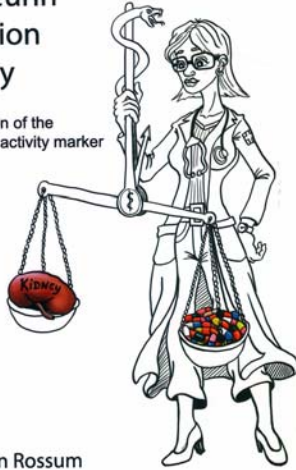




Pharmacodynamic  
monitoring of  
calcineurin  
inhibition  
therapy

Investigation of the  
calcineurin activity marker



Huub van Rossum

## Samenvatting proefschrift Huub van Rossum

“Pharmacodynamic monitoring of calcineurin inhibition therapy: Investigation of the calcineurin activity marker”

**Promotie: 27 April 2010**  
**Universiteit Leiden**

**Promotor:**  
Hans de Fijter

**Co-promotor:**  
Hans van Pelt

Bij orgaan transplantatie patiënten is een goede onderdrukking van de immunologische reactie tegen het ontvangen, lichaamsvreemde orgaan van cruciaal belang. Dit wordt gedaan door het immuunsysteem te onderdrukken door middel van immuunsuppressieve therapie. Er zijn verschillende medicijnen typen die gebruikt worden, maar kort na transplantatie is het gebruikelijk dat een calcineurine (CN) remmer de basis vormt van de immuunsuppressieve therapie. Er zijn 2 calcineurine remmers in gebruik in de transplantatie geneeskunde; tacrolimus (TRL) en ciclosporine (CsA). Deze calcineurine remmers zorgen voor een goede onderdrukking van de afstotingreactie maar zijn geassocieerd met veel bijwerkingen waaronder niertoxiciteit, hoge bloeddruk, hyperglycemie en diabetes mellitus. Daarnaast laten beide middelen een grote inter-individuele variatie in de farmacokinetiek zien. Om het voorkomen van acute afstotingsreacties en medicijn toxiciteit te reduceren wordt TRL en CsA therapie gemonitord door middel van medicijn concentratie bepalingen. Aan de hand van deze metingen of afgeleiden daarvan wordt de geschikte medicijn dosis voor de individuele patiënt bepaald.

Ondanks dat calcineurine remming therapie op deze manier gecontroleerd wordt, komen er nog steeds afstotingsreacties voor en vormt de medicijn toxiciteit naast over-immuunsuppressie een groot klinisch probleem. Verbeterde monitorings methoden zouden voor een verdere verbetering van de calcineurine remmings therapie kunnen zorgen. De therapie kan dan per patiënt verder geïndividualiseerd worden. Dit kan gedaan worden door geavanceerde farmacokinetische strategieën te gebruiken zoals het schatten van de totale medicijn blootstelling op basis van meerde concentratie bepalingen na inname van een calcineurine remmer (AUC waarden), of het implementeren van farmacogenetica. Ook kan er gedacht worden aan monitorings strategieën waarbij men direct het effect van de calcineurine remmers meet, het



zogenaamde farmacodynamisch monitoren. De medicijn concentraties zijn wel gecorreleerd aan het effect wat ze hebben, maar zijn slechts een indirecte maat voor effect. Helaas is het zo dat farmacodynamische monitoringsstrategieën nog in een experimentele fase zitten en dat ze klinisch nog geen bewezen betekenis hebben. Dit heeft ons ertoe bewogen om de toepassing van deze markers voor het monitoren van calcineurine remmings therapie bij orgaan transplantatie patiënten te onderzoeken. Hierbij hebben wij ons vooral gericht op de calcineurine activiteit als farmacodynamische marker.

Er zijn verschillende methoden beschikbaar om naar het effect van immuun suppressive medicatie en in het bijzonder de calcineurine remmers te kijken. 1) methoden die de activiteit van het directe doeleiwit meten en 2) technieken die immunologische parameters meten na het simuleren van een T cel respons. Bij het eerste type wordt de calcineurine activiteit bepaald. Meting van het directe enzym heeft als voordeel dat andere immuunsuppressieve medicatie geen direct effect heeft op deze meting. Bij het tweede type, worden leukocyten, of specifiek T cellen, gestimuleerd en de cellulaire respons als maat genomen. Deze methoden kunnen ook effecten van andere klassen van immuunsuppressieve medicatie laten zien.

Om de werking van de calcineurine remmers TRL en CsA te meten hebben we een calcineurine activiteits assay opgezet. Met deze methode werd in de leukocyten fractie van perifeer bloed de CN activiteit gemeten. De methode liet een goede reproduceerbaarheid, lineariteit en remming door de calcineurine remmers zien. Ook werd aangetoond dat de calcineurine activiteit geremd wordt in niertransplantatie patiënten die CsA of TRL therapie ontvangen. In een follow-up studie werd gekeken of de calcineurine activiteit daadwerkelijk een maat is voor de immuunsuppressie bij patiënten die behandeld zijn met CsA. Er werd gevonden dat verschillende therapeutische CsA concentraties een verschillende onderdrukking van de calcineurine activiteit evenals IFN $\gamma$  en TNF $\alpha$  secretie na T cell specifieke stimulatie lieten zien. Dit betekent dat zowel calcineurine activiteit als cytokine excretie na T cell specifieke stimulatie in staat zijn om de effecten van CsA therapie bij relevante CsA concentraties te laten zien.

Om de monster/matrix keuze te evalueren werd het effect van de samenstelling van de leukocyten fractie op de gemeten calcineurine activiteit bekeken. Er werd gevonden dat de samenstelling van de witte bloedcellen in het bloed de meetuitkomst zou kunnen beïnvloeden. Deze problematiek kan omzeild worden door specifiek in die celfractie te meten waar de calcineurine remmers hun therapeutische effect genereren; de T lymfocyt. Na aanleiding van deze resultaten is er een T cell specifieke calcineurine assay opgezet voor het monitoren van CsA therapie. Deze methode liet een goede zuiverheid van T cellen en goede analytische eigenschappen zien. Daarnaast werd er in zes stabiele patiënten die CsA kregen, T cell specifieke calcineurine remming gevonden.

Tot slot werd gekeken of er met farmacodynamische monitorings technieken medicijn interacties op farmacodynamisch niveau kunnen worden opgepikt. Hiervoor werd in vitro gekeken naar de farmacologische interactie tussen tacrolimus en de mTOR



remmers sirolimus en everolimus. Er werd gevonden dat hoge concentraties van everolimus of sirolimus de calcineurine remming van tacrolimus teniet konden doen (antagoneren). Dit betekent dat combinatietherapie van een mTOR remmer met tacrolimus bij hogere concentraties een ongunstige immunosuppressieve respons laat zien. Of dit klinisch relevant is was echter niet vast te stellen, aangezien extrapolatie van de concentratie nodig is om de gebruikte condities te vergelijken met volbloedconcentraties. Het zou echter erg relevant zijn om dit uit te zoeken.

Dit proefschrift laat zien dat de calcineurine activiteit geschikt is als marker voor het bestuderen van de calcineurine remmers aangezien ze de farmacologische respons laat zien. Voor het gebruik van calcineurine activiteit als marker voor het monitoren van transplantatiepatiënten is verder inzicht in de analytische en biologische variatie nodig voor het ontwikkelen van calcineurine assays die klinisch toegevoegde waarde hebben. De ontwikkelde T cel specifieke calcineurine activiteits assay is een interessante kandidaat om te toetsen als marker voor het monitoren van CsA therapie in transplantatiepatiënten. ◀