldfaam in de *life sciences*, vooral dan in de virologie en immunologie. Politiek gezien was het echter onverdedigbaar voor Leuven om aanspraak te maken op drie grote onderzoeksgroepen binnen het VIB. Bovendien maakte het Rega Instituut geen deel uit van het VLAB en was het dus niet erkend als excellentiecentrum. Dat het destijds die kans was misgelopen, had het zonder twijfel te danken aan interne strubbelingen, waardoor de Rega-onderzoekers meestal in gespreide slagorde naar buiten traden, maar dat het nu ook naast de subsidies van VIB zou grijpen, dat leek wel ondenkbaar.

Ook voor Rector Roger Dillemans, die tijdens zijn rectorship heel vaak de rol van compromiszoeker en sociaal bemiddelaar op zich heeft genomen. Dillemans kreeg na veel discussie uiteindelijk de kerk in het midden door af te spreken dat

Vanden Berghe en ik een deel van onze VIB-financiering zouden doorstorten aan het Rega Instituut. Noodgedwongen moesten wij ons wel vinden in dit compromis. Enkele dagen later ontving ik echter een brief van Rega-voorzitter Jan De Smyter waarin die van mij een bankgarantie vroeg om het bereikte compromis te bezegelen. Dat was voor mij een brug te ver. Ook voor Rector Dillemans. Het redistributiescenario werd voorgoed afgeblazen.

Achteraf bekeken zou het Leuvense compromis overigens nooit door de VIB-administratie zijn goedgekeurd. De financiële en budgettaire controle door VIB is immers heel strikt en de evaluatiecriteria om toegang te krijgen tot VIB-fondsen bijzonder hoog.

‘Administratief kantoor’ en ‘perifere executanten’

VIB stak uiteindelijk na een eerste inloopjaar in 1995 van wal met 9 onderzoeksgroepen. De ‘fameuze’ 4 grote – de groepen van Vanden Berghe, Fiers, Van Montagu en onze groep - en 5 kleinere onderzoeksequipes. Ze kwamen allen uit het VLAB en hadden eveneens een excellente beoordeling gekregen. Het gaat over de teams van Christine Van Broeckhoven (UAntwerpen), Danny Huylebroeck (K.U.Leuven), Rene Hamers (VUB), Joël Vandekerckhove (UGent) en Nicolas Glansdorff (VUB).

Als een van de grotere centra streken wij 16,5% van de totale VIB-subsidieportefeuille op. Omdat we goed scoorden in de opeenvolgende vijfjaarlijkse evaluaties nam dat aandeel in de loop der jaren lichtjes toe.

VIB werd evenwel geen subsidieorgaan dat het geld losjes verdeelde over uitgestoken handen van likkebaardende professoren, hoe eminent deze ook mochten zijn. Er kwam een centraal management onder leiding van Jo Bury en Rudy Dekeyser met een duidelijke visie en een – in de ogen van de eminente professoren – ziekelijke bemoeizucht. Ook ik hield er in de begindagen van VIB een houding op na die overeenstemde met ‘geef me de financiering en verder moeten jullie je niet teveel bemoeien met mijn onderzoek want ik weet toch het best hoe ik dat geld moet besteden’. Bury en Dekeyser zagen dat echter anders: ze stelden duidelijke kernactiviteiten en doelstellingen voorop en kwamen zelfs tussen in het dagelijkse management van de onderzoeksgroepen, onder meer door het opleggen van een personeelsbeleid dat in vele opzichten haaks stond op het personeelsbeleid dat aan de universiteiten werd gevoerd.

Het leverde de eerste jaren pittige discussies op waarbij ik het hoofdkantoor steevast omschreef als het ‘administratief kantoor in Gent’ en Bury en Dekeyser het telkens hadden over de ‘perifere executanten’ als ze spraken over de directeurs van de onderzoeksgroepen.

Instituut zonder weerga met focus op excellentie

Inmiddels zijn de ‘big four’ allen op pensioen en heb ik mijn oorspronkelijk, toch relatief beperkt, scepticisme over VIB laten varen. Niet noodgedwongen, wel uit respect voor de inspirerende visie en de niet-aflatende werkkraft van Jo Bury, Rudy Dekeyser en hun VIB-medewerkers. De evolutie die VIB heeft doorgemaakt van de opstartperiode in 1994-1995 tot nu is opmerkelijk. Als de zeggwijze ‘van kwaad naar erger’ een antoniem had in de vorm van ‘van goed naar beter’ dan zou het zeker op het VIB van toepassing zijn.



Directiecomité van het Vlaams Instituut voor Biotechnologie in 2008. Staand v.l.n.r. Prof. Rudy Beyaert (vertegenwoordigt Prof. Frans Van Roy), Prof. Lode Wyns, Dr. Rudy Dekeyser (managing director VIB), Dr. Jo Bury (managing director VIB), Prof. Joël Vandekerckhove, Prof. Bart De Strooper. Zittend v.l.n.r. Prof. Désiré Collen, Marijke Lein (human resources director VIB), Prof. Johan Thevelein, Wim Goemaere (chief financial officer VIB), Prof. Dirk Inzé. Ontbreken: Prof. Christine Van Broeckhoven, Prof. Frans Van Roy.

Waar het VIB vijftien jaar geleden startte als een losse en virtuele vereniging van negen onderzoeksdpartementen, is het vandaag een instituut geworden met stevige fundamenteen opgebouwd rond een 70-tal onderzoeksgroepen, de meeste van topkwaliteit.

De financiële middelen die VIB vrijstelt, zorgen in de eerste plaats voor stabiliteit. Door die injectie van middelen – recent aangevuld met de Methusalem-, Odysseus- en Herculesprogramma’s van de Vlaamse regering – kunnen we ta-

lentvolle toponderzoekers binnen onze Vlaamse universiteiten aan de slag houden en zelfs buitenlands talent overtuigen om in Vlaanderen te komen werken. Zonder VIB zou het onderzoek in de *life sciences* in Vlaanderen er ongetwijfeld minder rooskleurig hebben uitgezien. Eerlijkheidshalve moet ik zelfs toegeven dat ik zonder VIB wellicht zelf mijn emeritaat niet aan de K.U.Leuven had bereikt.

Voor het aanbieden van die financiële stabiliteit wil VIB echter ook wel wat terug: de lat voor VIB-onderzoekers ligt hoog. Er wordt van hen verondersteld dat ze presteren op wereldniveau. Wie onder de lat gaat, wordt afgesneden van VIB-financiering. Elke groepsleider wordt streng geëvalueerd: naast een evaluatie gebaseerd op meetbare output in termen van publicaties en succesvolle patentaanvragen grijpt er om de vijf jaar een ‘*on site visit*’-plaats door externe wetenschappers. Dat zorgt ervoor dat de mouwen moeten opgestroopt worden. Originaliteit, creativiteit, productieve samenwerking en excellentie vormen de boventoon. ‘*Me too*’-onderzoek wordt niet geduld. Publiceren in toptijdschriften is een prioriteit. Kortom, werken voor VIB is ‘*not a free lunch*’.

Ook de Vlaamse regering legt om de vijf jaar VIB op de rooster. Daardoor wordt het instituut gedwongen zichzelf steeds in vraag te stellen en jaar na jaar beter te doen. Een uitdaging die tot nu toe zeer goed gelukt is.

Het komt mij dan ook enigszins ongepast over dat een paar maanden geleden een formele en zeer negatieve kritiek op dit VIB werd geuit door collega Zeger Debyser in een document getiteld: ‘Vlaanderen in actie, een reactie’. De auteur beweert dat hij dit document heeft geschreven niet uit ‘persoonlijke frustratie’ maar uit ‘chronische bezorgdheid voor het wetenschappelijk onderzoek in Vlaanderen’. Ik heb collega Debyser dan ook opgebeld om hem te herinneren aan het feit dat ik een goed jaar geleden zijn projectaanvraag voor financiering door het VIB ten volle ondersteund heb, dat dit project op zeer correcte manier door interne en externe experts geëvalueerd werd in vergelijking met competitieve projecten. Het kon helaas niet gehonoreerd worden, uitsluitend en alleen op basis van aanvaarde kwantitatieve en kwalitatieve criteria. Met ‘spontane’ grootmoedigheid verklaarde collega Debyser dat zijn initiatief niet ingegeven was om een eventuele ‘inbraak’ in VIB voor zichzelf te forceren, maar in het algemeen belang, ook als hijzelf hierin zuiver op basis van objectieve evaluaties niet kon participeren.

Klimaat voor ondernemen

VIB heeft er ook voor gezorgd dat het klimaat in Vlaanderen voor het biotech-ondernemen veranderd is. De golf van beursnoteringen van VIB-spin-offs is daar een teken van. VIB heeft in zeer belangrijke mate aan de weg getimmerd om Vlaanderen een plaats te geven binnen de sectoren van de industriële biotech- en *life sciences*.

VIB doet nu wat ik zelf in de jaren '80 en '90 heb gedaan met t-PA. Technologietransfer was tot voor kort onbekend en onbestaand aan onze universiteiten. Voor veel professoren waren 'octrooi', 'licentie' en 'valorisatie' zelfs 'vieze' begrippen want ze waren gekoppeld aan 'winst maken' of 'commercieel denken'. Van een academicus mocht verwacht worden dat hij boven de mêlée van het werkveld stond en zich niet zou inlaten met ondernemen. Een academicus diende alleen de grote W's van 'Wetenschap' en 'Waarheid'.

Door die mentaliteit hebben we in het verleden echter belangrijke ontdekkingen weggegeven zonder dat ze enige meerwaarde – bijvoorbeeld onder de vorm van werkgelegenheid – hebben opgeleverd voor onze eigen regio. In belangrijke mate mede door VIB is er eindelijk een structurele brug ontstaan tussen academisch onderzoek in de *life sciences* en de bedrijfswereld. Wat een organisatie als Innovi nooit voor elkaar heeft gekregen, lukt VIB wel. De uitvindingen van VIB-onderzoekers die de basis vormen voor nieuwe maatschappelijke en industriële toepassingen worden immers tijdig gespot en komen via een weloverwogen strategie beschikbaar voor de samenleving. Met een beperkt team slaagt het VIB erin waardevolle ontdekkingen te beschermen en een belangrijke octrooiportefeuille op te bouwen, winstgevende licenties af te sluiten en succesvolle start-ups op de rails te zetten. Voorbeelden zijn *Devgen*, *CropDesign* (nu *BASF*), *Ablynx*, *Pronota* (vroeger *Peakadilly*) en *Actogenix*.

VIB kan stilaan de voet plaatsen naast befaamde organisaties als het EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*), de Duitse Max Planck Instituten of het Franse FNRS. Om de vergelijking door te trekken naar het MIT (*Massachusetts Institute of Technology*) in Cambridge (VS) is het evenwel nog te vroeg. Daarvoor is VIB te jong en het kan niet tippen aan de middelen waarover het MIT beschikt. Maar een Europees MIT worden, zou een nobel streven kunnen zijn voor VIB.

Een pluim voor politici

Ook de Vlaamse excellenties die wetenschapsbeleid in hun bevoegdheid hadden, verdienen een pluim. Van Gaston Geens over Luc Van den Brande en Dirk Van Mechelen tot Fientje Moerman en Patricia Ceysens, ze hebben allen het belang ingezien van wetenschap en technologische innovatie om van Vlaanderen een welvarende regio te maken. De oprichting, permanente ondersteuning en geregelde uitbreiding van de middelen van VIB zijn daarin, zeker voor wat betreft de biotechnologie en de *life sciences*, een belangrijke mijlpaal die velen ons in het buitenland benijden. Hoed af voor de visie die zij aan de dag hebben gelegd en nog steeds leggen.

VIB3 – Departement voor Transgene Technologie en Getherapie

Een van de meest talentvolle onderzoekers, die ik ooit de oceaan heb overgeholpen met een *D. Collen Research Foundation*-fellowship, is ongetwijfeld Peter Carmeliet. Ik ontmoette Peter eerder toevallig tijdens een seminarie in Leuven. Het moet ergens begin 1989 zijn geweest. Hij had aan de K.U.Leuven zijn medische studies afgewerkt en een doctoraat behaald. Enkele maanden na onze ontmoeting zat hij al op het vliegtuig naar de *Harvard Medical School* voor een postdoctorale opleiding van een jaar.

Ik besepte dat Peter Carmeliet de geschikte persoon zou zijn om de toentertijd nieuwe '*gene-targeting*'-technologie over te brengen naar Leuven. Deze technologie laat toe om knock-outmuizen te maken. Bij deze muizen wordt een bepaald gen uitgeschakeld waardoor het mogelijk is om de functie van dat gen na te gaan. Om de technologie te leren, ging Peter in 1990-1991 naar het laboratorium van Richard Mulligan aan het *Whitehead Institute for Biomedical Sciences*, een onderdeel van het *Massachusetts Institute of Technology* in Cambridge (VS). Om snel tot resultaten te komen, betaalde ik naast het loon van twee Belgische laboranten ook de werkingsmiddelen voor onze knock-outprojecten (ongeveer 1 miljoen dollar) in het *Whitehead Institute*.

Eerste knock-outs in België

Op die manier hadden we vanaf het prille begin de *gene-targeting*-technologie zelf onder de knie. Peter slaagde er immers in om tijdens zijn verblijf aan het *Whitehead* drie knock-out muismodellen te genereren: een t-PA-, een urokinase- en een PAI-1-knock-out (plasminogeen activator inhibitor 1).

Zelf bracht ik de eerste t-PA knock-outs in mijn handbagage over van Boston naar Leuven. Daarmee heb ik wellicht eigenhandig de eerste knock-outmuizen in België geïntroduceerd. Deze knock-outs zouden het onderwerp worden van een hele reeks succesvolle fybrinolyse- en trombolysenestudies en tal van belangwekkende papers voortbrengen.^{216 217 218 219}

²¹⁶ Carmeliet P, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 gene-deficient mice. I. Generation by homologous recombination and characterization. *J Clin Invest.* 1993; 92: 2746-55.

²¹⁷ Carmeliet P, Stassen JM, Schoonjans L, Ream B, van den Oord JJ, De Mol M, Mulligan RC, Collen D. Plasminogen activator inhibitor-1 gene-deficient mice. II. Effects on hemostasis, thrombosis, and thrombolysis. *J Clin Invest.* 1993; 92: 2756-60.

²¹⁸ Carmeliet P, et al. Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. *Nature.* 1994; 368: 419-24.

²¹⁹ Dewerchin M, Nuffelen AV, Wallays G, Bouché A, Moons L, Carmeliet P, Mulligan RC, Collen D. Generation and characterization of urokinase receptor-deficient mice. *J Clin Invest.* 1996; 97: 870-8.

Eenmaal terug in België spaarden Peter en ik tijd noch moeite (en ook centen) om een *state-of-the-art* pathogeen vrije muizenfaciliteit te bouwen, een laboratorium voor karakterisering van muizenfenotypes en werd een kernteam van excellente medewerkers aangetrokken. In geen tijd hadden we een knock-outcentrum voor muizen uit de grond gestampt dat vrijwel zijn weerga in Europa niet kende. In deze ‘knock-outfabriek’ zouden nog tal van nieuwe muismodellen worden gegenereerd, onder meer voor het syndroom van Zellweger²²⁰, factor VII-deficiëntie²²¹ en thrombomoduline.²²²

VEGF, de start van een nieuwe onderzoeksrichting

Nog toen hij aan het *Whitehead* bij Mulligan in de leer was, raakte Peter Carmeliet geïnteresseerd in bloedvatvorming (angiogenese) en rijpte bij hem het plan om knock-outs te maken voor de vasculaire endotheliale groeifactor, kortweg VEGF. Angiogenese was voor ons laboratorium alleszins een heel nieuwe onderzoeksrichting.

Carmeliet beet bijna de tanden stuk op zijn VEGF-knock-outs. Hij wist dat VEGF een invloed moest hebben op de groei van de endotheelcellen die de binnenzijde van bloedvaten bekleden, maar het VEGF-gen uitschakelen bij muizen bleek quasi onmogelijk. Nochtans leken knock-outs een heel plausibele manier om achter de precieze functie van VEGF te komen. Maar de experimenten mislukten keer op keer. Zelfs als slechts een van de twee VEGF-genen onklaar werd gemaakt – een muis erfde van elk gen één exemplaar van moedermuis en één exemplaar van vadermuis – stierven de embryo's al vroeg af in de moederschoot. Er moest wel ergens een experimentele fout zijn gemaakt. Carmeliet zou zelfs voor korte tijd naar het *Lunenfeld Institute* in Toronto (Canada) trekken om samen met Andras Nagy een oplossing voor het probleem te zoeken.

Toch zaten ze dicht bij een doorbraak. Toen ze de in de baarmoeder afgestorven embryo's nauwkeuriger bekeken, ontdekten ze dat alle embryo's ernstige afwijkingen in hun bloedvaten vertoonden waardoor ze zich niet verder konden ontwikkelen. Ook al heb je als embryo nog één gezond VEGF-gen over, dat blijkt onvoldoende. VEGF is zo belangrijk dat je over twee gezonde genen moet beschikken om heelhuids door de embryonale fase te komen. Een unieke conclusie, want vrijwel geen enkel ander gen is zo belangrijk tijdens de embryonale ontwikkeling.

²²⁰ Baes M, et al. A mouse model for Zellweger syndrome. *Nat Genet.* 1997; 17: 49-57.

²²¹ Rosen ED, et al. Mice lacking factor VII develop normally but suffer fatal perinatal bleeding. *Nature.* 1997; 390: 290-4.

²²² Conway EM, et al. Structure-function analyses of thrombomodulin by gene-targeting in mice: the cytoplasmic domain is not required for normal fetal development. *Blood.* 1999; 93: 3442-50.

Met die observatie haalde Carmeliet de grote krantenkoppen van de wetenschappelijke pers. Het artikel (zie bijlage 13) dat toen in *Nature* werd gepubliceerd, wordt nog altijd gezien als een van de belangrijkste publicaties in angiogenese. Het artikel werd meer dan 1500 keer geciteerd door andere wetenschappers.²²³

Vlak na het artikel van Carmeliet in *Nature* volgt er een gelijkaardig artikel, gepubliceerd door N. Ferrara, een pionier in het VEGF-onderzoek, en zijn team bij *Genentech*. Hierbij toch een anekdote: rond april 1995, toen Peter Carmeliet stilaan radeloos werd omdat hij er niet in slaagde een VEGF-knockout muis te genereren, bezocht ik een van de laatste keren *Genentech* in South San-Francisco. Ik vertelde aan Dr. Simon, de toenmalige *Director of Research* bij *Genentech*, over de problemen met de VEGF-knock-out. Hij bevestigde de problemen en deelde mij mee dat Ferrara's groep bij *Genentech* er evenmin in geslaagd was en dat zij het hadden opgegeven. Een paar maanden later, toen bleek dat het heterozygote vorm van VEGF-knock-out afstierf *in utero* door de onmogelijkheid om zelfs met één gen een hart- en bloedvatensysteem te vormen en daarmee het probleem verklaard was, bezocht Werner Risau, een inmiddels overleden medewerker van Peter Carmeliet *Genentech* en besprak de verklaring van het probleem. Ik vermoed dat dit de oorzaak was van de heropstart van het VEGF-knock-outprogramma bij *Genentech*, met zekerheid weet ik dat natuurlijk niet. Het feit is echter dat onze groep in Leuven, bij mijn weten, onafhankelijk en als eerste aantoonde dat de inactivering van een van de twee VEGF-genen resulteerde in embryonale letaliteit. En dat was een echte primeur. Dat dit uit een andere groep, onafhankelijk of met de hulp van inside-informatie, bevestigd werd, heeft zeker de publicatie en de aanvaarding van de waarnemingen versneld.

VIB 3

In 1994-1995 ging VIB van start en onze onderzoeksgroep zou VIB-departement 3 vormen. Ik doopte VIB3 om tot het Centrum voor Transgene Technologie en Getherapie. Zelf werd ik directeur van dit departement en bood Peter Carmeliet aan om adjunct-directeur te worden. Na mijn emeritaat zou Peter het centrum volledig in eigen handen nemen en omvormen tot het Vesalius Research Center. De achtergrond van die naamsverandering zal later in dit hoofdstuk duidelijk worden.

²²³ Carmeliet P, et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*. 1996; 380: 435-9.

Angiogenese-‘geweld’

Angiogenese is een levensbelangrijk proces. De ontwrichting van de balans tussen te veel of te weinig bloedvatvorming leidt in beide richtingen tot ziekte. Excessieve bloedvatvorming komt voor bij kanker, oogziekten en ontstekingsziekten. Onvoldoende bloedvatvorming draagt bij tot ischemisch hartlijden, perifere bloedvataandoeningen, gebrekkige wondheling enzovoort. Rond angiogenese zijn de laatste jaren liefst 35 000 wetenschappelijke artikels verschenen en er staan diverse geneesmiddelen op stapel voor de behandeling van kanker en oogziekten die gebaseerd zijn op principes van de angiogenese.²²⁴ In al dat publicatiegeweld hebben Peter Carmeliet en zijn team zich kranig staande gehouden. Meer nog, hij heeft zijn ambities in angiogenese meer dan waar gemaakt. De ene paper van zijn groep in *Nature* werd opgevolgd door de andere in *Nature Medicine*, *Nature Genetics* of *Cell* en daarmee bestreken ze niet alleen topics in het cardiovasculaire veld, maar legden ze ook links naar kanker en neuronale problemen.

In een tijdspanne van enkele jaren werden volgende doorbraken gepubliceerd:

- in *Nature* dat HIF-eiwitten een belangrijke rol spelen als zuurstofsensor om het angiogeneseproces bij tumoren op gang te trekken; ²²⁵
- in *Cell* dat vasculair endotheliaal cadherine de adhesie tussen endotheliale cellen in de bloedvaten vergemakkelijkt via binding aan VEGF-receptor 2, beta-catenine en PI3-kinase; ²²⁶
- in *Nature Medicine* dat er een verband bestaat tussen de verschillende isovormen waarin VEGF wordt aangemaakt en hun specifieke functie in het angiogeneseproces; ²²⁷
- in *Nature Genetics* dat mutaties in de promotorsequentie van het VEGF-gen motorische zenuwziekten kunnen veroorzaken; ²²⁸

²²⁴ Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*. 2005; 438: 932-6. Review.

²²⁵ Carmeliet P, et al. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*. 1998; 394: 485-90.

²²⁶ Carmeliet P, et al., Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell*. 1999; 98: 147-57.

²²⁷ Carmeliet P, et al. Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Nat Med*. 1999; 5: 495-502.

²²⁸ Oosthuysen B, et al. Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet*. 2001; 28: 131-8.

- in *Nature Medicine* dat VEGF en placentale groeifactor (PlGF) op een synergetische manier bijdragen aan angiogeneseprocessen;²²⁹
- in *Nature Medicine* dat het verlies van HIF2 en de inhibitie van VEGF leidt tot onvolmaakte longontwikkeling bij de foetus en dat toediening van VEGF een mogelijke behandeling is voor prematuren met ademhalingsproblemen;²³⁰
- in *Cell* dat antistoffen tegen PlGF de groei van solide tumoren kunnen onderdrukken.²³⁶

Elk van deze papers (behalve de laatste, die is nog te recent) heeft een citatie-index hoger dan 200, de *Nature*-paper zit zelfs over de 1000. In dezelfde periode schreef Peter Carmeliet verschillende reviews, waarvan één in *Nature Medicine*²³¹ en één in *Nature*²³² die respectievelijk meer dan 2000 en 3000 keer werden geciteerd.

Medicijn tegen ALS?

Soms komt men tijdens zijn onderzoek voor grote verrassingen te staan. Bijvoorbeeld dat muizen, waarvan de promotersequentie van het VEGF-gen zodanig werd gewijzigd dat ze minder VEGF aanmaken, na verloop van tijd symptomen van een zenuwaandoening krijgen. Bij nader onderzoek bleek dat de muizen pathologische kenmerken droegen van amyotrofe laterale sclerose (ALS): dit is een aftakeling van motorische neuronen in het ruggenmerg en de hersenstam.²³³ Ook bij de mens blijkt VEGF een rol te spelen in het ontstaan van ALS.²³⁴ ALS treft vijf op 100 000 mensen. Het is een ongeneeslijke ziekte die mensen in de meest actieve periode van hun leven treft. Aanvankelijk beginnen de spieren te verslappen, wordt bewegen moeilijker en treden er verlammingen op. Uiteindelijk vallen ook de spieren uit waarmee we slikken, spreken en ademen. Er is geen afdoende behandeling tegen ALS en ongeveer de helft van de patiënten overlijdt tussen de drie en vijf jaar na het vaststellen van de eerste symptomen. Zelden overleeft een patiënt het tien jaar of langer.

²²⁹ Carmeliet P, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med.* 2001; 7: 575-83.

²³⁰ Compornolle V, et al. Loss of HIF-2alpha and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nat Med.* 2002; 8: 702-10.

²³¹ Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* 2000; 6: 389-95. Review.

²³² Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 2000; 407: 249-57. Review.

²³³ Oosthuysen B, et al. Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet.* 2001; 28: 131-8.

²³⁴ Lambrechts D, et al. VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat Genet.* 2003; 34: 383-94.

Uit het onderzoek van Carmeliet blijkt dat VEGF een dubbel effect heeft op motorische zenuwen: het zorgt enerzijds voor een goede bloeddorstrooming waardoor de zenuwcellen over voldoende zuurstof en voedingsstoffen beschikken en anderzijds oefent het een rechtstreeks beschermend effect uit op de zenuwcellen.

De volgende stap was uitzoeken of VEGF misschien therapeutische mogelijkheden biedt bij de behandeling van ALS. Twee methoden werden uitvoerig getest bij proefdieren: gentherapie – in samenwerking met *Oxford Medica*²³⁵ - en het gebruik van een medicijnpompje waarmee VEGF in oplossing rechtstreeks in de hersenen wordt gebracht.²³⁶ Beide methoden zijn succesvol, maar het gebruik van het medicijnpompje lijkt voorlopig het meest aangewezen. Ratten met ALS die VEGF in hun hersenen krijgen gepompt, scoren beter op een reeks motorische tests en ook hun levensverwachting neemt gevoelig toe. Bovendien is het voordeel van het medicijnpompje dat de dosering voortdurend kan aangepast worden en dat bij ongewenste effecten de behandeling onmiddellijk kan stopgezet worden.

In december 2008 werden aan de K.U.Leuven de eerste klinische proeven bij mensen opgestart in samenwerking met het Zweedse biofarmaceutisch bedrijf *NeuroNova*. Onder coördinatie van neuroloog Wim Robberecht (UZLeuven en Vesalius Research Center) moeten de gereguleerde tests aantonen dat VEGF veilig toegediend kan worden en goed verdragen wordt door patiënten. In een volgend stadium zullen klinische tests worden uitgevoerd om uit te maken of VEGF inderdaad een positief effect heeft op ALS bij mensen. Zelfs als alle tests positief verlopen, zal het echter nog verscheidene jaren duren vooraleer het geneesmiddel effectief op de markt kan komen.

Kankeronderzoek

Met angiogenese bracht Peter Carmeliet ook kankeronderzoek naar onze onderzoeksgroep. Tumoren groeien immers sneller dan normaal weefsel en hebben dus een grotere behoefte aan zuurstof en voedingsstoffen. Daarom trachten tumoren de aangroei van nieuwe bloedvaten te stimuleren door signaalstoffen als

²³⁵ Azzouz M, Ralph GS, Storkebaum E, Walmsley LE, Mitrophanous KA, Kingsman SM, Carmeliet P, Mazarakis ND. VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. *Nature*. 2004; 429: 413-7.

²³⁶ Storkebaum E, et al. Treatment of motoneuron degeneration by intracerebroventricular delivery of VEGF in a rat model of ALS. *Nat Neurosci*. 2005; 8: 85-92.

VEGF – en zijn broertje placentale groeifactor (PlGF) – uit te zenden. Deze stoffen binden aan receptoren op de endotheelcellen van nabijgelegen bloedvaten en initiëren de vorming van nieuwe bloedvaten.²³⁷

Door antistoffen te gebruiken die specifiek aan VEGF en PlGF binden, kan de interactie van deze eiwitten met hun receptoren belet worden, treedt er geen nieuwe bloedvatvorming op en worden de tumoren uitgehongerd.²³⁸ Diverse kankertherapieën gebaseerd op een vermindering van de tumorangiogenese, zijn op dit ogenblik in ontwikkeling, maar ze zijn bijna allemaal gericht tegen VEGF of zijn belangrijkste receptor. Tot nu toe is gebleken dat deze antistoffen een significante maar een in de tijd beperkte invloed hebben op de overleving van kankerpatiënten. Blijkbaar gaan de tumorcellen ter compensatie andere groeifactoren aanmaken die de vorming van bloedvaten promoten. Bovendien vertonen de geneesmiddelen ernstige bijwerkingen. Er is duidelijk nood aan complementaire doelwitten en PlGF lijkt op het eerste gezicht een van de meest voor de hand liggende.

Uit een eerste reeks preklinische experimenten is alvast gebleken dat een anti-lichaam tegen PlGF bij muizen met tumoren veel minder neveneffecten veroorzaakt dan anti-VEGF. Bovendien wekt anti-PlGF in verhongerende tumorcellen geen ‘reddingsoperatie’ op. De cellen maken geen andere groeifactoren voor bloedvaten aan.²³⁹ ²⁴⁰ De gunstige evaluatie van anti-PlGF als potentieel geneesmiddel tegen kanker, doet de hoop rijzen op een efficiëntere kankertherapie met minder neveneffecten – ook voor kinderen en zwangere vrouwen. Anti-PlGF verhoogt niet alleen de efficiëntie van chemotherapie en de huidige anti-angiogenesetherapie, maar het inhibeert ook de groei en uitzaaiing van tumoren die ongevoelig zijn voor bestaande geneesmiddelen. *ThromboGenics* en het farmabedrijf *Roche*, dat ondertussen *Genentech* heeft gekocht, zullen zich verder toeleggen op de klinische ontwikkeling van anti-PlGF (zie daarover meer in volgend hoofdstuk).

Vesalius

Tot slot vormen VEGF en ALS niet de enige brug tussen het bloedvatenstelsel en het zenuwstelsel. Peter Carmeliet en zijn medewerkers konden aantonen dat bloedvaten en zenuwbanen dezelfde plattegrond en dezelfde moleculaire signa-

²³⁷ Carmeliet P, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med.* 2001; 7: 575-83.

²³⁸ Lutun A, et al., Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat Med.* 2002; 8: 831-40.

²³⁹ Fischer C, et al. Anti-PlGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels. *Cell.* 2007; 131: 463-75.

²⁴⁰ Fischer C, Mazzone M, Jonckx B, Carmeliet P. FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy?. *Nat Rev Cancer.* 2008; 8: 942-56. Review.

len gebruiken tijdens de embryonale ontwikkeling. Dat bloedvaten en zenuwbanen zich via dezelfde ‘road map’ een weg banen doorheen het zich ontwikkelende lichaam, is een fenomeen dat Andreas Vesalius al in de 16^{de} eeuw had waargenomen: bij zijn anatomische ontleding vond hij het opmerkelijk dat belangrijke zenuwbanen zij aan zij lagen met belangrijke bloedvaten. Hij observeerde met andere woorden vierhonderd jaar geleden al wat Carmeliet en zijn team in de 21^{ste} eeuw moleculair zouden verklaren.

Ter ere van deze in Leuven opgeleide ‘vader van de anatomie’ werd in het voorjaar van 2008 het VIB-Departement voor Transgene Technologie en Gentherapie omgedoopt tot het Vesalius Research Center. Ik wens bij deze het Centrum een schitterende toekomst.

ThromboGenics, beursgenoteerd en wissel op de toekomst

Sinds 7 juli 2006 staat *ThromboGenics* nv genoteerd op *Euronext Brussels*. Via een uitgifte van 7,77 miljoen aandelen aan € 4,50 haalden we de som van € 35 miljoen op waarmee we het onderzoek naar en de ontwikkeling van geneesmiddelen verder konden financieren. Wat ons niet gelukte met kapitaalbreng via risicokapitaalverschaffers, lukte wel via een publieke verkoop van aandelen. Als toenmalige CEO van *ThromboGenics* was ik over die beursgang bijzonder opgetogen, want de succesvolle beursintroductie toonde aan dat we met *ThromboGenics* een wetenschappelijk plausibel verhaal brachten, een economisch geloofwaardig model hadden uitgewerkt en een reeks beloftevolle producten in de pijplijn hadden. Al die producten zijn gerelateerd aan het vasculair systeem, maar ze hebben onverwacht brede toepassingsgebieden.

Een beursnotering heeft nog andere voordelen naast de aanbreng van nieuwe financiële middelen. Je komt eensklaps op het radarscherm van investeringsfondsen, analisten en potentiële werknemers. Bovendien is de waarde van het bedrijf ook veel duidelijker. Een alternatief was om *ThromboGenics* te verkopen aan de meest biedende. Dan was meteen alle leed geleden, maar is ook de uitdaging weg.

Anno 2009 is *ThromboGenics* uitgegroeid tot een biofarmaceutisch bedrijf met Europese allure. Het legt zich toe op het onderzoek en de ontwikkeling van innovatieve biotechnologische geneesmiddelen voor een reeks ernstige aandoeningen, waaronder ziekten aan de achterkant van het oog, cardiovasculaire aandoeningen en kanker. We hebben sterk de nadruk gelegd op producten die zoveel mogelijk waarde creëren voor de aandeelhouders en de maatschappij. We zijn verhuisd naar de bioincubator in Leuven wat voor de personeelsleden een efficiëntere locatie is. En tot slot gaf ik het roer over aan Patrik De Haes, die vanaf augustus 2008 CEO is geworden van *ThromboGenics*. Zelf ben ik nog voorzitter van de Raad van Bestuur.

ThromboGenics heeft nu al een aantal opmerkelijke mijlpalen bereikt, maar ik ben ervan overtuigd dat het beste nog moet komen. Als een van de weinige Belgische biotechbedrijven heeft *ThromboGenics* eigenhandig een potentieel geneesmiddel tot in fase III van het klinisch onderzoek gebracht. Het gaat om het eiwit microplasmine voor de behandeling van oogaandoeningen. Voorts sloot *ThromboGenics* een belangrijke overeenkomst af met *Roche* voor de verdere ontwikkeling van een antilichaam tegen placentale groeifactor (anti-PlGF) als angiogeneseremmend kankergeneesmiddel. Deze overeenkomst zorgt voor *ThromboGenics* voor een gestage stroom van inkomsten via een belangrijke voorafbetaling, mijlpaalbetalingen en potentiële 'double digit'-royalty's. Daardoor kreeg *ThromboGenics* meer strategische flexibiliteit en een stabiele financiële basis. Door de sterke financiële positie kunnen we zelf meer investeren in eigen klinische studies. Naast microplasmine en anti-PlGF heeft *ThromboGenics* immers nog andere potentiële geneesmiddelen in portefeuille.

Microplasmine, in ‘poleposition’

Microplasmine is een verkorte en stabiele vorm van plasmine, het enzym dat de eiwitten in bloedklonters oplost en dat van nature in ons lichaam kan gevormd worden (zie hoofdstuk ‘Fybrinolyse moleculair ontrafeld’). Microplasmine stond al enige tijd in de belangstelling van het Centrum voor Moleculaire en Vasculaire Biologie als potentieel trombolytisch geneesmiddel. In 2000 slaagden we er in om een recombinante en stabiele vorm van dit verkorte eiwit aan te maken in de gist *Pichia pastoris*.²⁴¹ We extraheerden uit 1 liter gistcultuur tot 500 mg microplasminogeen, een voorlopereiwit dat we gemakkelijk konden omzetten tot microplasmine.

In eerste instantie werd microplasmine door mijn Japanse medewerker Nobuo Nagai met succes getest op proefdieren als trombolytisch geneesmiddel tegen beroerte.^{242 243 244} *ThromboGenics* nam microplasmine in licentie om het verder klinisch te ontwikkelen. In maart 2004 ging het een samenwerking aan met het Amerikaanse *NuVue*²⁴⁵ toen bleek dat microplasmine ook eiwitten in het oog afbreekt die het glasvocht (de gelachtige materie in de oogbol) verbinden met het netvlies. Door deze eigenschap kan microplasmine een ommekeer teweegbrengen in de manier waarop sommige aandoeningen aan de achterkant van het oog behandeld worden. Het gaat onder meer om problemen bij vitreomaculaire tractie, diabetische retinopathie, diabetisch maculair oedeem, maculaire gaatjes en leeftijdsgebonden maculaire degeneratie. De huidige behandeling bestaat erin het glasvocht los te maken van de retina met behulp van een chirurgische ingreep waarbij het glasvocht volledig wordt weggezogen. Deze procedure is relatief duur en een deel van de patiënten krijgt ook af te rekenen met neveneffecten, zoals vervorming van het zicht, bloeding, loskomen van de retina, en ontwikkeling van

²⁴¹ Patent UK 0031196.9. Recombinant human plasminogen and plasmin: Methods for high yield production, stabilization and use for treatment. Collen D. (inventor); Thromb-X, NV (assignee); December 21, 2000.

²⁴² Nagai N, De Mol M, Van Hoef B, Verstreken M, Collen D. Depletion of circulating alpha(2)-antiplasmin by intravenous plasmin or immunoneutralization reduces focal cerebral ischemic injury in the absence of arterial recanalization. *Blood*. 2001; 97: 3086-92.

²⁴³ Nagai N, Demarsin E, Van Hoef B, Wouters S, Cingolani D, Laroche Y, Collen D. Recombinant human microplasmin: production and potential therapeutic properties. *J Thromb Haemost*. 2003; 1: 307-13.

²⁴⁴ Suzuki Y, Chen F, Ni Y, Marchal G, Collen D, Nagai N. Microplasmin reduces ischemic brain damage and improves neurological function in a rat stroke model monitored with MRI. *Stroke*. 2004; 35: 2402-6.

²⁴⁵ Persmededeling ThromboGenics 10 maart 2004: ThromboGenics and NuVue Technologies to Collaborate on Development of Plasmin-Based Drugs for Visual Disorders.

glaucoom en cataract. Uit de klinische studies tot op heden^{246 247} blijkt dat microplasmine bij 30% tot 40% van de patiënten het glasvocht losweekt van het netvlies zonder dat een chirurgische ingreep nodig is.^{248 249 250 251} Bij andere patiënten wordt de chirurgische ingreep gemakkelijker omdat de verkleving tussen het glasvocht en het netvlies minder sterk wordt.

Naar fase III

Volgend op een succesvol overleg met de FDA na de afsluiting van het fase II-klinisch onderzoek in een zogenaamde ‘*end of phase II meeting*’, is *ThromboGenics* gestart met de fase III-stap in de klinische ontwikkeling van dit potentiële geneesmiddel. Het programma omvat twee studies waarvan er één plaatsvindt in de Verenigde Staten²⁵² en een tweede in Europa én de Verenigde Staten.²⁵³ In elk van deze studies zullen 320 patiënten gerekruteerd worden, verdeeld over een 40-tal centra. Het initiële ziektebeeld voor de fase III-studies met microplasmine is de niet-chirurgische behandeling van focale vitreomaculaire verkleving. Bij deze aandoening vertoont het glasvocht in de oogbol abnormaal sterke verklevingen met het netvlies. Deze verkleving kan vervormingen van bloedvaatjes en netvlies veroorzaken met als resultaat dat het zicht van de patiënt wordt vervormd. Bovendien speelt vitreomaculaire verkleving een belangrijke rol in ziekten aan de achterkant van het oog, zoals maculaire gaatjes en bepaalde vormen van maculair oedeem.

De beide studies zijn gerandomiseerde, dubbelblinde gecontroleerde studies waarbij een dosis van 125 µg microplasmine geëvalueerd wordt tegenover placebo. Het primaire eindpunt van beide studies is het opheffen van de verkleving

²⁴⁶ ClinicalTrials.gov, A Dose-Escalation Clinical Trial of Intravitreal Microplasmin in Patients Undergoing Surgical Vitrectomy for Vitreomacular Traction Maculopathy, NCT00123279

²⁴⁷ ClinicalTrials.gov, A Randomized, Sham-Injection Controlled, Double-Masked, Ascending-Dose, Dose-Range-Finding Trial of Microplasmin Intravitreal Injection for Non-Surgical PVD Induction for Treatment of Vitreomacular Traction, MIVI-II, NCT00435539

²⁴⁸ Persmededeling ThromboGenics, 4 december 2007: ThromboGenics presenteert resultaten van de Vitreomaculaire Tractie Studie (MIVI IIT) tijdens de Jaarlijkse Vergadering van de “American Society of Retinal Specialists”.

²⁴⁹ Persmededeling ThromboGenics, 23 mei 2008: ThromboGenics stelt verdere resultaten voor van de Vitreomaculaire Tractie Studie (MIVI IIT) tijdens het jaarlijkse Euretina congres in Wenen.

²⁵⁰ Persmededeling ThromboGenics, 30 juni 2008: ThromboGenics kondigt positieve resultaten aan van zijn Fase IIB studie met Microplasmine bij Vitrectomie (MIVI III).

²⁵¹ Persmededeling ThromboGenics, 14 november 2008: ThromboGenics kondigt veelbelovende resultaten aan van zijn Fase IIB studie (na 6 maanden) met Microplasmine bij Vitrectomie (MIVI III) voor de behandeling van oogziekten.

²⁵² ClinicalTrials.gov, A Randomized, Placebo Controlled, Double-Masked, Multicenter Trial of Microplasmin Intravitreal Injection for Non-Surgical Treatment of Focal Vitreomacular Adhesion, The MIVI-TRUST (TG-MV-006) Trial, NCT00781859.

²⁵³ ClinicalTrials.gov, A Randomized, Placebo Controlled, Double-Masked, Multicenter Trial of Microplasmin Intravitreal Injection for Non-Surgical Treatment of Focal Vitreomacular Adhesion, The MIVI-TRUST (TG-MV-007) Trial, NCT00798317.

na één maand zonder dat een chirurgische ingreep nodig is. Verwacht wordt dat deze twee studies volledig beëindigd zullen zijn tegen eind 2010. Verder staan fase II-studies met microplasmine op stapel voor de behandeling van diabetisch maculair oedeem²⁵⁴ en leeftijdsgebonden maculaire degeneratie.

Microplasmine voor hersentrombose

Microplasmine heeft ook een potentiële toekomst als oplosmiddel van bloedklonters, in het bijzonder voor de behandeling van acute hersentrombose. Microplasmine is een direct werkend tromboliticum met minder nevenwerkingen dan andere trombolytische geneesmiddelen en het potentieel om binnen een langere periode na een beroerte, mogelijk tot twaalf uur, werkzaam te zijn. Een trombolytisch geneesmiddel als t-PA bijvoorbeeld mag maar maximaal drie tot vier uur na het optreden van de beroerte worden toegediend, zodat in de praktijk minder dan vijf procent van de hersentrombosepatiënten met t-PA behandeld worden.

Uit de resultaten van een fase II-studie²⁵⁵ met microplasmine voor de behandeling van acute beroertes bleek dat microplasmine niet enkel goed verdragen werd, maar ook een aantal interessante resultaten boekte op het gebied van werkzaamheid.²⁵⁶ Bij ongeveer 25% van de met microplasmine behandelde patiënten werd binnen acht uur na de behandeling herstel van de bloedstroom vastgesteld, tegenover 10% bij de patiënten die een placebo toegediend kregen. Bovendien werd bij 33% van de patiënten met ernstigere vasculaire blokkeringen die met microplasmine behandeld werden, reperfusie vastgesteld, in vergelijking met 14% van de patiënten die een placebo toegediend kregen. Gezien de kleine omvang van het onderzoek, was geen van deze resultaten statistisch significant. Uit dit onderzoek bleek echter wel dat de patiënten die met microplasmine werden behandeld een statistisch significante kleinere schade aan de bloed-hersenbarrière opliepen in vergelijking met patiënten die een placebo toegediend kregen.

Op basis van de veelbelovende resultaten van deze fase II-studies besloot *ThromboGenics* om voor de verdere ontwikkeling van dit interessante product voor hersentrombose te zoeken naar een kapitaalcrachtige partner, gezien de inherente kosten en risico's die hieraan verbonden zijn. Dit is, niettegenstaande de beloftevolle fase II-resultaten, geen evidentie omdat de ontwikkeling van geneesmiddelen tegen beroerte tot op heden een 'grote ramp' gebleken is. Behalve het

²⁵⁴ Persmededeling ThromboGenics, 6 maart 2009: ThromboGenics beëindigt patiëntenrekrutering voor Fase II studie met microplasmine voor de behandeling van diabetisch maculair oedeem (MIVI II DME).

²⁵⁵ ClinicalTrials.gov, A Multicentre, Double-Blind, Placebo-Controlled, Ascending-Dose, Clinical Trial of Intravenous Microplasin Administration in Patients With Acute Ischemic Stroke, NCT00123305.

²⁵⁶ Persmededeling Thrombogenics, 29 september 2008: ThromboGenics kondigt veelbelovende resultaten aan van MITI IV Fase II studie bij de behandeling van acute hersentrombose met microplasmine.

gebruik van rt-PA, dat binnen de eerste uren na het optreden van de trombose moet toegediend worden, werden vele tientallen beloftevolle geneesmiddelen uitgetoet. Zonder succes.

Stafylokinase

Stafylokinase is een bacterieel eiwit dat bloedklonters oplost en dat kan gebruikt worden bij de behandeling van cardiovasculaire aandoeningen waaronder een hartaanval (zie hoofdstuk stafylokinase, ‘t-PA voor arme mensen’). Uit fase II-studies bleek dat stafylokinase ten minste even doeltreffend is als rt-PA.²⁵⁷ Stafylokinase zou evenwel tegen een veel lagere kostprijs ter beschikking van de patiënten kunnen gesteld worden.

De economische onmogelijkheid om stafylokinase in de Westerse wereld te ontwikkelen als het ‘t-PA van de arme mensen’ is wel de grootste ontgoocheling uit mijn carrière. Ik ben er rotsvast van overtuigd dat stafylokinase een goedkoop levensreddend geneesmiddel zou kunnen zijn, maar in het kader van de huidige regelgeving is dit economisch niet meer haalbaar. Door de heibel rond de ‘megatrials’ (GISSI, ISIS en GUSTO) is het niet langer voldoende om aan te tonen dat een tromboliticum werkt, men moet ook aantonen dat het minstens evenveel levens redt als de huidige standaardtherapie, en die bestaat vandaag in hoofdzaak uit TNK-tPA of tenecteplase. Omdat de dertigdagenmortaliteit bij een hartaanval thans rond de 8% ligt, is het nodig om in een fase III-studie tenminste 15 000 patiënten op te nemen, waarvan de helft behandeld met het controlegeneesmiddel. De totale kost voor TNK-tPA alleen al zou dan ongeveer € 15 miljoen bedragen. Een dergelijke studie in zijn geheel zou € 100 miljoen kosten. Er zit dus niet anders op dan stafylokinase te ontwikkelen voor landen waar geen t-PA beschikbaar is (wegens te duur) en waar de doeltreffendheid in vergelijking met streptokinase als eindpunt aanvaard wordt.

Daarom sloot *ThromboGenics* in 2006 een overeenkomst met *Bharat Biotech International Ltd.* (India) voor de klinische ontwikkeling, productie en het commercialiseren van stafylokinase. *Bharat Biotech* beschikt over de capaciteit om stafylokinase te produceren en voert momenteel besprekingen met de regelgevende autoriteiten in India in verband met het opzetten van fase III-studies.²⁵⁸

²⁵⁷ Vanderschueren S, et al. Randomized coronary patency trial of double-bolus recombinant staphylokinase versus front-loaded alteplase in acute myocardial infarction. *Am Heart J.* 1997; 134: 213-9.

²⁵⁸ Persmededeling ThromboGenics, 6 december 2006: ThromboGenics sluit een licentieovereenkomst met Bharat Biotech voor een nieuw bloedklonteroplossend middel.

²⁵⁹ Persmededeling ThromboGenics, 4 september 2007: ThromboGenics kondigt de succesvolle afsluiting aan van technologietransfer naar Bharat Biotech voor de productie van nieuw bloedklonteroplossend middel.

THR-174 is een stafylokinase van de tweede generatie. Het geneesmiddel heeft een beter werkzaamheids- en veiligheidsprofiel. Deze zijn gedeeltelijk gebaseerd op zijn veranderde immunogeniciteit in vergelijking met de natuurlijke versies van stafylokinase en andere gevestigde trombolitica, zoals streptokinase. In 2007 ondertekende *ThromboGenics* een licentieovereenkomst met *Rhein Minapharm* (Egypte) voor de productie, de klinische ontwikkeling en het commercialiseren van THR-174 in o.a. het Midden-Oosten en Afrika.²⁶⁰

Antilichaam tegen factor VIII (TB-402)

Een ander potentieel geneesmiddel in de pijn van *ThromboGenics* is TB-402. Dit is een antilichaam tegen stollingsfactor VIII (FVIII), een belangrijke component van de bloedstollingscascade. Met TB-402 wil *ThromboGenics* ongewenste bloedklontervorming voorkomen zoals bij diepe veneuze trombose. Deze bloedklonters vormen zich in een diepe ader, meestal in het onderbeen. Er bestaat een gevaar dat deze klonters via het hart naar de longen migreert en een longembolie veroorzaakt. Diepe veneuze trombose wordt als een ernstig algemeen gezondheidsprobleem beschouwd en men schat dat alleen al in de VS elk jaar meer dan 350 000 personen door diepe veneuze trombose of longembolie worden getroffen. Verder zouden beide aandoeningen voor meer dan 100 000 sterfgevallen per jaar verantwoordelijk zijn in de VS.²⁶¹

Bovendien ondergaan steeds meer mensen knieervangende en heupervangende operaties, waarbij het risico op het ontwikkelen van diepe veneuze trombose zeer hoog is (tot 40% zonder antistollingsbehandeling). Al deze patiënten komen in aanmerking voor een profylactische behandeling met antistollingsmiddelen om het risico op de vorming van bloedklonters te verkleinen.

TB-402 is een antistollingsmiddel met verlengde werking (halveringstijd ongeveer drie weken), wat betekent dat de patiënt na een chirurgische ingreep slechts één dosis moet krijgen die ten minste één maand een veilige antistolling oplevert. Belangrijk is dat de effecten van TB-402 omkeerbaar zijn. Dit betekent dat een patiënt die TB-402 toegediend kreeg, zonder probleem een nieuwe chirurgische ingreep kan ondergaan. Het zijn allemaal voordelen die bestaande antistollingsmiddelen ontberen. TB-402 wordt door *ThromboGenics* samen met het Zweedse *BioInvent* ontwikkeld.²⁶²

²⁶⁰ Persmededeling *ThromboGenics*, 4 oktober 2007: *ThromboGenics* en *Rhein Minapharm* kondigen een overeenkomst aan voor een volgende generatie trombolytische middelen.

²⁶¹ Persmededeling Office of the Surgeon General, US Dept. of Health and Human Services, 15 september 2008: Acting Surgeon General Issues 'Call to action to prevent deep vein thrombosis and pulmonary embolism'.

²⁶² Persmededeling *ThromboGenics*, 27 september 2004 : *BioInvent* and *ThromboGenics* strike alliance to jointly develop antibody-based therapeutics.

Op dit ogenblik is een fase II-studie aan de gang.²⁶³ Het betreft een prospectieve, gerandomiseerde, multicenter-, ‘open label’-studie waarbij stijgende dosissen TB-402 worden geëvalueerd die als een eenmalige bolusinspuiting worden toegediend na knieprothesechirurgie. In deze studie zullen 300 patiënten gerekruteerd worden, verdeeld over 36 centra, hoofdzakelijk in Midden-Europa. Het primaire doel is de veiligheid en werkzaamheid van de drie stijgende dosissen van TB-402 te evalueren. Als vergelijkingspunt wordt aan één patiëntengroep heparine gegeven als antistollingsmiddel. Tegen eind 2010 zal deze studie afgerond zijn.

ThromboGenics en *BioInvent* hebben de intentie om TB-402 in licentie te geven aan een partner die over de nodige infrastructuur en financiële middelen beschikt om de klinische ontwikkeling van TB-402 in het laatste stadium af te ronden en garant te staan voor de succesvolle commercialisering ervan, gezien het enorme marktpotentieel.

Een ander toepassingsgebied waar voor TB-402 een aanzienlijk potentieel bestaat, is dat van de voorkamerfibrillatie. Dat zijn hartritmestoornissen die ontstaan doordat de bovenste hartkamers onregelmatig kloppen. Dit kan ertoe leiden dat het bloed niet volledig uit het hart wordt gepompt en stagneert, waardoor bloedklonters ontstaan. Die kunnen via de bloedsomloop in de hersenen terecht komen en leiden tot een beroerte. Voorkamerfibrillatie komt relatief vaak voor bij oudere patiënten: ongeveer zeven miljoen mensen in Europa en de Verenigde Staten lijden eraan. De nieuwe antistollingseigenschappen van TB-402 zouden een veelbelovende behandeling kunnen zijn om beroertes te voorkomen bij patiënten met voorkamerfibrillatie.

Antilichaam tegen PIGF

In juni 2008 sloot *ThromboGenics* een belangrijke partnerovereenkomst met *Roche* voor zijn uniek antikankermiddel TB-403.²⁶⁴ TB-403 is een gehumaniseerd, monoclonaal antilichaam tegen PIGF (placentale groeifactor) dat de vorming van nieuwe bloedvaten in vaste tumoren blokkeert (zie ook hoofdstuk ‘VIB3 – Departement voor Trangene Technologie en Gentherapie’).

Door de vorming van nieuwe bloedvaten te blokkeren, heeft TB-403 het potentieel om de groei en verspreiding van kankercellen te reduceren. Angiogeneseremmers worden reeds klinisch gebruikt, maar de huidige generatie geneesmid-

²⁶³ ClinicalTrials.gov : Single Intravenous Administration of TB-402 for the Prophylaxis of Venous Thromboembolic Events (VTE) After Total Knee Replacement Surgery: A Dose-Escalating, Multicenter, Randomised, Active-Controlled Open Label Study. NCT00793234.

²⁶⁴ Persmededeling ThromboGenics, 18 juni 2008: ThromboGenics en BioInvent kondigen een strategische alliantie aan met Roche voor TB-403, een innovatief antilichaam tegen kanker.

delen, die vooral tegen VEGF gericht zijn, beïnvloeden de groei en de vorming van nieuwe bloedvaten zowel in kankerweefsel als in gezond weefsel. Hun therapeutisch potentieel wordt dan ook gehinderd door nevenwerkingen. Uit onderzoek blijkt dat TB-403 de groei van nieuwe bloedvaten in kankerweefsel kan remmen zonder effect op gezond weefsel.²⁶⁵ Begin juni 2008 kondigde *ThromboGenics* de positieve resultaten aan van een fase Ia-studie voor TB-403.²⁶⁶ Die toonde aan dat TB-403 veilig was en goed verdragen werd en over farmacokinetische eigenschappen beschikt waardoor het voor de behandeling van kanker kan worden ontwikkeld. TB-403 bevindt zich momenteel in een fase Ib-studie²⁶⁷ die de verdraagbaarheid, de farmacokinetische en de farmacodynamische eigenschappen evalueert bij patiënten met kanker in een gevorderd stadium. Deze studie werd overgenomen door *Roche* en ook voor de verdere ontwikkeling is *Roche* verantwoordelijk.

Vooral het financiële aspect van de overeenkomst met *Roche* trok de aandacht. De krant *De Standaard* kopte ‘Kassa rinkelt voor biotechvolbloed’²⁶⁸, *De Tijd* ‘*ThromboGenics* heeft eerste deal met grote jongens beet’.²⁶⁹ De overeenkomst kan op financieel vlak ook moeilijk worden overschat.

Roche betaalde direct €50 miljoen en later, afhankelijk van het behalen van verdere doelstellingen in de ontwikkeling, nog eens tot maximaal €450 miljoen. Van de eventuele verkoop van het middel krijgen *ThromboGenics* en *BioInvent* ‘dubbelcijferige’ royalty’s. Van dit geheel gaat 60% naar *ThromboGenics* en 40% naar *BioInvent*.

Even ter vergelijking: de totale rt-PA-overeenkomst met *Genentech* bracht \$144 miljoen op, inclusief 3% royalty’s.

Vroeg in de pijplijn

Daarnaast is *ThromboGenics* steeds op zoek naar nieuwe opportuniteiten. Het heeft contact met een brede waaier van onderzoekscentra en universiteiten zowel in België als internationaal, om verder onderzoek te doen op innovatieve technologie en moleculen die dan kunnen opgenomen worden in de pijplijn. Zo werd recent het anti-VPAC1-project (*vasoactive intestinal peptide/pituitary adenyl cyclase-activating peptide receptor 1*) opgestart voor de behandeling van

²⁶⁵ Fischer C et al. Anti-PIGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels. *Cell*. 2007; 131: 463-75.

²⁶⁶ Persmededeling *ThromboGenics*, juni 2008: *ThromboGenics* en *BioInvent* kondigen positieve resultaten aan in de Fase I studie met anti-PIGF, TB-403, een anti-kankermiddel.

²⁶⁷ ClinicalTrials.gov: An Open, Phase I, Dose Escalation Study of the Monoclonal Antibody TB-403 Directed Against PIGF, Given as Multiple IV-Doses to Patients With Solid Tumors. NCT00702494.

²⁶⁸ *De Standaard*, ‘Kassa rinkelt voor biotechvolbloed’, 19 juni 2008.

²⁶⁹ *De Tijd*, ‘*Thrombogenesis* heeft eerste deal met grote jongens beet’, 19 juni 2008.

trombocytopenie (lage concentratie van bloedplaatjes). Trombocytopenie is een veel voorkomende, ernstige bijwerking van chemotherapie bij kankerpatiënten. De patiënt loopt dan het risico op spontane bloedingen. Momenteel is de enig beschikbare behandeling een transfusie met bloedplaatjes. Dit biedt echter slechts een tijdelijke oplossing en brengt extra kosten en risico's met zich mee.

Gezamenlijk onderzoek door *ThromboGenics* en de K.U.Leuven heeft aangetoond dat de inhibitie van VPAC1-gestuurde signalen de productie van bloedplaatjes kan stimuleren.²⁷⁰ De VPAC1-receptor bevindt zich aan de oppervlakte van de megakaryocyten, dit zijn de beenmergcellen die bloedplaatjes produceren. De inhibitie van VPAC1 bevordert die productie.

Een winnend team

ThromboGenics is goed op weg om uit te groeien tot een van de meest veelbelovende biotechnologiebedrijven van Europa. Die sterkte van het bedrijf ligt in zijn team dat er de laatste jaren en maanden in geslaagd is uitstekende vooruitgang te boeken met zijn klinische pijplijn, een belangrijke licentieovereenkomst met *Roche* wist af te sluiten en succesvol op zoek is naar nieuwe producten. Zonder twijfel steunt het succes van *ThromboGenics* op zijn excellente wetenschappelijke kennis, zijn rijke academische cultuur en zijn interne expertise. Al die elementen zijn bij *ThromboGenics* van internationaal formaat, en het is voor mij als stichter van het bedrijf een bron van grote voldoening.

²⁷⁰ Freson K, Peeters K, De Vos R, Wittevrongel C, Thys C, Hoylaerts MF, Vermeylen J, Van Geet C. PACAP and its receptor VPAC1 regulate megakaryocyte maturation: therapeutic implications. *Blood*. 2008; 111: 1885-93.

ThromboGenics, beursgenoteerd en wissel op de toekomst



Het team van ThromboGenics NV paart ondernemerschap aan een excellente wetenschappelijke kennis en een rijke academische cultuur.

Epiloog:

Wat nu?

In oktober 2008 werd ik emeritus aan de K.U.Leuven. Het gebeurt nogal eens dat eigenzinnige emeriti niet meer welkom zijn op de campus waar ze eens hun leerstoel hadden. Ze lopen toch maar in de weg van de jonge garde die na een min of meer lange periode van betutteling zijn eigen gang wil gaan. Ik heb van mijn voorganger Marc Verstraete geleerd dat de beste manier om goede relaties met je opvolgers te houden erin bestaat niet ongevraagd met hun activiteiten te interfereren.

Professor Roger Lijnen heeft het Centrum voor Moleculaire en Vasculaire Biologie overgenomen en Professor Peter Carmeliet werd directeur van het Vesalius Research Center. Alles lijkt onder controle te zijn. Als ze mijn raad vragen, zullen ze die krijgen, als ze die niet wensen, is het voor mij ook goed. Mijn bureau en het aangrenzende secretariaat op de negende verdieping van Gasthuisberg blijf ik samen met mijn secretaresse Diane De Wyngaert behouden. Dit is een verworven recht (bij overeenkomst tot eind 2035), voortspuitend uit de medefinanciering van de bouw van de verdieping met t-PA-royalty's. Van hieruit beheren wij *Life Sciences Research Partners* vzw (LSRP), de opvolger van de *D. Collen Research Foundation*.

LSRP is door de K.U.Leuven gemandateerd om de technologietransfer en valorisatie van het Centrum voor Moleculaire en Vasculaire Biologie en van het Vesalius Research Center van VIB/KUL te behartigen. LSRP heeft thans een Raad van Bestuur bestaande uit vier leden: Désiré Collen, voorzitter, Chris Buyse, bestuurder en financieel expert, Guy Mannaerts, bestuurder, afgevaardigd door de K.U.Leuven, en Raymond De Bondt, bestuurder en afgevaardigde van *Biggar Ltd*. *Biggar Ltd* is het werkinstrument van een caritatieve instelling, gefinancierd met t-PA-royalty's in overleg tussen K.U.Leuven en D. Collen volgens de overeenkomst van februari 1976. Door initiële financiering van *ThromboGenics Ltd* aan 1 Iers Pond per aandeel had *Biggar* na de beursgang van *ThromboGenics* in 2006, nog meer dan een derde van de aandelen maar moest onder druk van de institutionele investeerders deels desinvesteren om 'overhang' van aandelen te verminderen. Hierdoor bezit *Biggar* een aanzienlijk kapitaal waarvan jaarlijks ongeveer €1,5 miljoen wordt overgedragen aan LSRP om te gebruiken als zaaifonds voor start-upbedrijven. Duidelijk een nuttige, weliswaar onbezoldigde nevenactiviteit voor een emeritus.

Daarnaast ben ik nog voorzitter van de Raad van Bestuur van *ThromboGenics*. In deze Raad van Bestuur zetelen verder Patrik De Haes, CEO, Chris Buyse, CFO, Landon Clay, thans de grootse aandeelhouder, Jean-Luc Dehaene, Europarlementslid, Staf Van Reet, voorzitter van *Movetis* en Luc Philips, CFO van *KBC*. Bovendien ben ik als wetenschappelijk raadgever van *ThromboGenics nv*, lid van haar '*Preclinical Research Board*' die als taak heeft de 'pijplijn' van kandidaat-geneesmiddelen aan te vullen en die minstens wekelijks een werkvergadering houdt.

Epiloog: Wat nu?



Raad van Bestuur van ThromboGenics NV juni 2009. V.l.n.r. Staf Van Reet, Désiré Collen, Luc Philips, Chris Buyse, Patrik De Haes en Jean-Luc Dehaene. Inzet Landon Clay.

Hoewel mijn toekomst nu grotendeels achter mij ligt, wil ik toch nog wat nuttige dingen blijven doen, tenminste zolang mijn gezondheid het toelaat en de 'goesting' er nog is. Ik verwacht inderdaad niet dat ik in het hiernamaals gestraft zal worden voor mijn zonden of beloond voor mijn goede daden. Ik vrees dus dat het hier zal moeten gebeuren, maar het 'hier en nu' is eigenlijk ook al de moeite waard.

Wat ik duidelijk niet zoek zijn bezoldigde nevenactiviteiten, zeker niet in vast dienstverband. Deze zouden uiteraard inhouden dat ik naar de pijpen van de opdrachtgevers zou moeten dansen maar die tijd is wel voorbij.

Bijlagen

I. Thrombosis test, mijn eerste octrooi

Eerste 'Collen'-octrooi, aanvankelijk ingediend in Nederland, later uitgebreid naar de VS. Het octrooi beschermt de exploitatie in commerciële trombosetests van enzym-inhibitorcomplexen in bloedplasma (waaronder plasmine-antiplasmin, plasmine- α_2 -macroglobuline en thrombine-antithrombine III). De test is echter nooit gecommercialiseerd vanwege het (in die tijd) niet beschikbaar zijn van specifieke (monoklonale) antilichamen.

United States Patent [19] **4,216,291**
Collen [45] **Aug. 5, 1980**

[54] **THROMBOSIS-TEST**[75] Inventor: **Desire J. Collen, Winksele, Belgium**[73] Assignee: **Leuven Research & Development
V.Z.W., Louvain, Belgium**[21] Appl. No.: **949,631**[22] Filed: **Oct. 10, 1978****Related U.S. Application Data**

[63] Continuation of Ser. No. 723,187, Sep. 13, 1976, abandoned.

[30] **Foreign Application Priority Data**

Sep. 19, 1975 [NL] Netherlands 7511055

[51] Int. Cl.² **C07G 7/00; C07G 7/02;
G01N 31/14; G01N 33/16**[52] U.S. Cl. **435/7; 23/230 B;
260/112 R; 424/12; 435/13**[58] Field of Search **195/103.5 A, 103.5 R,
195/99; 424/12, 85, 88; 23/230 B; 435/7, 13;
260/112 R**[56] **References Cited****U.S. PATENT DOCUMENTS**

3,912,805 10/1975 Cayzer et al. 195/103.5 X

OTHER PUBLICATIONSCollen et al., A Tanned Red Cell Hemagglutination Inhibition Immunoassay (TRCHII) for the Quantitative Estimation of Thrombin-Antithrombin III and Plasmin-Alpha-Antiplasmin Complexes in Human Plasma, *Thrombosis Research*, vol. 7 1975, pp. 235-238.

Collen, D., Emergence in Plasma During Activation of

the Coagulation or Fibrinolytic Systems of Neoantigens, Associated with the Complexes of Thrombin or Plasmin with their Inhibitors, *Thrombosis Research*, vol. 5, 1974, pp. 777-779.Collen et al., Immunochemical Distinction Between Antiplasmin and Alpha₁-Antitrypsin, *Thrombosis Research*, vol. 7 1975, pp. 245-249.Merskey et al., A Rapid, Simple, Sensitive Method for Measuring Fibrinolytic Split Products in Human Serum, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, vol. 131 1969, pp. 871-875.*Primary Examiner*—David M. Naff*Attorney, Agent, or Firm*—Lewis H. Eslinger[57] **ABSTRACT**

A thrombosis test is based on the presence of specific, newly-found, enzyme-inhibitor complexes (such as plasmin-antiplasmin, plasmin- α_2 -macroglobulin, thrombin-antithrombin-III) in blood samples having an activated blood coagulation and/or fibrinolytic system. The test is immunochemical and uses a purified antiserum which has been generated against the enzyme-inhibitor complex. The antiserum is purified by incubating the antiserum with plasminogen and fresh blood plasma and isolating a gamma globulin fraction containing antibodies specific to the enzyme-inhibitor complex. A reagent for the test is prepared by contacting a blood cell suspension or a latex of particles of synthetic resin with the purified antiserum to obtain a suspension or latex in which antibodies from the antiserum are present on the surface of the cells or particles.

8 Claims, No Drawings

2. Overeenkomst tussen LR&D en Désiré Collen

Basisovereenkomst met Leuven Research and Development vzw voor de valorisatie van onderzoeksresultaten in het lab van Désiré Collen. Het contract werd getekend in februari 1976 en vormt vele jaren later de basis voor de bestemming van de royalty's op t-PA.



Scanned/Filed

LEUVEN RESEARCH & DEVELOPMENT v.z.w.

OVEREENKOMST

Tussen enerzijds :

De v.z.w. LEUVEN RESEARCH & DEVELOPMENT, met administratieve zetel te 3000 LEUVEN, Groot Begijnhof, Benedenstraat 59, hierna "L.R. & D." genoemd en vertegenwoordigd door Dhr.G. DECLERCQ, Afgevaardigd-Beheerder en J. BOUCKAERT, Directeur.

en

Dr.COLLEN Désiré, Van Monsstraat 67 te 3000 LEUVEN

wordt overeengekomen wat volgt :

Artikel 1 :

Krachtens zijn statuten verschenen in de bijlagen tot het Belgisch Staatsblad van 18 januari 1973 is L.R. & D. gemachtigd onderzoeksresultaten te beschermen, studies en onderzoeken al dan niet onder vorm van met derden aangegane researchcontracten te valoriseren en de opbrengsten ervan ter beschikking te stellen voor verder wetenschappelijk onderzoekswerk aan de Katholieke Universiteit te Leuven.

Artikel 2 :

Dr.D. COLLEN en zijn medewerkers, tewerkgesteld aan de Katholieke Universiteit te Leuven, doen ten voordele van de v.z.w. Leuven Research & Development afstand van alle juridische, commerciële en financiële rechten en de uitoefening ervan, die verbonden zijn aan onderzoeksresultaten die zij rechtstreeks of onrechtstreeks bekomen hebben in het kader van hun onderwijs- en onderzoeksopdrachten aan de Katholieke Universiteit Leuven.

2. Overeenkomst tussen LR&D en Désiré Collen



LEUVEN RESEARCH & DEVELOPMENT v.z.w.

2.

Artikel 3 :

L.R.& D. is alleen gemachtigd deze rechten uit te oefenen en verplicht zich er toe naar best vermogen de juridische, commerciële en financiële belangen van Dr.D. COLLEN en zijn medewerkers te behartigen en te verdedigen.

Artikel 4 :

De eventuele inkomsten zullen door L.R.& D. als volgt verdeeld worden :

- 10 % komt toe aan de Katholieke Universiteit Leuven
- 7 % komt toe aan de v.z.w. Leuven Research & Development
- Na aftrek van alle kosten verbonden aan de uitoefening van zijn opdracht zal L.R.& D. minimum 50 % van het resterend gedeelte ter beschikking houden voor verder onderzoek in het laboratorium van Dr.D. COLLEN. Het resterend gedeelte kan aan Dr.D. COLLEN en zijn medewerkers als persoonlijke vergoeding uitgekeerd worden.

Artikel 5 :

De concrete verdelingsmodaliteiten zullen ten gepaster tijd in onderling overleg tussen L.R.& D. en Dr.D. COLLEN bepaald worden en ter goedkeuring aan de raad van beheer van L.R.& D. worden voorgelegd. De raad van beheer van L.R.& D. kan ten allen tijde zijn standpunt hierin aanpassen aan de omstandigheden.

Opgemaakt in Leuven in twee exemplaren.

Dr. D. COLLEN

Leuven, 11 Februari 1976

Gezien
PROF. M. VERSTRAETE

Gezien

Voor LEUVEN RESEARCH & DEVELOPMENT v.z.w.

Leuven, 11 Februari 1976

G. DECLERCQ
Afgevaardigd-Beheerder

J. BOUCKAERT
Directeur

3. Het t-PA-octrooi

Voorblad van het octrooi op t-PA, eerst ingediend in Nederland op 11 juni 1980, later uitgebreid naar de VS. Het octrooi werd op 21 juni 1988 toegekend aan *Leuven Research & Development vzw*, als uitvinders staan vermeld Désiré Collen, Dick Rijken en Osamu Matsuo.

United States Patent [19] [11] **Patent Number: 4,752,603**
Collen et al. [45] **Date of Patent: Jun. 21, 1988**

- [54] **PLASMINOGEN ACTIVATOR AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION HAVING THROMBOLYTIC ACTIVITY**
- [75] Inventors: **Desire J. Collen, Leuven, Belgium; Dingeman C. Rijken, Leiden, Netherlands; Osamu Matsuo, Osaka, Japan**
- [73] Assignee: **Leuven Research and Development VZW, Leuven Belgium**
- [21] Appl. No.: **867,561**
- [22] Filed: **May 28, 1986**
- Related U.S. Application Data**
- [63] Continuation of Ser. No. 640,550, Aug. 15, 1984, abandoned, which is a continuation of Ser. No. 272,093, Jun. 10, 1981, abandoned, which is a continuation-in-part of Ser. No. 183,638, Sep. 3, 1980, abandoned.
- [30] **Foreign Application Priority Data**
 Jun. 11, 1980 [NL] Netherlands 8003402
- [51] **Int. Cl.⁴ A61K 37/00**
- [52] **U.S. Cl. 514/21; 514/2; 514/8; 530/300; 530/350; 530/828**
- [58] **Field of Search 514/2, 21, 8; 530/828, 530/300, 350**
- [56] **References Cited**
- U.S. PATENT DOCUMENTS**
- 3,904,480 9/1975 Hull et al. .
 4,245,051 1/1981 Reich et al. .
 4,259,447 4/1981 Hafeli .
 4,317,882 4/1982 Horiguchi et al. .
 4,370,417 1/1983 Hung et al. .
- FOREIGN PATENT DOCUMENTS**
- 0005644 11/1979 European Pat. Off. .
 1492959 11/1977 United Kingdom .
 1551275 8/1979 United Kingdom .
 2025977 1/1980 United Kingdom .
- OTHER PUBLICATIONS**
- Allen, *Cell. Biol.* 4, 803, (1980); *Chemical Abstracts* 93, No. 183281.
 Angles-Cano et al., *C.R. Hebd. Seances Acad. Sc.* 289, 485 (1979); *Chemical Abstracts* 92, No. 3674m (1980).
 Aoki, *Journal Biochem.* 75, 731 (1974).
 Astrup et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 40, 346 (1952).
 Barlow et al., *Proc. Sero Symp.* 9, 75 (1977); *Chemical Abstracts* 89, No. 57188j (1978).
 Binder et al., *Journal of Biological Chemistry* 254, 1998 (1979).
 Camiolo et al., *PSEBM* 138, 277 (1971).
 Christman et al., *Proteinases in Mammalian Cells and Tissues*. (A. J. Barrett, ed.; Elsevier, Amsterdam), pp. 91-149.
 Collen, *Edward Kowalski Memorial Lecture, Thromb Haem* 43, 77 (1980).
 Danoe et al., *Biochemica et Biophysica Acta* 613, 542 (1980); *Chemical Abstracts* 93, No. 90924b (1980).
 Danoe et al., *J. Exp. Med.* 147, 745 (1978); *Chemical Abstracts* 88, No. 150159q (1978).
 Fraki et al., *J. Cutaneous Pathol.* 6, 195 (1979); *Chemical Abstracts* 92, No. 445w (1980).
 Granelli-Piperino et al., *J. Exp. Medicine* 148, 223 (1978).
 Heussen et al., *Analytical Biochemistry* 102, 196 (1980); *Chemical Abstracts* 92, No. 89750q.
 Klavina et al., *Produsenty Aminokislot i Fermentov* 1978, 94; *Chemical Abstracts* 89, No. 125054q (1978).
 Ouchterlony, *Progress in Allergy V*, (P. Kallos, ed.), 1 (1958).
 Petrenko, *Purification and Properties of Plasminogen Activator from Human Blood Plasma after Sudden Death*, p. 1127; *Biokhimiya* 43, 1438 (1978); *Chemical Abstracts* 89, No. 192926p (1978).
 Porath et al., *Nature* 258, 598 (1975).
 Pye et al., *Proc. Sero Symp.* 9, 43 (1977); *Chemical Abstracts* 89, No. 159241p (1978).
 Radcliffe et al., *Archives of Biochemistry and Biophysics* 189, 185 (1978).
 Rijken et al., *Biochemica et Biophysica Acta* 580, 140 (1979); *Chemical Abstracts* 91, No. 170680t (1979).
 Rijken, D. C., *Plasminogen Activator from Human Tissue*, Thesis pp. 1-125 (1980).
 Rijken, D. C. et al., *J. Biol. Chem.* 256, 7035 (1981).
 Roblin et al., *Cancer Research* 40, 2706 (1980); *Chemical Abstracts* 93, No. 126098b (1980).
 Thorsen et al., *Thrombos Diathes. haemorrh* 28, 65 (1972).
 Thorsen, *Danish Medical Bulletin* 24, 189 (1977).
 Shiba et al., *JA* 7844612, 21 Apr. 1978; *Chemical Abstracts* 89, No. 103261c (1978).
 Vetterlein et al., *J. Biol. Chem.* 254, 575 (1979); *Chemical Abstracts* 90, No. 135631k (1979).
 Vermeylen et al., *Clin. Chim. Acta* 8, 418 (1963).
 Wallen, *Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis*, 3, 167.
 Wang et al., *Cancer Research* 40, 288 (1980); *Chemical Abstracts* 92, No. 92449d.
 Weber & Osborn, *J. Biol. Chem.* 244, 4406 (1969).
 Wilson, E. L. et al., *Chemical Abstracts* 92, No. 144679a (1980).
 Wu et al., *Int. J. Biochem.* 10, 1001 (1979); *Chemical Abstracts* 92, No. 54020z (1980).
 Sumitomo Chemical Co., *Jap. Kokai* 79147993, 19 Nov. 1979; *Chemical Abstracts* 92, No. 106531p (1980).
Chemical Abstract Ninth Collection Index, 70-85, 29549cs (1972-1976).
 Wiman et al., *Nature* 272, 549 (1978).
- Primary Examiner—Sam Rosen**
Attorney, Agent, or Firm—Walter H. Dreger
- [57] **ABSTRACT**
- A new plasminogen activator which is very similar to the plasminogen activator from blood can be isolated in good amounts from the culture fluid of human melanoma cells.
- This new plasminogen activator has a strong thrombolytic effect and pharmaceutical compositions thereof may be used in the therapeutic treatment of thrombosis disorders.
- 3 Claims, No Drawings**

4. Eerste overeenkomst tussen Genentech en Leuven Research & Development vzw

GENENTECH, INC.
460 POINT SAN BRUNO BOULEVARD
SOUTH SAN FRANCISCO, CALIFORNIA 94080
(415) 952-0123 TWX: 9103717168

Scanned/Filed

COOPERATIVE LETTER OF AGREEMENT BETWEEN
GENENTECH, INC.
AND
LEUVEN RESEARCH & DEVELOPMENT V.Z.W.

Genentech, Inc. and Leuven Research & Development V.Z.W., representing the University of Leuven and Dr. Desire Collen, agree to cooperate with each other in the development of human tissue plasminogen activators.

The points of cooperation are:

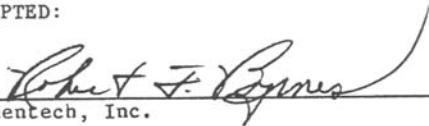
- A. Leuven Research & Development V.Z.W. via Dr. Desire Collen will provide Genentech with:
1. Appropriate cell line(s) that are producing maximal levels of the tissue activators. These cells will be used for RNA extraction in order to make the complementary DNA necessary for cloning.
 2. A quantity of purified tissue activator material to conduct sequencing in order to compare the gene sequence we obtain from the cloned material with your original purified tissue plasminogen activator. Purified activator will also be used as standard in any assays that are developed.
 3. A source of antibody to help in the identification of positive clones.
- B. In consideration for the above, Genentech will provide Leuven Research & Development V.Z.W. with:
1. Human tissue plasminogen activator when successfully produced from bacterial sources for use in biochemical and pharmacological clinical studies.
 2. Recognition of Leuven Research & Development V.Z.W. (Dr. Desire Collen) on any scientific publications that arise from these investigations.
 3. A royalty of 1% applicable to Genentech income derived from the sale of product made using any material provided by Leuven Research & Development V.Z.W.

4. Eerste overeenkomst tussen Genentech en Leuven Research & Development vzw

Cooperative Letter of Agreement
Page 2

In addition, it is understood that should Leuven Research & Development V.Z.W. obtain patent rights to human tissue plasminogen activators, Genentech shall have a right of first refusal to negotiate for an exclusive, royalty-bearing, worldwide license under any such patents. At the least, Genentech, for the 1% royalty payment mentioned in point B-3 above, shall have non-exclusive worldwide rights under any such patents granted Leuven Research & Development V.Z.W.

ACCEPTED:



Genentech, Inc.

Leuven Research & Development V.Z.W.

5. Succesvolle klonering van t-PA

214

ARTICLES

NATURE VOL. 301 20 JANUARY 1983

Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E. coli*

Diane Pennica^{*}, William E. Holmes^{*}, William J. Kohr[†], Richard N. Harkins[†],
Gordon A. Vehar[†], Carole A. Ward[†], William F. Bennett[†], Elizabeth Yelverton^{*},
Peter H. Seeburg^{*}, Herbert L. Heyneker^{*} & David V. Goeddel^{*}

Departments of ^{*}Molecular Biology and [†]Protein Biochemistry, Genentech, Inc., 460 Point San Bruno Boulevard, South San Francisco, California 94080, USA

Desire Collen

Center for Thrombosis and Vascular Research, Department of Medical Research, University of Leuven, B-3000 Leuven, Belgium

NATURE VOL. 301 20 JANUARY 1983

ARTICLES

219

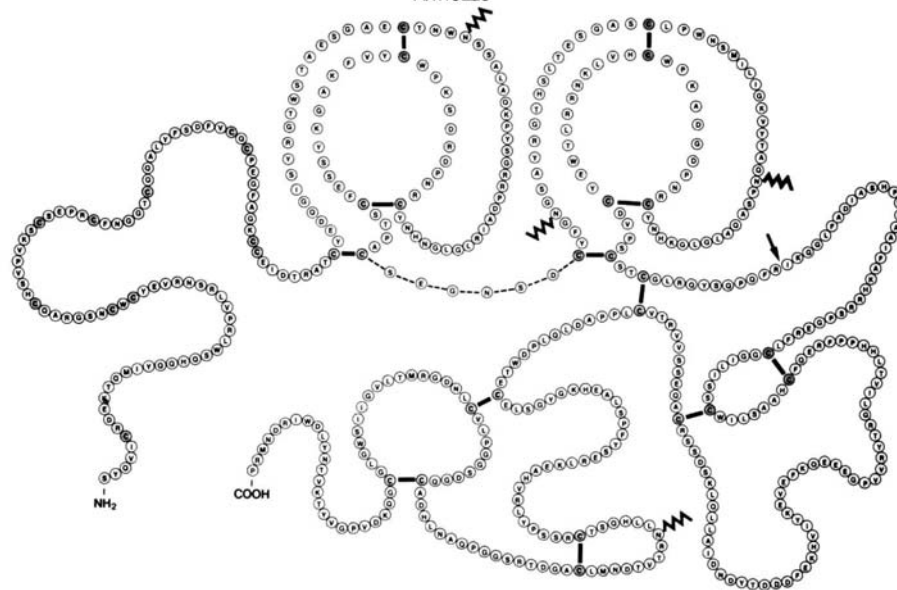


Fig. 6 Schematic diagram of the potential structure of human tissue-type plasminogen activator. The one-letter code for each of the amino acids is given in the open circles. The one-letter abbreviations are those recommended by the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature²⁴. The cysteine residues are shaded. The solid black bars indicate the potential disulphide bridges based on homology with other serine proteases. The arrow indicates the potential cleavage site between arginine and the isoleucine which generates the two-chain molecule from the one-chain form. The zig-zag lines indicate potential glycosylation sites. The broken lines connect the six amino acids between the two kringles.

6. Publicatie in *New England Journal of Medicine*

CORONARY THROMBOLYSIS WITH TISSUE-TYPE PLASMINOGEN ACTIVATOR IN PATIENTS WITH EVOLVING MYOCARDIAL INFARCTION

FRANS VAN DE WERF, M.D., PHILIP A. LUDBROOK, M.B., B.S., STEVEN R. BERGMANN, PH.D.,
ALAN J. TIEFENBRUNN, M.D., KEITH A. A. FOX, M.B., CH.B., HILAIRE DE GEEST, M.D.,
MARC VERSTRAETE, M.D., PH.D., DESIRE COLLEN, M.D., PH.D., AND BURTON E. SOBEL, M.D.

Abstract Tissue-type plasminogen activator is a naturally occurring, clot-selective activator of fibrinolysis. We recently reported that human tissue-type plasminogen activator isolated from a Bowes-melanoma-tissue-culture supernate lysed coronary thrombi in dogs without depleting circulating fibrinogen or α_2 -antiplasmin, in contrast to the case with streptokinase and urokinase. In the present study coronary thrombolysis, confirmed angiographically, was induced within 19 to 50 minutes with intravenous or intracoronary tissue-type plasminogen activator in six of seven patients with evolving myocardial infarction. Circulating fibrinogen, plasminogen, and α_2 -antiplasmin were not depleted by this

agent, in contrast to the case in the two patients subsequently given streptokinase. In the one patient in whom lysis was not inducible with tissue-type plasminogen activator, it was also not inducible with streptokinase.

These observations indicate that clot-selective coronary thrombolysis can be induced in patients with evolving myocardial infarction by means of tissue-type plasminogen activator, without concomitant induction of a systemic lytic state. Definition of its therapeutic benefit must await greater availability of the agent and the performance of appropriate clinical trials. (N Engl J Med 1984; 310:609-13.)

INITIATION of myocardial reperfusion by systemic activation of the fibrinolytic system was demonstrated more than 20 years ago,^{1,2} and reperfusion by intracoronary administration of activators in pilot studies was reported as early as 1976.³ Enthusiasm for the approach was kindled by the observations by Rentrop et al.,⁴ who demonstrated that thrombolysis with intracoronary streptokinase restored angiographic patency to the occluded vessels supplying jeopardized myocardium in as many as 80 per cent of patients,⁵ and by DeWood et al., who angiographically documented coronary thrombosis soon after the onset of symptoms in patients with evolving acute myocardial infarction.⁶ Beneficial effects on global^{7,8} and regional ventricular function,⁹ perfusion,¹⁰ and myocardial metabolic integrity¹¹⁻¹³ have been observed.

Activators such as streptokinase or urokinase have recently been given for the most part by the intracoronary route, in the hope of providing a high local concentration while minimizing the predisposition to systemic bleeding. Whether administration is intracoronary or intravenous,¹⁴ streptokinase and uroki-

nase activate the fibrinolytic system in the general circulation,¹⁵ inducing what has been called a systemic lytic state.¹⁶ The lytic state increases the risk of bleeding and is reflected by conversion of plasminogen to plasmin in the circulation, proteolytic depletion of circulating fibrinogen, accumulation of fibrinogen-degradation products, and consumption of circulating α_2 -antiplasmin.

Since the potential benefit of coronary thrombolysis is markedly dependent on its prompt implementation^{11,17} and safety — e.g., during surgery which is frequently needed soon after thrombolysis to correct high-grade residual stenosis — certain properties are desirable in an activator. These include lack of antigenicity, selectivity of action on a clot, avoidance of induction of a systemic lytic state, and a short biologic half-life so that hemostatic integrity can be restored promptly in patients requiring invasive procedures. Accordingly, we have been evaluating the potential utility of tissue-type plasminogen activator for coronary thrombolysis.¹²

Tissue-type plasminogen activator is a naturally occurring serine protease that activates the fibrinolytic system under physiologic conditions by converting plasminogen to plasmin. It does not bind avidly to circulating plasminogen ($K_M = 65 \mu\text{M}$) but has a high affinity for fibrin ($K_d = 0.16 \mu\text{M}$). Circulating plasminogen binds avidly to the tissue-type plasminogen activator-fibrin complex through the plasmino-

From the Washington University School of Medicine, St. Louis, and the University of Leuven, Leuven, Belgium. Address reprint requests to Dr. Sobel at the Cardiovascular Division, Washington University School of Medicine, 660 S. Euclid, Box 8086, St. Louis, MO 63110.

Supported in part by a grant (HL 17646 [Specialized Centers of Research in Ischemic Heart Disease]) from the National Institutes of Health and by the Geconcerteerde Onderzoeksacties (Project 80/85-3).

7. Proces in Wilmington

Verdict van de jury in de zaak 'Genentech, Innovi en Leuven Research & Development' tegen 'Burroughs-Wellcome en Genetics Institute' rond de t-PA-patenten.

APR 10 '90 13:37 BAYARD HANDELMAN P.2/9

AO 450 (Rev. 5/85) Judgment in a Civil Case

B.H.B.M., P.A.

United States District Court

for the DISTRICT OF Delaware

GENENTECH, INC., INNOVI N.V. and LEUVEN RESEARCH & DEVELOPMENT VZW,
Plaintiffs,

JUDGMENT IN A CIVIL CASE

V.

THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED, WELLCOME BIOTECHNOLOGY LIMITED, BURROUGHS WELLCOME CO., BW MANUFACTURING, INC., GENETICS INSTITUTE, INC., GI MANUFACTURING, INC., and WELGEN MANUFACTURING, INC.,
Defendants.

CASE NUMBER: CA 88-330/89-407 JJF

Jury Verdict. This action came before the Court for a trial by jury. The issues have been tried and the jury has rendered its verdict and answered special interrogatories verdict form.

Decision by Court. This action came to trial or hearing before the Court. The issues have been tried or heard and a decision has been rendered.

IT IS ORDERED AND ADJUDGED that Judgment be and hereby entered in favor of the plaintiffs' Genentech, Inc., Innovi N.V. and Leuven Research & Development VZW and against the defendants' The Wellcome Foundation Limited, Wellcome Biotechnology Limited, Burroughs Wellcome Co., BW Manufacturing, Inc., Genetics Institute, Inc., GI Manufacturing, Inc., and Welgen Manufacturing, Inc. (SEE ATTACHED SPECIAL INTERROGATORIES)

Joseph J. Fanson, Jr.
J.
FORM OF JUDGMENT APPROVED in accordance with
RULE 58 FRCP

April 6, 1990
Date

John R. McAllister, Jr.
Clerk

cc: Richard K. Herrmann, Esq.
Arthur G. Connolly, Jr., Esq.
Robert H. Richards, III, Esq.

Joseph J. Fanson, Jr.
(By) Deputy Clerk

RULE 49(a) SPECIAL VERDICTS

A. Equivalence

1. Do you find that Genentech has proved by a preponderance of the evidence that the product and process of Wellcome are equivalent to that claimed in the following patents? Mark your answer with an "X" in the appropriate space.

| | YES | NO |
|---------------------|------------|-------|
| '603 Collen Patent | ✓ _____ | _____ |
| '330 Goeddel Patent | ✓ _____ | _____ |

2. Do you find that Genentech has proved by a preponderance of the evidence that the product and process of Genetics Institute are equivalent to that claimed in the following patents? Mark your answer with an "X" in the appropriate space.

| | YES | NO |
|---------------------|------------|-------|
| '603 Collen Patent | ✓ _____ | _____ |
| '075 Goeddel Patent | ✓ _____ | _____ |
| '330 Goeddel Patent | ✓ _____ | _____ |

3. If you found for Genentech in Question Nos. 1 or 2, what is the amount of damages appropriate to compensate Genentech?

Damages from Wellcome \$ None

Damages from Genetics Institute \$ None

8. Document dat de fusie tussen nv t-PA en Thromb-X bekrachtigt

FUSIEVOORSTEL

Op donderdag 4 november 1993 werd, overeenkomstig Artikel 174/2 van de Vennootschappenwet, door de Raden van Bestuur van de navermelde vennootschappen, in gemeen overleg, het volgende fusievoorstel opgesteld, waarvan de tekst hierna volgt.

De aan de voorgestelde fusie deelnemende vennootschappen zijn:

1. de naamloze vennootschap "THROMB-X", met maatschappelijke zetel te 3000 Leuven, Leopoldstraat 1, Bus 21, handelsregister nr. 81 514, BTW-nummer 446.116.955, hier vertegenwoordigd door de heer Hans Claes, gehuisvest te 3140 Keerbergen, Tremelobaan 145, hierna genoemd "de overnemende vennootschap";
2. de naamloze vennootschap "t-PA", met maatschappelijke zetel te 3000 Leuven, Groot Begijnhof, Benedenstraat 59, handelsregister nr. 76 384, BTW-nummer 438.374.573, hier vertegenwoordigd door de heer Jacques Vander Eecken, gehuisvest te 3210 Linden, Jachthuislaan 16, en de heer Karel Tavernier, gehuisvest te 3210 Linden, Jachthuislaan 4, hierna genoemd "de over te nemen vennootschap".

De Raden van Bestuur van voornoemde vennootschappen verbinden zich jegens elkaar om te doen wat in hun macht ligt om tussen deze vennootschappen een fusie tot stand te brengen tegen de navermelde voorwaarden en leggen bij deze het fusievoorstel vast dat ter goedkeuring zal worden voorgelegd aan de respectieve Algemene Vergaderingen van deze vennootschappen.

Het voorstel komt er essentieel op neer dat ten gevolge van de toekomstige verwerving van alle aandelen van de vennootschap t-PA N.V. door de vennootschap THROMB-X NV, de vennootschap t-PA N.V. ontbonden zal worden, zonder vereffening en dat het hele vermogen van de vennootschap, zowel de rechten als verplichtingen, zullen overgaan naar THROMB-X NV. Als redenen hiervoor worden de volgende argumenten gegeven. De onderzoeksprojecten die door t-PA N.V. werden uitgevoerd met als doel de ontwikkeling van nieuwe diagnostische en therapeutische stoffen voor de voorkoming of verwijdering van trombose hebben tot op heden geen concreet resultaat opgeleverd in de zin van een commercialiseerbaar farmaceutisch produkt. Deze onderzoeken hebben evenwel geleid tot de opbouw van een zeer aanzienlijke kennis en know-how op het gebied van trombolitica. De vennootschap THROMB-X N.V. beschikt terzake over een exclusieve licentie op een aantal octrooiaanvragen op het gebied van ontwikkeling van therapeutische stoffen voor de voorkoming of verwijdering van tromboses. THROMB-X NV heeft terzake eveneens reeds overeenkomsten afgesloten met derde partijen voor de ontwikkeling van een pilootfabriek.

al
Wp

9. Oprichtingsakte van Thromb-X

N. 920109 — 787

« Thromb-X », naamloze vennootschap

Leopoldstraat 1/21
Leuven

OPRICHTING — BENOEMINGEN

Er blijkt uit een akte, verleden voor notaris Paul Kulpjers te Leuven-Heverlee op twintig december negentienhonderd éénennegentig, geregistreerd te Leuven, eerste kantoor der registratie, op vierentwintig december nadien boek 232 blad 69 vak 20, dat er een naamloze vennootschap werd opgericht, met als naam "THROMB-X" en zetel te Leuven, Leopoldstraat 1/21, voor onbepaalde duur, door: a) de heer Désiré COLLEN, hoogleraar, gehuisvest te Herent-Winksele, Schoonzichtlaan 20; b) de vereniging zonder winstoogmerk "LEUVEN RESEARCH & DEVELOPMENT", met zetel te Leuven, Krakenstraat 3.

Het kapitaal bedraagt vijftien miljoen frank, verdeeld in tweeduizend vijfhonderd aandelen zonder nominale waarde, volledig volstort door de oprichters, te weten: 1) door de heer Désiré COLLEN: twaalfhonderdvijftig aandelen of twaalf miljoen vijfhonderdduizend frank, volstort ten belope van twee miljoen vijfhonderdduizend (2.500.000) frank; 2) door de vereniging zonder winstoogmerk "LEUVEN RESEARCH & DEVELOPMENT": twaalfhonderdvijftig aandelen of twaalf miljoen vijfhonderdduizend frank, volstort ten belope van twee miljoen vijfhonderdduizend frank.

Er werden eveneens beoedrukt vijfhonderd winstaandelen gecreëerd, waarvan twaalfhonderdvijftig (1.250) aandelen met stemrecht en twaalfhonderdvijftig (1.250) aandelen zonder stemrecht, en allen met deelname in de winst. Zij genieten dezelfde rechten als de kapitaals aandelen van de vennootschap voor wat betreft de winstverdeling en de verdeling van het vereffeningsoverschot. De winstaandelen met stemrecht worden meegeteld voor de berekening van het wonen op de algemene vergaderingen. De winstaandelen zijn en blijven op naam.

De raad van bestuur is gemachtigd het kapitaal te verhogen ten belope van honderdvijftien miljoen frank tot honderdvijftig miljoen frank, in één of meerdere keren, eventueel mits opzetting van reserves. De raad van bestuur kan binnen de grenzen van het toegestaan kapitaal converteerbare obligaties of warrants uitgeven.

De vennootschap heeft tot doel het uitoefenen van alle beheers- en financiële activiteiten en meer in het bijzonder: onderzoek naar, ontwikkeling van en verkoop van diagnostische en therapeutische stoffen voor de voorkoming of verwijdering van trombose, en andere farmaca in het domein van de menselijke geneeskunde. Zij mag bij middel andere wijze belangen nemen in alle vennootschappen of ondernemingen die een soortgelijk of gelijkaardig doel hebben. In het algemeen mag zij alle industriële, commerciële, financiële, onroerende en roerende verhandelingen doen die rechtstreeks of onrechtstreeks in verband staan met haar doel of die van aard zijn haar nijverheid of haar handel uit te breiden of te bevorderen.

Het batig overschot van de balans, na aftrek van de algemene onkosten, maatschappelijke lasten met inbegrip van de provisie voor de belastingen op de winst van het boekjaar en de nodige afschrijvingen, vormt de zuivere winst. Van deze winst wordt ten minste vijf ten honderd afgehouden voor het aanleggen van de wettelijke reserve. Deze afhouding houdt op verplichtend te zijn wanneer het reservefonds één/tiende bedraagt van het kapitaal. Deze afhouding dient opnieuw te gebeuren indien dit tiende aangetast wordt. Het eventuele saldo wordt ter beschikking gesteld van de algemene vergadering die zal beslissen over de aanwending ervan. Voor zover het aantal aandelen zonder stemrecht niet méér dan één/derde van het maatschappelijk kapitaal vertegenwoordigt of heeft vertegenwoordigd, geven deze aandelen recht op een preferent en opvorderbaar dividend alsmede op een recht in de uitkering van het winstoverschot, dat niet lager mag zijn dan dat van het winstoverschot van de aandelen met stemrecht.

Na ontbinding zal in voorkomend geval het positief vereffeningssaldo, na aanzuivering van alle schulden, lasten en vereffeningskosten of daartoe gedane consignatie, eerst dienen om de aandelen terug te betalen onder aftrek van het bedrag dat gebeurlijk nog zou verschuldigd zijn voor de volledige volstorting. Het eventueel saldo zal éénovrig verdeeld worden onder alle aandelen. Voor zover het aantal aandelen zonder stemrecht niet méér dan één/derde van het maatschappelijk kapitaal vertegenwoordigt of heeft vertegenwoordigd, geven deze aandelen een recht op de uitkering van het na vereffening overblijvende saldo, waarvan het bedrag niet lager mag zijn dan dat uitgekeerd aan de houders van aandelen met stemrecht.

Het boekjaar begint op één januari en eindigt op éénendertig december van ieder jaar. Het afsluiten van het eerste boekjaar is vastgesteld op éénendertig december negentienhonderd tweënegentig. De gewone jaarvergadering komt bijeen op de eerste maandag van de maand april van ieder jaar om zestien uur in de zetel, of op iedere andere plaats in België die aangegeven zou worden in de bijeenroeping. Indien deze dag een wettelijke feestdag is, wordt de vergadering de eerstvolgende werkdag gehouden op hetzelfde uur.

Om toegelaten te worden tot de algemene vergadering moeten de aandeelhouders op naam tenminste vijf dagen voor de vergadering hun aandelen neerleggen op de zetel of op de plaats in België, in de oproepingsbrief vermeld, tanzij de oproepingsbrief anders vermeldt. Ieder aandeel geeft recht op één stem. De aandeelhouders kunnen hun stem schriftelijk uitbrengen. Daartoe moet de stambrief, gedateerd en ondertekend, de vennootschap bereiken ten minste vijf dagen vóór het houden van de algemene vergadering.

De vennootschap wordt bestuurd door een raad van bestuur, bestaande uit ten minste drie leden, vennoten of niet, benoemd voor ten hoogste zes jaar door de algemene vergadering der aandeelhouders en door haar steeds afzetbaar, de uittreedende bestuurders zijn dadelijk herverkiezbaar.

De raad van bestuur heeft de meest uitgebreide beheers- en beschikkingsmacht voor het bestuur der zaken van de vennootschap. Alle handelingen die niet uitdrukkelijk door de wet of door de statuten voorbehouden zijn aan de algemene vergadering, vallen onder zijn bevoegdheid. Behoudens bijzondere machtiging gegeven door de raad van bestuur, worden alle akten die de vennootschap verbinden, geldig ondertekend hetzij door de voorzitter, hetzij door de gedelegeerd bestuurder, hetzij door twee bestuurders, die ten overstaan van derden, zelfs tegenover een openbaar functionaris of een ministerieel ambtenaar alsmede tegenover de hypotheekbewaarder, geen verrechtsvaardiging van een voorafgaande beslissing van de raad zullen moeten voorleggen.

Worden geroepen tot de functies van bestuurder: de heer Désiré Collen, voornoemd; mevrouw Louisa Rita Paula Reniers, zonder beroep, gehuisvest te Herent-Winksele, Schoonzichtlaan 20; de heer Hans Alfons Julien Claes, directeur, gehuisvest te Keerbergen, Translobaan 145, en de heer Jacques Albert Henri Vander Eeckien, voornoemd.

De heer Désiré Collen wordt geroepen tot het voorzitterschap van de raad van bestuur. De heer Hans Claes wordt geroepen tot de functie van gedelegeerd bestuurder. In deze laatste hoedanigheid wordt hij belast met het bestuur van de vennootschap, hierin onder meer begrepen alle financiële verrichtingen beperkt tot vijfhonderdduizend frank. Voor de noden en binnen de perken van dit bestuur zal zijn handtekening, afzonderlijk gebruikt, geldig de vennootschap verbinden. Onder zijn verantwoordelijkheid kan hij het geheel of een deel van zijn machten van het bestuur overdragen aan derden, hierin onder meer begrepen alle financiële verrichtingen beperkt tot tweehonderdduizend frank.

Voor ontledend uittreksel:

(Get.) Paul Kulpjers,
notaris.

Bijgevoegd: uitgifte van de oprichtingsakte met banktest en volmacht.

Neergelegd te Leuven, 31 december 1991 (A/7807).

3 3900 BTW 10 pct. 741 4641

(4211)

10. Overeenkomst tussen Thromb-X en 4C

Page 1

03OCT02

CONVENTION DE CESSION DE PARTS

Entre d'une part :

Monsieur Alain, Othon, André MILLER,

Docteur en Sciences,
Demeurant à 7000 Mons, Bld Albert Elisabeth, 63

Et :

Madame Christine GYSELINGS,

Employée,
Demeurant à 7000 Mons, Bld Albert Elisabeth, 63

Ci-après dénommés « les cédants »

Et d'autre part :

Monsieur Désiré COLLEN, demeurant à SW5 0HN London, 28, Collingham Gardens, UK

agissant pour Thromb-X, NV dont le siège social est sis à Leopold I Straat 1, bus 21, 3000 Leuven

Ci-après dénommé « l'acquéreur »

IL A ETE EXPRESSEMENT CONVENU ET ACCEPTE CE QUI SUIT :

Article 1 : objet

Les cédants cèdent à l'acquéreur qui accepte, les 2.500 actions de capital nominatives, sans mention de valeur nominale, représentant chacune un 2.500^e du capital social de la SA Compagnie d'Investissements du Larzac, en abrégé « CIL », dont le siège social est sis à 7000 Mons, bld Albert Elisabeth, 63, dont ils sont propriétaires.

Article 12

Sous réserve d'un accord des autres membres du Conseil d'Administration, la CIL s'engage à voter positivement la signature d'un bail de 24 mois permettant la mise à disposition de 2 locaux au rez de chaussée de la "Villa" Rue de la Marlette, 14 7180 Seneffe pour un forfait de 743,68 € par mois.

Article 13

Le transfert de propriété s'effectuera par remise du chèque conformément au montant prévu par la convention le .. /10/02 , Rue de la Marlette 14 7180 Seneffe.

A défaut de paiement à la date et au lieu convenu, la présente convention sera résiliée de plein droit sans autre recours pour les parties signataires.

Fait à Seneffe , le

En trois exemplaires originaux, Chacune des parties reconnaissant avoir reçu un exemplaire.


03 OCT 02

Conditional upon conclusion of shareholder agreement
confirmation of phone agreement of Sam Pillez.

03/10/02

Sam Pillez



G

11. Oprichtingsakte van de D. Collen Research Foundation

N. 14130

(29618)

« D. Collen Research Foundation »

3000 Leuven

Identificatienummer : 14130/88

STATUTEN

De hierna genoemde personen :

A. Collen, Désiré, gewoon hoogleraar K.U.-Leuven, Schoonzichtlaan 20, 3009 Winksele (Herent), van Belgische nationaliteit;

B. Katholieke Universiteit Leuven, Oude Markt 13, 3000 Leuven, vertegenwoordigd door haar rector, Dillemans, Roger, gewoon hoogleraar K.U.-Leuven, en door haar algemeen beheerder Tavernier, Karel, gewoon hoogleraar K.U.-Leuven, van Belgische nationaliteit;

C. Leuven Research and Development v.z.w., Groot Begijnhof, Benedenstraat 59, 3000 Leuven, vertegenwoordigd door haar voorzitter, Vander Eecken, Jacques, gewoon hoogleraar K.U.-Leuven, van Belgische nationaliteit;

D. Harvard Medical School, 25 Shattuck Street, Boston, MA 02115, vertegenwoordigd door Lawrence Fouraker, professor emeritus, Harvard Business School, van Amerikaanse nationaliteit,

zijn overeengekomen onder elkaar en met allen die later zullen toetreden, een vereniging zonder winstoogmerk op te richten overeenkomstig de wet van 27 juni 1921 en onder de hierna volgende voorwaarden :

TITEL I. — Naam, zetel, doel, duur

Artikel 1. De vereniging draagt als naam « D. Collen Research Foundation », v.z.w.

Art. 2. De vereniging is gevestigd : Onderwijs en Navorsing, Campus Gasthuisberg K.U.-Leuven, Herestraat 49, te 3000 Leuven.

Art. 3. § 1. De vereniging heeft tot doel, met uitsluiting van enig winstoogmerk, het uitvoeren, bevorderen en ondersteunen van wetenschappelijk onderzoek in het algemeen en biomedisch en biotechnologisch onderzoek in het bijzonder, onder andere door het toekennen van onderzoekstoelagen, onderzoeksmandaten, reisbeurzen, het organiseren van wetenschappelijke congressen en symposia, financiële steun bij publicaties en alle andere aanverwante activiteiten die de bevordering van de wetenschap ondersteunen of doen uitstralen. In die zin mag zij ook op bijkomstige wijze alle andere economische activiteiten uitoefenen, inclusief het verwerven van roerende en onroerende goederen, op voorwaarde dat de opbrengst daarvan uitsluitend besteed wordt aan het hoofdoel.

§ 2. De vereniging kan één of meer afdelingen of vestigingen hebben waar de in de vorige paragraaf bedoelde activiteiten uitgeoefend worden, zulks ook buiten het rechterlijk arrondissement Leuven, waar de hoofdzetel gevestigd is.

Art. 4. De vereniging is opgericht voor onbepaalde duur. Zij kan te allen tijde ontbonden worden.

12. SakSTAR

Coronary Thrombolysis With Recombinant Staphylokinase in Patients With Evolving Myocardial Infarction

Désiré Collen, MD, PhD, and Frans Van de Werf, MD

Background. Staphylokinase (STA), a protein with known profibrinolytic properties, is produced by transduced *Staphylococcus aureus* strains. In experimental animal models, recombinant staphylokinase (STAR) is less immunogenic and more active toward platelet-rich arterial blood clots than streptokinase.

Methods and Results. In the present study, 10 mg STAR given intravenously over 30 minutes was found to induce angiographically documented coronary artery recanalization within 40 minutes in four of five patients with acute myocardial infarction. Plasma fibrinogen and α_2 -antiplasmin levels were unaffected, and allergic reactions were not observed. Postinfusion disappearance of STAR antigen followed a biphasic mode with a $t_{1/2\alpha}$ of 6.3 ± 0.6 minutes (mean \pm SD) and a $t_{1/2\beta}$ of 37 ± 15 minutes, corresponding to a plasma clearance of 270 ± 100 mL/min. Neutralizing antibodies against STAR could not be demonstrated at baseline and up to 6 days after infusion, but STAR neutralizing activity, which did not cross-react with streptokinase, was consistently demonstrable in plasma at 14–35 days.

Conclusions. STAR can induce clot-selective coronary thrombolysis in patients with evolving myocardial infarction without concomitant induction of a systemic lytic state. STAR, a small protein that can be easily produced by recombinant DNA technology, may therefore offer promise for thrombolytic therapy in patients with thromboembolic disease. (*Circulation* 1993;87:1850–1853)

KEY WORDS • thrombolytic therapy • acute myocardial infarction • staphylokinase • fibrin specificity • immunogenicity • pharmacokinetics

Thrombolytic therapy in patients with acute myocardial infarction has been shown to recanalize occluded coronary arteries, preserve left ventricular function, and reduce mortality. At present, coronary thrombolysis is primarily performed with streptokinase or with alteplase, a preparation of recombinant tissue-type plasminogen activator (rt-PA).¹ The main advantages of streptokinase are its low cost and relative safety, whereas the main shortcomings are its limited efficacy for coronary recanalization and its immunogenicity, which predisposes to allergic reactions and to resistance to repeated administration. The main advantages of alteplase are its higher efficacy for coronary recanalization and its lack of immunogenicity, whereas its main disadvantage is its high cost. Thus, thrombolytic agents with higher thrombolytic potency, reduced side effects, and/or lower cost would be desirable.

Staphylokinase (STA), a protein of 136 amino acids that does not contain disulfide bridges, is produced by transduced *Staphylococcus aureus* strains and has been known for more than 40 years to have profibrinolytic properties. Its mechanism of action, its *in vitro* fibrinolytic properties, and its *in vivo* thrombolytic properties

in experimental animal models have been evaluated to some extent.² Like streptokinase, staphylokinase is not an enzyme, but it forms a 1:1 stoichiometric complex with plasminogen that then activates other plasminogen molecules.^{3,4} However, whereas the streptokinase–plasminogen complex undergoes an intramolecular transition without peptide bond cleavage, which results in exposure of a titrable active site in the plasminogen molecule,⁵ activation of the staphylokinase–plasminogen complex requires its conversion to plasmin.⁶ Furthermore, the staphylokinase–plasmin complex is very rapidly inhibited by α_2 -antiplasmin, whereas the streptokinase–plasmin complex is not.^{7,8}

The gene coding for staphylokinase has been cloned and expressed in *Escherichia coli* and in *Bacillus subtilis*, and the biochemical properties of recombinant staphylokinase (STAR) have been studied recently in some detail.^{9,10} Although the initial *in vivo* experiments with staphylokinase in dogs have yielded discouraging results,^{11,12} we have recently obtained evidence that STAR is fibrin specific, relatively more potent than streptokinase toward platelet-rich clots, and less immunogenic.^{13,14} Our studies^{6,8,15} suggested that several mechanisms may contribute to the fibrin specificity and the potency of staphylokinase in a plasma milieu. First, the plasmin–staphylokinase complex is rapidly neutralized by α_2 -antiplasmin (apparent second-order rate constant 2×10^6 M⁻¹sec⁻¹) but this reaction is 130 times slower when the lysine binding sites of plasmin in the complex are either removed or saturated by binding to 6-amino-

From the Center for Thrombosis and Vascular Research and the Division of Cardiology of the University Hospitals, University of Leuven, Leuven, Belgium.

Address for correspondence: D. Collen, Center for Thrombosis and Vascular Research, K.U. Leuven, Campus Gasthuisberg, O & N, Herestraat 49, B-3000 Leuven, Belgium.

Received November 6, 1992; revision accepted January 28, 1993.

13. Publicatie van Peter Carmeliet in *Nature*

Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele

Peter Carmeliet*, Valérie Ferreira*, Georg Breier†, Saskia Pollefeyt*, Lena Kieckens*, Marina Gertsenstein‡, Michaela Fahrig†, Ann Vandenhoeck*, Kendraprasad Harpal‡, Carmen Eberhardt†, Cathérine Declercq*, Judy Pawling§, Lieve Moons*, Désiré Collen*, Werner Risau† & Andras Nagy‡§

* Center for Transgene Technology and Gene Therapy, Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology, KU Leuven, B-3000 Leuven, Belgium

† Max-Planck-Institute für physiologische und Klinische Forschung, W. G. Kerckhoff-Institut, Abteilung Molekulare Zellbiologie, Bad Nauheim, Germany

‡ Samuel Lunenfeld Research Institute, Mount Sinai Hospital, Toronto, Ontario, Canada

§ Department of Medical Genetics, University of Toronto, Ontario, Canada

The endothelial cell-specific vascular endothelial growth factor (VEGF)¹⁻⁵ and its cellular receptors Flt-1 (refs 6,7) and Flk-1 (refs 8,9) have been implicated in the formation of the embryonic vasculature. This is suggested by their colocalized expression during embryogenesis^{10,11} and the impaired vessel formation in Flk-1 (ref. 12) and Flt-1 (ref. 13) deficient embryos. However, because Flt-1 also binds placental growth factor^{14,15}, a VEGF

homologue, the precise role of VEGF was unknown. Here we report that formation of blood vessels was abnormal, but not abolished, in heterozygous VEGF-deficient (*VEGF*^{+/-}) embryos, generated by aggregation of embryonic stem (ES) cells with tetraploid embryos (T-ES)^{16,17}, and even more impaired in homozygous VEGF-deficient (*VEGF*^{-/-}) T-ES embryos, resulting in death at mid-gestation. Similar phenotypes were observed in F₁-*VEGF*^{+/-} embryos, generated by germline transmission. We believe that this heterozygous lethal phenotype, which differs from the homozygous lethality in VEGF-receptor-deficient embryos, is unprecedented for a targeted autosomal gene inactivation, and is indicative of a tight dose-dependent regulation of embryonic vessel development by VEGF.

Targeted inactivation of one (*VEGF*^{+/-}) or both (*VEGF*^{-/-}) alleles in ES cells was accomplished by replacement of the third common VEGF exon with the gene encoding neomycin phosphotransferase (*neo*), which caused a frameshift in the VEGF coding sequence¹⁸ (unpublished observations), and deleted six of the eight essential cysteine residues^{19,20} (Fig. 1a, b). Absence of exon 3 was confirmed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) (Fig. 1c). Northern blot (Fig. 1d-g) and RT-PCR analysis (see Supplementary Information) revealed the presence of two aberrant VEGF transcripts at very low abundance (< 3% of wild type) in *VEGF*^{+/-} embryos and ES cells, differentiated to cystic embryoid bodies (CEBs), which resulted from splicing into (mRNA-1) or around *neo* (mRNA-2) and contained a stop codon after 49 residues in *neo* (mRNA-1) or after 24 out-of-frame residues in *VEGF* exon 4 (mRNA-2) (Fig. 1a and see Supplementary Information). These mutant transcripts were similarly detected in *VEGF*^{+/-} and in *nVEGF*^{+/-} (containing a randomly integrated targeting vector) CEBs and embryos, and resulted from random transcription of the randomly integrated targeting vector. Transient transfection of mRNA-2 (Fig. 1a) in COS cells under the control of the cytomegalovirus promoter did not reveal

detectable expression of a mutant VEGF peptide, nor dominant-negative inhibition by such peptide on the expression level of wild-type VEGF in co-transfection experiments, as evaluated by western blot analysis, metabolic labelling, immunoprecipitation (for data, see Supplementary Information) and by induction of procoagulant activity (not shown), indicating that expression of mRNA-2 does not interfere with wild-type VEGF expression.

To distinguish between tetraploid-derived and targeted ES cell-derived embryonic cells, ROSA-26 embryos²¹, which ubiquitously express *lacZ*, were used as donors for the tetraploid embryos. The marker confirmed that tetraploid cells were confined to the endoderm of the yolk sac and trophoblast cells in all cases studied (see *LacZ*-positive cells in the yolk sac in Fig. 2d, e). *nVEGF*^{+/-}, *VEGF*^{+/-} and *VEGF*^{-/-} T-ES-cell-derived embryos appeared macroscopically normal at 8.5 days post-coitum (d.p.c.), whereas most of the *VEGF*^{+/-} and *VEGF*^{-/-} T-ES-cell-derived embryos were retarded at 9.5 d.p.c. and appeared dead at 10.5 d.p.c. At 8.5

and 9.5 d.p.c., the dorsal aorta was completely normal in the anterior (Fig. 2a) and posterior (not shown) part of *nVEGF*^{+/-} T-ES-cell-derived embryos, but was only poorly developed in the *VEGF*^{+/-} T-ES-cell-derived embryos, where endothelial cells lined a much smaller lumen than normal, especially in the anterior part of the embryo (Fig. 2b, c). At 8.5 d.p.c., the dorsal aorta was missing over its entire length in *VEGF*^{-/-} T-ES-cell-derived embryos (Fig. 2e). At 9.5 d.p.c., abnormally enlarged vascular structures, lined by endothelial cells and filled with nucleated blood cells, were observed throughout the anterior part of the necrotic embryo instead of the normal dorsal aorta and other blood vessels in *VEGF*^{-/-} T-ES-cell-derived embryos (Fig. 2f). In the caudal part of the embryo, the dorsal aorta was significantly smaller (not shown). A higher degree of tissue necrosis was observed in the *VEGF*^{-/-} than in *VEGF*^{+/-} T-ES cell-derived embryos. RT-PCR analysis for the endothelial cell-specific markers Flt-1, Flk-1 and Tie-2 (also known as Tek) (see

Supplementary Information), and *in situ* hybridization for Flt-1 and Flk-1, and immunostaining for Flk-1 and PECAM/CD31 (not shown) at 8.5 and 9.5 d.p.c. revealed fewer and frequently isolated, disorganized and scattered Flk-1- and Flt-1-expressing cells throughout the *VEGF*^{-/-} embryo at 8.5 d.p.c., and relatively low amounts of Flt-1 and Tie-2 message (which appear later during development) in *VEGF*^{-/-} embryos at 9.5 d.p.c., suggesting delayed but not aborted endothelial cell development. Thus, at both 8.5 and 9.5 d.p.c., the *VEGF*^{-/-} genotype resulted in a more severe phenotype than did the *VEGF*^{+/-} genotype.

14. Curriculum Vitae Désiré Collen

Opleiding

- 1968: Dokter in de geneeskunde (MD), K.U.Leuven, België
- 1969: Licentiaat (MSc) in Medische Wetenschappen, K.U.Leuven, België
- 1974: Doctor in Wetenschappen (Scheikunde), K.U.Leuven, België
- 1974: Geaggregeerde "Hoger Onderwijs in de Geneeskunde", K.U.Leuven, België

Residenties en onderzoeksbeurzen

- 1968-1971: Assistent Inwendige geneeskunde, Universitaire Ziekenhuizen K.U.Leuven, België
- 1971-1972: Associate Research Scientist, New York University Medical Center, New York, N.Y.
- 1972-1973: NATO Onderzoeksbursaal, Karolinska Institutet, Stockholm, Zweden

Academische Aanstellingen binnen K.U.Leuven

- 1973-1976: Aangesteld Navorsers NFWO
- 1975-1976: Buitengewoon Docent, Faculteit Geneeskunde, K.U.Leuven, België
- 1976-1981: Docent, Faculteit Geneeskunde, K.U.Leuven, België
- 1981-1998: Gewoon hoogleraar, Faculteit Geneeskunde, K.U.Leuven, België
- 1990-2007: Directeur van het Centrum voor Moleculaire en Vasculaire Biologie (voorheen Centrum voor Trombose en Vasculair Onderzoek) Faculteit Geneeskunde, K.U.Leuven, België
- 1998-2002: Buitengewoon hoogleraar, Faculteit Geneeskunde, K.U.Leuven, België
- 2002-2008: Gewoon hoogleraar, Faculteit Geneeskunde, K.U.Leuven, België

Academische Aanstellingen buiten K.U.Leuven

- 1984-2005: Professor in Biochemistry and Medicine, University of Vermont College of Medicine, Burlington, VT, USA
- 1986-1989: Gastdocent, Faculteit Geneeskunde en Farmacie, Vrije Universiteit Brussel, België
- 1987-1994: Visiting Professor, Harvard Medical School, Boston, MA, USA
- 1994-2008: Wetenschappelijk Directeur, Centrum voor Transgene Technologie en Gentherapie (huidig Vesalius Research Center), Vlaams Instituut voor Biotechnologie, Leuven, België

Aanstellingen in Universitaire Ziekenhuizen

- 1975-1976: Consulent, Universitaire Ziekenhuizen, K.U.Leuven, België
1976-2000: Adjunct Kliniekhoofd Universitaire Ziekenhuizen, K.U.Leuven, België
1987-2005: Consultant in Medicine, Massachusetts General Hospital, Boston, MA, USA
1999-2002: Visiting Professor, Afdeling Heelkunde en Anesthesie, Guy's King's en St. Thomas' School of Medicine, Londen, Verenigd Koninkrijk
1998-2008: Consulent, Universitaire Ziekenhuizen, K.U.Leuven, België

Andere Aanstellingen

- 1976-2001: Afdelingshoofd, Protein Research Division, Leuven Research en Development VZW, K.U.Leuven, België
1988-2007: Voorzitter van de Raad van Bestuur van de D. Collen Research Foundation V.Z.W.
1991-2007: Voorzitter van de Raad van Bestuur van Thromb-X NV (Spin-off van Leuven Research en Development, K.U.Leuven, België)
1998-2006: Chief Executive Officer en Chairman, ThromboGenics, Ltd., Ierland
2006-2009: Chief Executive Officer, ThromboGenics, Ltd., Ierland
2006-2008: Chief Executive Officer en Voorzitter, ThromboGenics, NV, België
2007- : Voorzitter van de Raad van Bestuur van Life Sciences Research Partners, VZW (voorheen D. Collen Research Foundation, VZW)
2008- : Voorzitter van de Raad van Bestuur van ThromboGenics NV

Prijzen en onderscheidingen

- 1984: Francqui Prijs (Universitaire Stichting), België
1985: Lid van de Koninklijke Academie voor Geneeskunde, België
1986: Prix Louis Jeantet de Médecine (Fondation L. Jeantet), Genève, Zwitserland
1988: Doctor honoris causa, Erasmus Universiteit, Rotterdam, Nederland
1990: Vijfjaarlijkse Prijs der Geneeskundige Wetenschappen (Koninklijke Academie voor Geneeskunde, België)
1994: Bristol-Myers-Squibb Prijs voor Cardiovasculair Onderzoek, New York, N.Y. (samen met M. Verstraete)
1994: Doctor honoris causa, Vrije Universiteit Brussel (VUB), Brussel, België

- 1995: Doctor honoris causa, Universiteit van Notre Dame, Notre Dame, IN
- 1999: Doctor honoris causa, Université de la Méditerranée, Marseille, Frankrijk
- 2005: De Interbrew-Baillet Latour Gezondheidsprijs, België (samen met P. Carmeliet)
- 2006: Lid van EMBO (European Molecular Biology Organization)
- 2007: 2007 “Harvard Leadership Prize”, the Harvard Club of Belgium

Onderzoeksdomeinen

Moleculaire biologie en de pathofysiologie van hemostase en trombose

Ontwikkeling van nieuwe trombolytische en antitrombotische geneesmiddelen

Genetische manipulatie van het cardiovasculair systeem

Translationeel onderzoek op gebied van cardiovasculaire geneesmiddelenontwikkeling

Output

De wetenschappelijke output van D. Collen tussen 1968 en 2008 omvat ongeveer 650 publicaties (in peer-reviewed internationale tijdschriften), 170 overzichtsartikelen en 28 toegekende US patenten. Hij behoort tot de 100 meest geciteerde wetenschappelijke auteurs van de jaren 1980 (Current Contents August 31, 1992, p3) en is opgenomen in de lijst van meest geciteerde auteurs van de jaren 1980 en 1990 (<http://www.highlycited.com>). Tot juni 2009 werd wetenschappelijk werk waarvan hij (co)auteur was, meer dan 57 000 keer geciteerd.

Verklarende woordenlijst

- α_1 -Antitrypsine – eiwit dat de werking van trypsine en andere proteïnases afremt. Behoort tot de ‘serpine’-familie van eiwitten.
- α_2 -Antiplasmine – belangrijkste inhibitor van plasmine en daardoor belangrijk in de regulatie van de fibrinolyse.
- α_2 -Macroglobuline – belangrijke afremmer van plasmaproteïnases met een brede specificiteit.
- Acuut myocardinfarct – plots optredende hartaanval.
- Amyotrofe laterale sclerose – aandoening gekenmerkt door spierzwakte en atrofie als gevolg van de degeneratie van voorhoorncellen in het ruggenmerg.
- Angiogenese – het proces waarbij nieuwe bloedvaten gevormd worden. Tumorangiogenese is de vorming van nieuwe bloedvaten vanuit de omliggende weefsels naar een vaste tumor, een mechanisme dat veroorzaakt wordt door chemische stoffen die vrijgezet worden door de tumor en die de bloedvatvorming stimuleert met als doel de tumor te voeden en zo verder te laten uitgroeien en uitzaaien.
- Angiografie – maken van röntgenfoto’s van bloedvaten en hartkamers met behulp van contrastvloeistof.
- Angioplastie – Een heelkundige techniek waarbij vernauwde bloedvaten verwijderd worden met behulp van een ballonnetje. Eventueel wordt in het vernauwde deel een stent geplaatst om het bloedvat open te houden. De volledige naam voor deze ingreep is percutane coronaire interventie (PCI), of percutane transluminale coronaire angioplastie (PTCA). Soms wordt ook gesproken over ‘dotteren’.
- Anti-FVIII – antilichaam gericht tegen Factor VIII, een van de eiwitten uit de bloedstollingcascade.
- Antilichamen of antistoffen – in het bloedserum aanwezige beschermingsstoffen die worden gevormd als specifieke reactie op vreemde stoffen die het lichaam zijn binnengedrongen, hetzij door infectie, of door inenting.
- APSAC of ‘anisoylated plasminogen streptokinase activator complex’ - is een trombolytisch geneesmiddel bestaande uit een complex van streptokinase en plasminogeen.
- Atherosclerose – progressieve vernauwing van de slagaders door weefselverharding en vorming van atheromen.

Verklarende woordenlijst

β -Interferon – signaaleiwit geproduceerd door diverse types cellen tijdens een virale infectie. Heeft ook een tumoronderdrukkende werking.

Belgian American Educational Foundation (BAEF) – onafhankelijke filantropische organisatie die de uitwisseling van studenten en wetenschappers tussen België en de VS ondersteunt.

Beroerte of cerebrovasculair accident (CVA) – kan bestaan uit een hersentrombose, ook wel ischemische beroerte genoemd, of een hersenbloeding. Een ischemische beroerte wordt veroorzaakt door het blokkeren van een hersenbloedvat door een bloedstolsel, een hersenbloeding ontstaat door het openbarsten van een bloedvat in de hersenen.

Blockbuster - Een geneesmiddel wordt blockbuster genoemd wanneer er elk jaar voor meer dan 1 miljard dollar van verkocht wordt. Meer dan 100 geneesmiddelen hebben inmiddels de status van blockbuster bereikt.

Bloedplaatjes of trombocyten – kleine, kleurloze, ovale bloedcelpartikels zonder kern. Door samenklontering van de bloedplaatjes vormt zich bij een verwonding een plug als eerste fase in de bloedstolling.

Cathlab - een onderzoeks- en behandelingskamer voor hartpatiënten. Er worden intracardiale films gemaakt en eventuele vernauwingen van de kroonslagaders behandeld.

Cerebrovasculair accident (CVA) – zie beroerte.

CHO-Cellijn – cellijn ontwikkeld uit ovariumcellen van de Chinese hamster.

Cholesterol – vetachtige, niet in water oplosbare stof die behoort tot de chemische groep van de sterolen. Het is een belangrijke bouwstof van de cellulaire membranen.

Coronaire bloedvaten of kransslagaders - twee uit de aorta ontspringende slagaders die de hartspier van bloed voorzien. Een kransslagader kan door atherosclerose vernauwd of verstopt raken, waardoor pijn op de borst optreedt (angina pectoris) bij een vernauwing of een hartinfarct door verstopping.

Diabetes of suikerziekte – stofwisselingsziekte waarbij de cellen onvoldoende suiker kunnen opnemen. De ziekte wordt veroorzaakt door onvoldoende of geen productie van insuline (diabetes type 1) of door een probleem met de insulinerceptoren (diabetes type 2).

DNA of Desoxyribonucleïnezuur - is de belangrijkste drager van erfelijke informatie in alle bekende levende wezens. Een DNA-molecule bestaat uit twee lange strengen die zich draaien tot een dubbele helix. De twee strengen

zijn aan elkaar verbonden door zogenaamde basenparen. Het DNA bevindt zich in de kern van de cel en wordt door middel van replicatie verdubbeld en doorgegeven aan beide dochtercellen.

Eiwit of proteïne – klasse van biomoleculen opgebouwd uit ketens van aminozuren. Eiwitten hebben belangrijke functies. Ze zorgen voor structuur, katalyseren chemische omzettingen (enzymen) en zijn betrokken bij transport, communicatie en regulatie.

Electrocardiografie – onderzoek om de elektrische activiteit van de hartspier te onderzoeken.

Endotheelcellen – cellen die het inwendig bekleedsel vormen van de bloedvaten.

Fibrinogeen – is een eiwit dat een belangrijke rol speelt bij de bloedstolling. Als er een bloeding is, wordt fibrinogeen omgezet door trombine tot fibrine. Dit fibrine klit samen tot lange draden op de plaats van de beschadiging.

Food and Drug Administration (FDA) – Amerikaans agentschap dat de kwaliteit van voedsel en geneesmiddelen bewaakt.

Gen – DNA-sequentie die codeert voor een eiwit.

Groeihormoon of somatotropine – is een hormoon gemaakt door de hypofyse die de groei van het lichaam stimuleert.

Hartaanval, hartinfarct of myocardinfarct – afsterven van een deel van de hartspier als gevolg van het onderbreken van de bloedtoevoer.

Hemofilie – erfelijke stoornis van de bloedstolling vanwege het ontbreken van een bepaalde stollingsfactor. Bij hemofilie A heeft de patiënt onvoldoende factor VIII, bij hemofilie B gaat het om factor IX.

Insuline – hormoon afgescheiden door de eilandjes van Langerhans dat de stofwisseling van vet en suiker regelt. Een tekort aan insuline of een gebrek aan de werkzaamheid van insuline leidt tot diabetes of suikerziekte.

Kloneren – op kunstmatige wijze overbrengen en vermeerderen van een gen uit één organisme naar en in een ander organisme.

Knock-out – is een genetisch gemanipuleerd organisme (muis, zebrafis, ...) waarin één of meer genen kunstmatig werden uitgeschakeld. Knock-outs zijn als modelorganismen van onschatbare waarde voor het biomedisch onderzoek.

Kransslagader – zie coronaire bloedvaten

Verklarende woordenlijst

Longembolie - is een afsluiting van een longslagader waardoor het stroomafgelegen longweefsel niet of slechts gedeeltelijk van bloed wordt voorzien. Een longembolie wordt meestal veroorzaakt doordat in grote aders in het been of in het bekken een bloedstolsel ontstaat dat losschiet en via het hart de longen bereikt.

Lymfocyten of witte bloedcellen – cellen in het bloed die de grondslag vormen van het immunologische afweerapparaat.

Melanoom – huidtumor ontstaan uit pigmentcellen in moedervlekken.

Maculaire degeneratie of maculadegeneratie – oogaandoening waarbij de gezichtsterkte afneemt als gevolg van het afsterven van de kegeltjes in het centrale gedeelte (gele vlek) van het netvlies. Het perifere gezichtsveld blijft meestal intact.

Maculair oedeem - zwelling van het centrale deel van de retina (macula) dat instaat voor het centrale zicht. Dit kan ontstaan als gevolg van diabetes of door andere aandoeningen.

Microplasmine – verkorte en stabiele vorm van het eiwit plasmine, het belangrijkste fibrinolyse-eiwit. *ThromboGenics* test microplasmine uit voor de behandeling van ziekten aan de achterzijde van het oog.

Myocardinfarct – zie hartaanval

Octrooi of patent – geeft een uitvinder het exclusieve recht tot het industrieel maken of verkopen van een product of het anderszins exploiteren van een uitvinding gedurende een beperkte tijd (in de meeste landen maximaal twintig jaar, te rekenen van de indieningsdatum van de octrooiaanvraag) en een beperkte geografische regio (meestal een land of een groep van landen).

Percutane Coronaire Interventie (PCI) – zie angioplastie.

Placebo – stof zonder farmacologische werking die uiterlijk niet te onderscheiden is van een bestaand of uit te testen geneesmiddel. Wordt gebruikt in klinisch onderzoek naar de werkzaamheid van een nog te beoordelen geneesmiddel in het kader van een dubbelblind onderzoek.

Placentale groeifactor (PlGF) - een specifiek eiwit dat in het lichaam gevonden wordt en dat een rol speelt bij het stimuleren van de vorming van nieuwe bloedvaten. Ofschoon het een homoloog is van VEGF, bindt PlGF alleen aan de receptor VEGFR-1 (Flt-1) (in tegenstelling met VEGF, dat zich bindt aan VEGFR-1 én VEGFR-2).

- Plasminogeen - een niet-actief eiwit dat circuleert in het bloed en dat eenmaal omgezet tot plasmine het proces van fibrinolyse op gang brengt.
- Plasminogeenactivator – een eiwit dat plasminogeen omzet tot plasmine.
- rt-PA of recombinant tissue-type plasminogen activator – gekloneerde vorm van weefselplasminogeenactivator.
- Site-directed mutagenesis – is een techniek uit de moleculaire biologie waarbij op een vooraf bepaalde plaats in het DNA een mutatie wordt aangebracht.
- Stafylokinase – recombinant trombolytisch eiwit uit de bacterie *Staphylococcus aureus*.
- Streptokinase – bacterieel trombolytisch eiwit uit hemolytische streptokokken.
- t-PA of weefselplasminogeenactivator (Tissue-type plasminogen activator) – eiwit dat plasminogeen omzet tot plasmine en daarmee een belangrijke regulator is van het proces van fibrinolyse. De recombinante vorm van t-PA is een belangrijk trombolytisch geneesmiddel.
- Translationeel onderzoek – tracht veelbelovende bevindingen in het laboratorium ‘te vertalen’ naar toepassingen in de gezondheidszorg. Wordt soms ook met de Engelse term ‘from bench to bedside’ (van ‘labtafel tot ziekenbed’) omschreven.
- Trombine – eiwit uit de bloedstollingsketen dat fibrinogeen omzet tot fibrine. Trombine ontstaat uit zijn niet actieve voorloper protrombine.
- Trombocytopenie – tekort aan bloedplaatjes in het bloed.
- Trombofilie - verzamelnaam voor verscheidene veranderingen in de bloedsamenstelling die de bloedstolling bevorderen en daardoor de kans op diep-veneuze trombose of longembolie verhogen.
- Trombolyse – geneeskundige behandeling waarbij een stolsel in een bloedvat (trombose of embolie) wordt opgelost met enzymen als rt-PA, streptokinase of stafylokinase.
- Trombose – aandoening waarbij in een bloedvat een bloedstolsel (trombus) wordt gevormd die het bloedvat geheel of gedeeltelijk afsluit. Gevolgen van trombusvorming in slagaders kunnen een hartinfarct of een beroerte (in de hersenen) zijn. Bloedstolsels in aders komen voor bij diepe-veneuze trombose.
- Urokinase – trombolytisch eiwit dat in lage concentraties voorkomt in urine.

Verklarende woordenlijst

VEGF of vasculaire endotheliale groeifactor - is de belangrijkste groeifactor die de aanleg van nieuwe bloedvaten in het embryo reguleert. Tumoren produceren ook VEGF om de vorming van nieuwe bloedvaten te stimuleren.

Veneuze trombose – aandoening waarbij bloedklonters gevormd worden in de grotere lichaamsaders, meestal in het been of in het bekken. Als een stuk van de klonters afbreekt kan diepe veneuze trombose aanleiding geven tot longembolie.

Voorkamerfibrillatie - is een hartritmestoornis die leidt tot een niet-optimale vulling van de kamers van het hart. Het gevaar van de voorkamerfibrillatie bestaat vooral in het ontstaan van kleine bloedklonters die vervolgens in de hersenen, longen of elders in het lichaam terechtkomen.

Register

| | |
|---|--|
| 4C | 121, 122, 123 |
| Abbott Laboratories | 47 |
| Ablynx | 158 |
| Academische Ziekenhuizen | 26 |
| Activase | 89, 107 |
| Actogenix | 158 |
| Agfa Gevaert | 119 |
| Alkjaersig:Norma | 12 |
| Alteplase | 77, 78, 98, 99, 107, 108, 149, 171 |
| Amery:A. | 7, 23 |
| ASSET | 83, 87 |
| Astrup:Tage | 33, 45 |
| Aveve | 119 |
| AZ Imelda (Bonheiden) | 149 |
| AZ Middelheim (Antwerpen) | 149 |
| AZ Virga Jesse (Hasselt) | 149 |
| Barlow:Grant | 47 |
| Barradell:L.B. | 104 |
| BASF | 158 |
| Bayer | 55, 102 |
| Behnke:D. | 141, 142, 147 |
| Bekaert | 119 |
| Belgian American Educational Foundation | 2, 127 |
| Bell | 119 |
| Bergmann:Steven | 69, 70 |
| Bharat Biotech International Ltd. | 171 |
| Biggar Ltd | 124, 179 |
| Billiau:Alfons | 41, 42, 47, 48, 50, 62, 65, 66, 127 |
| BioInvent | 172, 173, 174 |
| Blomback:Birger | 25 |
| Boehringer Ingelheim | 97 |
| Boeynaems:Jean | 134 |
| Bouckaert:Jos | 40, 58, 61, 63, 116, 117, 118, 119 |
| Bouckaert:J.P. | 17 |
| Bouillon:Roger | 139 |
| Bowes | 7, 8, 14, 47, 48, 49, 50, 58, 69, 70, 73, 74, 96 |
| Boyer:Herbert | 57 |
| Brakman:Pieter | 49 |
| Braunwald:Eugene | 78, 86, 88 |

Register

| | |
|--|---|
| Brody:Baruch | 78, 81, 85, 86, 88, 91, 92 |
| Brutsaert:Dirk | 134 |
| Burroughs | 95, 96, 197 |
| Bury:Jo | 155, 156 |
| Buyse:Chris | 179 |
| Califf:Robert | 101 |
| Cardiac Pathology Heart Institute | 11 |
| Cardiovasculaire Research Institute | 69 |
| Carmeliet:Peter | 128, 131, 134, 136, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 179, 213 |
| Celltech | 62 |
| Centre national de la recherche scientifique | 2 |
| Centrum voor Moleculaire en Vasculaire Biologie | 1, 127, 128, 138, 140, 168, 179, 212 |
| Centrum voor Transgene Technologie en Getherapie | 1, 128, 140, 161, 166, 212 |
| Centrum voor Trombose en Vasculair Onderzoek | 5, 120, 126, 128 |
| Ceysens:Patricia | 158 |
| Chazov:E.I. | 13 |
| CHO | 73 |
| CIBA | 102 |
| CIL | 122, 123 |
| City of Hope | 57 |
| Claes:Hans | 120, 121 |
| Clay:Landon | 124, 179 |
| Cleveland Clinic Center | 101 |
| Crick:Francis | 57 |
| CropDesign | 158 |
| D. Collen Research Foundation | 125, 127, 128, 139, 159, 179 |
| Data and Safety Monitoring Board | 102 |
| DCRF | 125, 126, 127, 128 |
| De Backere:Koen | 139 |
| De Bondt:Raymond | 139, 179 |
| De Geest:Bart | 127 |
| De Groote:J. | 23 |
| De Haes:Patrik | 167 |
| De Maeyer:Leo | 21 |
| De Moor:P. | 23 |
| De Smyter:Jan | 155 |
| De Somer:Pieter | 55, 61, 62, 63, 65 |
| De Standaard | 174 |
| De Tijd | 174 |

| | |
|---|--|
| De Vreker:Rene | 18 |
| De Wyngaert:Diane | 179 |
| Declercq:Guido | 40, 139 |
| DeCock:Frans | 52 |
| Degens:Albert | 130 |
| Dehaene:Jean-Luc | 179 |
| Dekeyser:Rudy | 155, 156 |
| Departement Biochemie | 62 |
| Departement Chemie | 19 |
| Devgen | 158 |
| DeWood:Marcus | 13 |
| Dexia | 122 |
| Dienst voor Interne Geneeskunde | 27 |
| Dijkzigt Ziekenhuis | 65 |
| Dillemans:Roger | 125, 132, 136, 154, 155 |
| DIRV | 116, 153 |
| Dowdle:Eugene | 48 |
| Duke University Medical Center | 101 |
| East Hill University Spinouts Fund | 123, 124 |
| ECSG | 77, 78, 80, 82, 83 |
| Eigen:Manfred | 21 |
| EMBL | 158 |
| EMEA | 85 |
| Euronext Brussels | 167 |
| European Working Party on Streptokinase | 8, 12, 77 |
| Eyckmans:L. | 23 |
| Faculteit Geneeskunde | 17, 19, 27, 128, 136 |
| Faculteit Wetenschappen | 19, 136 |
| Farnan:Joseph J. | 96 |
| FDA | 1, 74, 77, 78, 84, 85, 86, 88, 89, 91, 110, 118, 169 |
| Federal Institute of Technology | 2 |
| Ferrara:N. | 161 |
| Fiers:Walter | 153, 154, 155 |
| FlandersBio | 127 |
| Fletcher:Tony | 12 |
| FNRS | 158 |
| Foidart:Michel | 134, 135 |
| Fouraker:Lawrence | 125, 128 |
| Friedberg:C.K. | 11 |
| FWO | 21 |
| Gasthuisberg | 8, 45, 50, 69, 82, 127, 129, 138, 149, 179 |

Register

| | |
|--|--|
| Gaubius Instituut | 49 |
| Geens:Gaston | 116, 153, 158 |
| Genentech 1, 2, 8, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 69, 70, 71, 73, 75, 84, 86, 87, 88, 89, 91, 92, 93, 95, 96, 97, 98, 99, 102, 104, 107, 108, 112, 115, 116, 117, 118, 121, 161, 165, 174 | |
| Generale Maatschappij | 119 |
| Genetics Institute | 95, 96 |
| GIMV | 116, 119 |
| GISSI | 82, 82, 83, 87, 88, 97, 98, 99, 171 |
| Glansdorff:Nicolas | 155 |
| Goa:K.L. | 104 |
| Goedseels:V. | 139 |
| Gold:Herman (Chip) | 70, 71, 72, 74, 79, 125, 128, 132 |
| Gower:Jim | 118 |
| Grossbard:Elliott | 75, 88 |
| GSK | 122, 123 |
| Guerci:Alan | 83, 88 |
| GUSTO | 99, 101, 102, 103, 104, 107, 108, 118, 171 |
| GUSTO Angiographic Study | 102, 103 |
| Hamers:Rene | 155 |
| Harvard University | 70, 78, 125, 126, 128, 132, 136, 137, 138, 159 |
| Hektoen:Ludwig | 10 |
| Henogen | 122 |
| Herrick:James | 10 |
| Heyneker:Herbert | 58, 61 |
| Holmes:William | 36 |
| Holt:Bob | 71 |
| Holvoet:Paul | 133, 134, 135, 143 |
| Hood:William | 79 |
| Horn:H. | 11 |
| Hoylaerts:Marc | 50, 51, 175 |
| Huylebroeck:Danny | 155 |
| Ibel | 119 |
| ICI Pharmaceuticals | 102 |
| IMEC | 153, 154 |
| Innogenetics | 117 |
| Innovi | 115, 116, 117, 118, 119, 125, 158 |
| Institute for Molecular Biology | 147 |
| International Society for Fibrinolysis and Proteolysis | 127 |
| International Society on Thrombosis and Haemostasis | 50, 127, 141 |
| Investco | 119 |
| ISIS | 82, 99, 171 |

| | |
|--|---|
| IUAP | 132, 133, 134, 135 |
| IWT | 153 |
| Janssen Pharmaceutica | 119 |
| Janssens:Stefan | 136 |
| Johns Hopkins University | 74, 75, 83, 88, 101 |
| Johnson:Alan | 24, 35 |
| Joossens:J.W. | 23 |
| Juhan-Vague:Irène | 50 |
| Karolinska Institutet | 25, 45 |
| KBC | 179 |
| Kiley:Thomas | 63 |
| Knowledge for Growth | 127 |
| Korninger:Christian | 50 |
| Koshland:Daniel E. | 86 |
| K.U.Leuven .. 1, 2, 5, 8, 20, 21, 27, 36, 39, 40, 41, 42, 55, 58, 63, 101, 115, 116, 117, 118, 120, 125, 126, 127, 128, 129, 131, 132, 133, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 153, 154, 155, 157, 159, 164, 175, 179, 211, 212 | |
| KULRD | 139 |
| KVCV | 127 |
| Laboratorium voor Bloedings en Vaatziekten | 26 |
| Laboratorium voor Bloedstolling | 5, 17, 27 |
| Laboratorium voor Fysische Chemie | 21 |
| Langouche:G. | 139 |
| Lederle Laboratories | 12 |
| Lewis:Jessica | 141, 142, 145 |
| Life, a Nobel Story | 127 |
| Life Sciences Research Partners | 128, 179 |
| Lijnen:Roger | 36, 50, 51, 62, 70, 142, 143, 144, 145, 147, 150, 179 |
| LR&D 1, 2, 39, 40, 41, 55, 58, 61, 63, 95, 96, 107, 112, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 125, 126, 128, 134, 138, 139 | |
| Lunenfeld Institute | 160 |
| Mannaerts:Guy | 139, 179 |
| Mareel:Marc | 134 |
| Massachusetts General Hospital | 70, 74, 79, 132 |
| Massachusetts Institute of Technology | 57, 158, 159 |
| Matsuo:Osamu | 50, 51, 55, 95, 116, 127, 141, 142, 144, 145 |
| Max Planck Instituten | 2, 158 |
| medac GmbH | 147 |
| MHO | 119 |
| Miller:Alain | 122, 123 |
| Miller:Axel | 122 |
| MIT | 158 |

Register

| | |
|---|--|
| MITI | 97, 170 |
| Moerman:Fientje | 158 |
| Moreadith:Randall | 121 |
| Movetis | 179 |
| Mulligan:Richard | 159, 160 |
| Nagai:Nobuo | 111, 127, 168 |
| Nagy:Andras | 160 |
| Nath:Barbara | 71 |
| National Heart Foundation of Australia | 83 |
| NeuroNova | 164 |
| New York University Medical Center | 47 |
| NFWO | 21, 22, 24, 25 |
| NHLBI | 78, 79, 86, 88 |
| NIH | 11, 24, 78, 79, 81, 86, 88, 110 |
| Noel:Agnes | 134 |
| NuVue | 168 |
| nv t-PA | 119, 120, 121, 126 |
| Obraztsov | 10 |
| Oosterlinck:André | 135, 137, 138, 139 |
| Opdenakker:Ghislain | 61, 62, 96 |
| Organon | 39 |
| Osler:Sir William | 10 |
| Oxford Medica | 164 |
| Pasteur Instituut | 42 |
| Pennica:Diane | 56, 57, 58, 59, 62, 70 |
| Permin:Per | 33 |
| Philips:Luc | 179 |
| Plant Genetic Systems | 117 |
| Plow:Ed | 39 |
| Policy Advisory and Data Monitoring Board | 79 |
| Poskin | 122 |
| Preclinical Research Board | 179 |
| Prominvest | 119 |
| Pronota | 158 |
| Protein Research Division | 119, 120, 121, 128, 139 |
| Protein Research Division van Leuven Research & Development | 146 |
| Putzeys | 21 |
| Raeymaekers:Peter | 4 |
| Rega Instituut | 23, 41, 42, 46, 47, 55, 61, 62, 65, 96, 154, 155 |
| Reich:Ed | 46, 47 |
| Remacle:Claude | 133 |

| | |
|--|---|
| Remacle:José | 133 |
| Rentrop:K.Peter | 13 |
| Retepase | 107 |
| Rifkin:Dan | 47 |
| Rijken:Dingeman (Dick) | 49, 50, 51, 55, 67, 95, 96, 116, 126 |
| Risau:Werner | 161 |
| Robberecht:Wim | 136, 164 |
| Roberts:William C. | 11, 98 |
| Roche | 165, 167, 173, 174, 175 |
| Rockefeller University | 46 |
| Rombauts:Wilfried | 62, 63 |
| Saint-Remy:Jean-Marie | 127 |
| Sanofi Pharmaceuticals | 102 |
| Schneider:Yves | 133 |
| Schoonjans:Luc | 121, 122, 159 |
| Scripps Institute | 39 |
| Sherry:Sol | 11, 12 |
| Sobel:Burton | 13, 69, 70, 73, 74, 99, 102, 109 |
| Stassen:Jean | 144, 145, 146, 150, 159 |
| Stephenne:Jean | 122 |
| Strazhesko | 10 |
| Stroke Review Committee | 102 |
| Stump:David | 101 |
| Swanson:Bob | 57, 89 |
| Tavernier:Karel | 120, 125 |
| tenecteplase | 108 |
| Thromb-X . 2, 115, 120, 121, 122, 123, 124, 126, 135, 138, 146, 147, 148, 151, 168, 212 | |
| ThromboGenics | 2, 115, 123, 124, 130, 135, 138, 146, 151, 165, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 179 |
| TICO | 83 |
| TIMI | 77, 78, 79, 80, 81, 84, 86, 87, 88, 91, 99 |
| Topol:Eric | 10, 74, 75, 101, 109 |
| Tulinski:Al | 132 |
| Tytgat:Guido | 18, 19, 34, 35 |
| UCSF | 57 |
| Universiteit Gent | 42 |
| University of Vermont | 69, 136 |
| UZ St. Rafaël | 22 |
| Van Broeckhoven:Christine | 155 |
| Van Damme:Jo | 42, 50 |
| Van de Werf:Frans | 70, 73, 77, 82, 83, 101, 108, 109, 132, 146, 147, 149 |

Register

| | |
|--|--|
| Van den Brande:Luc | 153, 154, 158 |
| Van Mechelen:Dirk | 158 |
| Van Montagu:Marc | 153, 154, 155 |
| Van Reet:Staf | 179 |
| Vandekerckhove:Joël | 155 |
| Vanden Berghe:Herman | 132, 153, 154, 155 |
| Vander Eecken:Jacques | 119, 120, 125 |
| Vermeylen:Jos | 36, 42, 149, 175 |
| Verstraete:Marc ... | 5, 7, 12, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24, 34, 35, 40, 45, 49, 77, 78, 80, 127, 128, 179 |
| Vesalius Research Center | 128, 140, 161, 164, 166, 179, 212 |
| VIB | 2, 128, 137, 138, 140, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 161, 166, 179 |
| Virchow:Rudolf | 32 |
| VITO | 153, 154 |
| VLAB | 153, 154, 155 |
| Volckaert:Guido | 61, 62, 96 |
| Wallen:Per | 45 |
| Washington University | 69, 73, 74 |
| Washington University School of Medicine | 69, 73 |
| Watson:James | 57, 111 |
| Weimar:Willem | 65, 66, 67 |
| Weisfelt:Myron | 74 |
| Wellcome Foundation | 95 |
| Whitehead Institute | 128, 159 |
| Wilson:John | 141, 145 |
| Wilson:Lynn | 48, 141, 145 |
| Wiman:Bjorn | 34, 36, 38, 45, 46, 48, 49 |
| Yakult Honsha | 121 |
| Yasuda:Tsunehiro | 70, 71 |

