



## Samenvatting proefschrift Ferdie Sombogaard

'Pharmacodynamic monitoring of inosine mono-phosphate dehydrogenase activity: a basis for optimize and individualize mycophenolate mofetil therapy'

**Promotie: 12 maart 2010**  
**Erasmus Universiteit, Rotterdam**

**Promotor:**  
Prof. Dr. A.G. Vulto

**Co-promotores:**  
Dr. T. van Gelder  
Dr. R.A.A. Mathôt

Mycofenolzuur (MPA) – de actieve vorm van het geneesmiddel mycofenolaatmofetil (MMF) – remt het enzym inosine 5'-monofosfaat dehydrogenase (IMPDH). Dit enzym is de snelheidsbeperkende stap in de vorming van nieuwe nucleotiden, welke nodig zijn voor de proliferatie van T- en B-lymfocyten. Daarom wordt MMF al ruim 10 jaar succesvol als immunosuppressief geneesmiddel gebruikt na orgaantransplantaties en ook steeds meer bij stamceltransplantaties en auto-immuun ziekten. De aanbevolen MMF dosering is tweemaal daags 1000 mg, maar steeds meer wordt gedacht dat individualisering van de dosering een betere balans geeft tussen effectiviteit en toxiciteit. Farmacokinetische (PK) studies hebben een grote inter- en intra-patiënt variabiliteit aangetoond, maar drie gerandomiseerde klinische studies die 'fixed dose MMF' vergeleken met 'concentratie gecontroleerd MMF' lieten geen eenduidig beeld zien welke wijze van doseren nu aan te bevelen is voor dosisoptimalisatie (Hoofdstuk 1.1).

Een andere manier om de therapie met MMF te volgen, is het farmacodynamisch (PD) monitoren door het meten van IMPDH activiteit. Studies hebben grote inter-patiënt variabiliteit in IMPDH activiteit aangetoond en één studie heeft een correlatie laten zien tussen IMPDH activiteit en klinische eindpunten (Hoofdstuk 1.1). In Hoofdstuk 1.2 is het hoofddoel van dit proefschrift beschreven: het exploreren van de toepasbaarheid van het monitoren van IMPDH activiteit om de MMF dosering te individualiseren en te optimaliseren.

Een belangrijk instrument in de verrichte studies in dit proefschrift is de gemodificeerde nieuwe IMPDH activiteit assay, beschreven in Hoofdstuk 2.1. In de eerste stap van deze assay worden perifeer bloed mononucleaire cellen (PBMCs) geïsoleerd uit 2,5 ml volbloed met behulp van een Ficoll-Paque gradiënt, waarna de cellen worden gelyseerd, waardoor het IMPDH enzym vrijkomt. In de tweede stap is het lysaat gedurende 2,5 uur bij 37°C geïncubeerd in een reactiemengsel met IMP als substraat. Nadat de reactie gestopt was, zijn de concentraties adenosine monofosfaat (AMP) en het product xanthine monofosfaat (XMP)



gemeten met behulp van een gevalideerde HPLC-analysemethode. De laatste stap is de IMPDH activiteit te berekenen door het gemeten XMP te normaliseren. Andere IMPDH activiteit assays gebruiken hiervoor de totale concentratie proteïnen of het totaal getelde aantal cellen in het monster. Door gebruik te maken van het intracellulair AMP – wat tijdens het lyseren van de cellen naast het IMPDH is vrijgekomen – wordt als ware een biologische interne standaard gebruikt. Wij hebben in diverse experimenten aangetoond dat de berekende IMPDH activiteit met AMP minder gevoelig is voor vervuilingen van het monster met plasma, erythrocyten en extracellulaire proteïnen. De reproduceerbaarheid van de berekende IMPDH activiteit met AMP is beter vergeleken met de andere methoden. De IMPDH activiteit berekend met de gemodificeerde assay is minder variabel en bespaart tevens tijd. De intra- en inter-dag reproduceerbaarheid is minder dan 11% en is daarmee wezenlijk binnen de geaccepteerde grenzen van 15%.

Deze IMPDH activiteit assay is vervolgens gebruikt voor de IMPDH Activity Study, een prospectieve, longitudinale PK-PD studie in 101 nieuwe niertransplantatie (NTx) patiënten die behandeld worden met MMF. Bloedmonsters werden voor pre-transplantatie en op vier momenten na transplantatie afgenomen voor PK en PD monitoren van MPA, het bepalen van IMPDH mRNA concentraties en voor farmacogenetische doeleinden. Klinische uitkomsten, klinische laboratorium gegevens en opgetreden bijwerkingen werden verzameld tijdens alle bezoeken.

Met behulp van het PK/PD computerprogramma NONMEM (nonlinear mixed effects modeling) zijn alle gemeten data in Hoofdstuk 3.1 geanalyseerd. Nadat de PK parameters geschat waren met behulp van Bayesiaanse analyse, zijn de PD parameters geschat met een Emax model. Een grote variabiliteit van 102% werd gevonden voor de IC<sub>50</sub>, de MPA concentratie waar de helft van de maximale inhibitie E<sub>max</sub> van de IMPDH activiteit bereikt wordt. De IC<sub>50</sub> nam af van 0,76 mg/l direct na transplantatie tot 0,17 mg/l op dag 140 post-transplantatie. Een variabiliteit van 41% werd gezien in de basale activiteit E<sub>0</sub> en deze nam toe van 55 μmol/s/mol AMP direct na transplantatie tot 92 μmol/s/mol AMP op 140 dagen post-transplantatie. Patiënten van het negroïde ras hadden een 12% lagere E<sub>0</sub> vergeleken met blanken, Aziatische en Ibero-Amerikaanse patiënten. Patiënten met een homozygoot variant type van IMPDH type II 3757T>C vertoonde een 55% hogere E<sub>0</sub>. De IC<sub>50</sub> was significant lager bij patiënten met lage aantallen leukocyten of een verlaagd albumine. Andere patiëntfactoren of klinisch laboratorium waarden konden de intra- en interpatiënt variabiliteit niet verklaren. Patiënten met een biopsie bewezen acute afstoting (BPAR) hadden significant een 23% hogere E<sub>0</sub> en 75% hogere IC<sub>50</sub> op 6 dagen post-transplantatie. Een lagere IMPDH AUC<sub>0-12</sub> was significant gecorreleerd met leukopenie en/of anemie en verklaart zowel de inter-patiënt als de intra-patiënt variabiliteit. Deze bevinden benadrukken het belang van een adequate inhibitie van IMPDH om BPARs en bijwerkingen te voorkomen. Ondanks dat is het in onze populatie niet mogelijk geweest om grenswaarden vast te stellen voor een optimale inhibitie van IMPDH. Wel hebben we aangetoond dat IMPDH activiteit beter dan MPA concentraties geassocieerd is met BPARs, waardoor we concluderen dat het meten van IMPDH activiteit kan bijdragen aan het optimaliseren van de behandeling met MMF.

Aangenomen wordt dat de ongebonden fractie van een geneesmiddel enkel farmacologisch actief kan zijn. Om de relevantie van totaal tegen ongebonden MPA concentraties te onderzoeken, hebben we in Hoofdstuk 3.2 deze concentraties gecorreleerd aan IMPDH



activiteit met behulp van een Emax model. Significante, maar magere correlaties werden gevonden, daar de PD parameters E0 en IC50 grote betrouwbaarheidsintervallen lieten zien door grote inter-patiënt variabiliteit in IMPDH activiteit. Een significant verschil in IMPDH activiteit werd wel gezien wanneer de patiënten werden onderverdeeld in drie groepen met gebruik van het therapeutisch raam van totaal MPA AUC (30 tot 60 h·mg/l) en ongebonden MPA AUC (2,1 tot 4,2 h·mg/l; grenzen zijn vermenigvuldigd met 7,0% mediane ongebonden fractie). Een hogere ongebonden MPA concentratie gaf een lagere IMPDH activiteit, hetgeen niet werd gevonden voor totaal MPA. IMPDH activiteit was significant lager in patiënten met een laag serum albumine, terwijl er geen verschil in ongebonden MPA gezien werd. Wel hadden patiënten met een laag albumine een significant lagere totale MPA AUC. Hoewel we geen verklaring hebben dat patiënten met een laag albumine wel verlaagde IMPDH activiteit, maar geen verhoogde ongebonden MPA concentratie hadden, concluderen we dat de ongebonden MPA concentratie beter de inhibitie van IMPDH activiteit beschrijft dan totaal MPA.

Het doel van Hoofdstuk 4.1 was om acht verschillende enkelvoudige nucleotide polymorfismes (SNPs) van het IMPDH type II gen te correleren aan IMPDH activiteit om de inter-patiënt variabiliteit te kunnen verklaren. In ons studie cohort kwam alleen de SNP IMPDH type II 3757T>C voor met een allel frequentie van 6,9% en was 2% van de patiënten homozygoot variant voor deze SNP. Pre-transplantatie was er geen significant verschil in IMPDH activiteit tussen wild type of variant dragers, maar op dag 6 post-transplantatie was de IMPDH activiteit AUC significant 49% hoger in variant dragers ten opzichte van wild type dragers. De inter-patiënt variabiliteit in IMPDH activiteit wordt door de IMPDH type II 3757T>C SNP voor 8,0% verklaard.

Omdat IMPDH activiteit assays tijdrovend en arbeidsintensief zijn, is in Hoofdstuk 4.2 gekeken of IMPDH mRNA concentraties een alternatieve methode kunnen zijn voor het monitoren van MMF therapie. De studie was ontworpen om IMPDH mRNA concentraties te correleren aan IMPDH activiteit en klinische uitkomsten bij NTx patiënten. Er werden geen correlaties gevonden tussen IMPDH type I en type II mRNA concentraties en IMPDH activiteit gemeten pre- en post-transplantatie. Het bepalen van IMPDH mRNA concentraties is daarom geen alternatief voor het meten van IMPDH activiteit. Patiënten met een verhoogde IMPDH mRNA concentratie pre-transplantatie, hadden een verhoogd, niet-significant risico op een BPAR. Verlaagde IMPDH type I en type II mRNA concentraties waren op dag 6 post-transplantatie wel significant gecorreleerd aan het optreden van BPARs. De regulatie van de expressie van de twee isovormen verschillen van elkaar, maar ondanks dat lopen de concentraties van zowel IMPDH type I als type II mRNA parallel op aan elkaar in de loop van de tijd na transplantatie.

MMF wordt steeds vaker gebruikt na hematopoëtische stamcel transplantaties (HSCT) om acute graft-versus-host reacties (GvHD) te voorkomen. In Hoofdstuk 5.1 bespreken we de resultaten bij HSCT patiënten van de eerste pilotstudie naar de PD van MMF behandeling door het meten van IMPDH activiteit. De inter-patiënt variabiliteit was evenals in NTx patiënten groot. Hoewel de IMPDH activiteit in beide patiëntgroepen gelijk was, waren de MPA concentraties lager bij HSCT patiënten. We veronderstellen daarom dat het IMPDH enzym in HSCT patiënten gevoeliger is voor de inhibitie van MPA dan in NTx patiënten. Geen significante relaties zijn ontdekt tussen IMPDH activiteit en het optreden van GvHD, maar



IMPDH activiteit was wel significant lager in patiënten die leden aan ernstige neutropenie, trombocytopenie of anemie.

In Hoofdstuk 6 worden de belangrijkste resultaten en conclusies van de gepresenteerde onderzoeken in dit proefschrift bediscussieerd. Suggesties voor vervolgonderzoek naar het IMPDH enzym zijn tevens in dit hoofdstuk weergegeven.

Op basis van onze bevindingen kan het monitoren van IMPDH activiteit nog niet worden aanbevolen om de behandeling van MMF te optimaliseren en te individualiseren. Het IMPDH enzym wordt geremd door veel meer factoren dan wij hebben onderzocht. Toch heeft dit proefschrift een basis gegeven om IMPDH activiteit en de inhibitie van IMPDH door MPA beter te begrijpen in patiënten die worden behandeld met MMF. Onze bevindingen kunnen dienen als uitgangspunt voor toekomstige studies naar de fascinerende PK/PD relatie van het geneesmiddel MMF. ◀