

Bruikbaarheid van calcineurineactiviteit als biomarker voor optimalisatie van ciclosporinetherapie bij niertransplantatiepatiënten

Rogier R. Press ^{ab*}, Huub H. van Rossum ^{bc}, Bart A. Ploeger ^{de}, Jan den Hartigh ^a, Hans van Pelt ^c, Henk-Jan Guchelaar ^a, Johan W. de Fijter ^b en Meindert Danhof ^{de}

^a Afdeling Klinische Farmacie & Toxicologie, Leids Universitair Medisch Centrum, Leiden.

^b Afdeling Nefrologie, Leids Universitair Medisch Centrum, Leiden.

^c Afdeling Klinische Chemie, Leids Universitair Medisch Centrum, Leiden.

^d Leiden Amsterdam Center for Drug Research (LACDR), Leiden.

^e LAP&P Consultants BV, Leiden.

* Correspondentie: rogierypress@hotmail.com.

KERNPUNTEN

- De werking van ciclosporine bij niertransplantatiepatiënten is variabel.
- Een biomarker die mate en variabiliteit van het effect weergeeft, zou kunnen helpen de therapie te individualiseren.
- Voor de activiteit van calcineurine, het aangrijpingspunt van ciclosporine, werd de variabiliteit binnen en tussen personen in kaart gebracht.
- De variatie binnen patiënten bleek groot, wellicht door de gebruikte bepalingmethode.

Inleiding

Niertransplantatiepatiënten hebben een sterk variabele respons op het immunosuppressivum ciclosporine. Dit is onder meer toe te schrijven aan variabiliteit in de farmacokinetiek van ciclosporine. Ondanks het meten van bloedspiegels komen (subklinische) acute afstotingen (in het eerste jaar na transplantatie 10-20% acute afstotingen) en niertoxiciteit nog regelmatig voor.

In plaats van meting van ciclosporineconcentraties in het bloed zou ook een farmacodynamische marker voor het effect van de ciclosporinetherapie, namelijk de fosfataseactiviteit van het eiwit calcineurine, bepaald kunnen worden om de therapie te individualiseren. Er is een relatie aangetoond tussen de ciclosporineconcentratie in bloed en de calcineurineactiviteit in witte bloedcellen [1, 2]. Onbekend is echter hoe variabel (intra- en interpatiëntvariatie) de relatie is tussen ciclosporineconcentratie en calcineurineactiviteit.

Dit onderzoek betreft een populatiefarmacokinetische/populatiefarmacodynamische (PK-PD) analyse om deze variabiliteit in kaart te brengen.

Methoden

Niertransplantatiepatiënten werden behandeld met immuno-suppressieve therapie bestaande uit basiliximab, prednisolon,

ABSTRACT

Utility of calcineurin activity as a biomarker for optimization of ciclosporin therapy in renal transplant patients

OBJECTIVE

To evaluate the pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) relationship between ciclosporin blood concentration and calcineurin activity. Despite therapeutic drug monitoring of ciclosporin blood concentrations, renal transplant recipients still suffer from acute rejection and nephrotoxicity. Insight into the individual susceptibility for ciclosporin therapy is warranted to further individualize therapy. A biomarker such as the activity of calcineurin, the target enzyme of ciclosporin, could potentially reflect the between-patient variability in treatment response.

DESIGN AND METHODS

Renal transplant recipients (N = 98) were treated with ciclosporin for six months after transplantation. Ciclosporin blood concentrations and calcineurin phosphatase activity in leukocytes were measured frequently and analyzed using a population PK-PD analysis.

RESULTS

The pharmacokinetics of ciclosporin was found to be linear with delayed absorption. The change in calcineurin activity was directly related to the ciclosporin blood concentration and the PK-PD relationship was best described with a sigmoid maximum-effect (E_{max}) model. The baseline activity (E_0) with a median value of 10 pmol·min⁻¹·mg protein⁻¹ showed considerable within-subject variability (28%), which could be partly explained by differences in intracellular protein amount and assay variability. The E_{max} was 48% of the baseline activity and the ciclosporin potency (IC₅₀) was found to be 223 µg/L, with only a small between-subject variability in E_{max} (13%).

CONCLUSION

Although a clear relationship between ciclosporin blood concentration and calcineurin activity in leukocytes was observed in the population, differences in individual susceptibility for ciclosporin, in terms of efficacy and potency, could not be identified, limiting the utility of this biomarker for the individualization of ciclosporin dosing.

Press RR, van Rossum HH, Ploeger BA, den Hartigh J, van Pelt H, Guchelaar HJ, de Fijter JW, Danhof M. Bruikbaarheid van calcineurineactiviteit als biomarker voor optimalisatie van ciclosporinetherapie bij niertransplantatiepatiënten. PW Wetenschappelijk Platform. 2011;5:a1123.

mycofenolaat en ciclosporine. Het betrof een nauw omschreven populatie van naar verwachting circa 100 patiënten in een fase voorafgaand aan randomisatie voor een klinische studie, die zes maanden na transplantatie zou starten.

Ciclosporine werd initieel gedoseerd als tweemaal daags 4 mg/kg. De dosering werd zo nodig bijgesteld op basis van monitoring van de *area under the curve* (AUC), waarbij de streefwaarde ($AUC_{0-12\text{uur}}$) in de eerste 6 weken $5400 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}$ was en daarna $3250 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}$. De patiënten werden gedurende zes maanden na transplantatie gevolgd. Bloedmonsters werden verzameld in de weken 1, 4, 8, 16 en 26 na transplantatie, voorafgaand aan de inname van ciclosporine en tot 6 uur daarna. Voorafgaand aan de transplantatie werd ook de basale calcineurineactiviteit vastgesteld.

Volbloedconcentraties ciclosporine werden bepaald met fluorescentiepolarisatie-immunoassay (FPIA, AxSYM, Abbott Diagnostics). De concentratiemetingen vertoonden voor het lage ($70 \mu\text{g/L}$), medium ($300 \mu\text{g/L}$) en hoge ($600 \mu\text{g/L}$) concentratiegebied reproduceerbaarheden (CV) van respectievelijk 10%, 9% en 10%. De calcineurineactiviteit werd bepaald in leukocyten die waren verkregen uit perifere bloed, volgens een eerder beschreven methode [3]. Erythrocyten werden gelyseerd en na verwijdering ervan werden ook de overgebleven leukocyten gelyseerd. Aan deze fractie, waarin het intracellulaire calcineurine is vrijgekomen, werd een fosfaatsubstraat toegevoegd. Het product van de fosfatasereactie kon met een spectrofotometrische methode worden gemeten. Als controle werd de activiteit van recombinant calcineurine-eiwit bepaald.

De gegevens werden geanalyseerd met een populatieanalyse die gebruikmaakte van *non-linear mixed effect modeling* (NONMEM, versie VI, Icon Development Solutions). Voor de farmacokinetische analyse werd gebruikgemaakt van een eerder gepubliceerd model [4].

Resultaten

Niertransplantatiepatiënten ($N = 98$) in de leeftijd van 19 tot 73 jaar werden geïncludeerd. De farmacokinetiek van ciclosporine in deze groep was lineair en vertoonde vertraagde absorptie. Voor de beschrijving van de vertraagde absorptie werd gebruikgemaakt van een buffercompartiment tussen het dosiscompartiment en het centrale compartiment. Distributie en eliminatie van ciclosporine werden beschreven met een tweecompartimentenmodel met eerste-orde-eliminatie. Lichaamsgewicht en gelijktijdig gebruik van prednisolon werden meegenomen als covariaten voor de kinetiek van ciclosporine. Gebruik van prednisolon als comedicaatie (in een dosis van 20 mg of meer) leidde tot een 48% lagere absorptieconstante en een 15% hogere (schijnbare) klaring van ciclosporine.

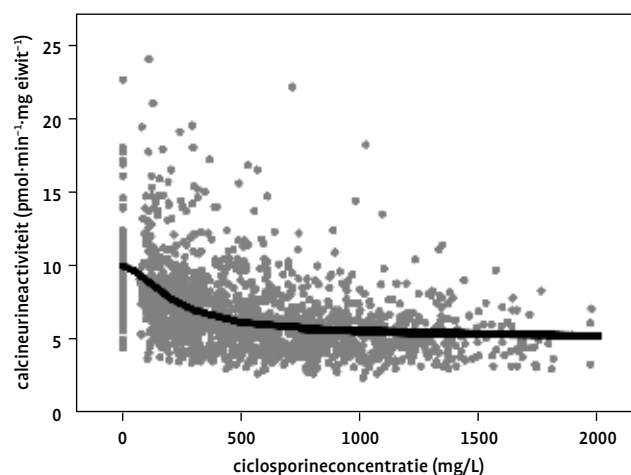
Er was een duidelijke relatie tussen de concentratie ciclosporine in volbloed en de calcineurineactiviteit in leukocyten. De maximale ciclosporineconcentratie en de maximale remming van de calcineurineactiviteit vonden beide plaats 1-2 uur na inname van ciclosporine, wat een direct effect suggereert. Deze relatie kon worden beschreven met een sigmoïde E_{max} -model in de vorm

$$E = E_0 \times \left[1 - \frac{(E_{\text{max}} \times \text{CsA}^\gamma) / (\text{IC}_{50}^\gamma \times \text{CsA}^\gamma)}{1 + (E_{\text{max}} \times \text{CsA}^\gamma) / (\text{IC}_{50}^\gamma \times \text{CsA}^\gamma)} \right]$$

waarbij E_0 is gedefinieerd als de basale activiteit bij afwezigheid van ciclosporine, E_{max} als het maximale effect, IC_{50} de concentratie

FIGUUR 1

Relatie tussen calcineurineactiviteit in leukocyten en ciclosporineconcentratie in volbloed



De gesloten cirkels zijn alle waargenomen concentraties en bijbehorende calcineurineactiviteitswaarden van ieder individu op een bepaald tijdstip na inname van ciclosporine en op een bepaald moment na transplantatie. De lijn beschrijft het verloop van de calcineurineactiviteit met de ciclosporineconcentratie voor de gemiddelde patiënt.

bij het half-maximale effect, CsA de concentratie ciclosporine in volbloed en γ de Hill-factor. De variatie was aanzienlijk: bij een bepaalde ciclosporineconcentratie werd een variatie in calcineurineactiviteit waargenomen tot een factor 6 (figuur 1).

De basale calcineurineactiviteit (E_0) heeft een mediane waarde van $10 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg eiwit}^{-1}$ met een intrapatiëntvariatie van 28% (calcineurineactiviteit in afwezigheid van ciclosporine). De grote variatie binnen individuen geeft aan dat de gehele concentratie-effectcurve in hoogte varieert, ofwel op en neer verschuift, in de tijd na transplantatie. De E_{max} was 48% van de basale activiteit met een geringe interpatiëntvariatie van 13%. De IC_{50} was $223 \mu\text{g/L}$ met een γ van 1,7.

Een klein deel van de variatie in de E_0 kon worden verklaard door de covariaat intracellulair eiwit. De monsters bevatten 174 mg eiwit (mediaan), met een spreiding van 93 tot 407 mg . De basale activiteit nam met 2,3% af bij iedere 10 mg toename van intracellulair eiwit.

De activiteit van recombinant calcineurine (de controle) vertoonde een variatiecoëfficiënt van 10%.

Beschouwing en conclusie

In de onderzochte populatie van 98 niertransplantatiepatiënten werd een duidelijke relatie aangetoond tussen de concentratie van ciclosporine in volbloed en de calcineurineactiviteit in leukocyten. De gevonden waarden van E_{max} en IC_{50} zijn in overeenstemming met eerdere publicaties [5, 6]. De variatie in de basale calcineurine-

activiteit binnen patiënten was echter groot, terwijl verschillen tussen patiënten niet aangetoond konden worden (IC_{50}) dan wel marginaal waren (E_{max}).

De oorzaak van deze variabiliteit in de basale calcineurineactiviteit kan zowel gelegen zijn in de biologie als in de analysemethode.

Biologische variatie kan het gevolg zijn van de verschillen in calcineurineactiviteit in de verscheidene subtypes cellen, aangezien de leukocytenfractie bestaat uit granulocyten, lymfocyten en monocytten. Dit bleek echter maar een gering effect, aangezien dit met name in de beginfase na transplantatie een rol speelt en de basale calcineurineactiviteit maar met 2,3% afnam bij iedere toename van 10 mg intracellulair eiwit. Biologische variatie kan ook het gevolg zijn van veranderingen in de fysiologie van de transplantatiepatiënt, veranderingen in de immuunrespons of een adaptatie als gevolg van de ciclosporinetherapie.

Ondanks de eerdere validatie [3] werd nagegaan in hoeverre de analysemethode variabiliteit introduceerde. Hiertoe is wederom de reproduceerbaarheid bepaald, maar ditmaal in een leukocytenlysaat van humaan volbloed. Het monster dient ingevroren bewaard te worden, wat ook variatie in en afname van de enzymactiviteit teweegbrengt. Normaliter maakt dit een dergelijk monster ongeschikt als kwaliteitscontrolemonster. Toch werd hiermee in de loop van dagen een minstens drievoudige variatie in de calcineurineactiviteit gesignaleerd, die niet werd waargenomen tijdens validatie van de assay. De oorzaak van deze variatie is waarschijnlijk gelegen in de aanwezigheid van andere celbestanddelen en fosfatases, die niet aanwezig zijn bij gebruik van het recombinanteiwit. Tot op heden wordt er beperkt en onvolledig gerapporteerd omtrent gebruik van kwaliteitscontrolemonsters bij calcineurineactiviteitsassays [7-9]. Veelal lijken deze afwezig en vaak worden enkel calcineurineactiviteitsmetingen op een enkele dag gerapporteerd, waardoor verloop in de tijd weinig is bestudeerd. In één onderzoek bij levertransplantatiepatiënten [10] is dat wel gebeurd en daar is eenzelfde intrapatiëntvariatie zichtbaar. Dit onderzoek laat zien dat voor de ontwikkeling van een biomarker het bestuderen van meetwaarden in de loop van de tijd en de ontwikkeling van een geschikt kwaliteitscontrolemonster essentieel zijn.

Het uiteindelijke doel van onderzoek om een biomarker te ontwikkelen, is de klinische uitkomst te voorspellen en eventueel aan de hand van de biomarker de behandeling te optimaliseren. In de door ons onderzochte groep niertransplantatiepatiënten, die werden behandeld met vier immunosuppressiva, wordt in de regel slechts een lage frequentie acute afstotingen waargenomen. Deze studie was daardoor niet geschikt om een relatie van de biomarker met het optreden van acute afstoting te onderzoeken. Primair was het doel om prospectief te bestuderen hoe de biomarker zich gedraagt in deze populatie en of deze biomarker in staat is verschillen in ciclosporinegevoeligheid tussen patiënten aan te tonen. Dit laatste bleek helaas niet het geval.

Concluderend kan worden gesteld dat de onderzochte calcineurineactiviteit in leukocyten, ondanks dat er een duidelijke relatie met de ciclosporineconcentratie in bloed werd gezien, een te grote variatie vertoont binnen patiënten om als biomarker te kunnen fungeren.

Gebaseerd op het registratieonderzoek van R.R. Press.

LITERATUUR

- 1 Fruman DA, Klee CB, Bierer BE, Burakoff SJ. Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporin A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(9):3686-90.
- 2 Yano I. Pharmacodynamic monitoring of calcineurin phosphatase activity in transplant patients treated with calcineurin inhibitors. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2008;23(3):150-7.
- 3 Sellar KJ, van Rossum HH, Romijn FP, et al. Spectrophotometric assay for calcineurin activity in leukocytes isolated from human blood. *Anal Biochem*. 2006;358(1):104-10.
- 4 Press RR, Ploeger BA, den Hartigh J, et al. Explaining variability in ciclosporin exposure in adult kidney transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol*. 2010;66(6):579-90.
- 5 Caruso R, Perico N, Cattaneo D, et al. Whole-blood calcineurin activity is not predicted by cyclosporine blood concentration in renal transplant recipients. *Clin Chem*. 2001;47(9):1679-87.
- 6 Fukudo M, Yano I, Masuda S, et al. Pharmacodynamic analysis of tacrolimus and cyclosporine in living-donor liver transplant patients. *Clin Pharmacol Ther*. 2005;78(2):168-81.
- 7 Blanchet B, Hulin A, Duvoux C, Astier A. Determination of serine/threonine protein phosphatase type 2B PP2B in lymphocytes by HPLC. *Anal Biochem*. 2003;312(1):1-6.
- 8 Fukudo M, Yano I, Masuda S, et al. Distinct inhibitory effects of tacrolimus and cyclosporin A on calcineurin phosphatase activity. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;312(2):816-25.
- 9 Koefoed-Nielsen PB, Karamperis N, Jørgensen KA. Validation of the calcineurin phosphatase assay. *Clin Chem*. 2004;50(12):2331-7.
- 10 Blanchet B, Duvoux C, Costentin CE, et al. Pharmacokinetic-pharmacodynamic assessment of tacrolimus in liver-transplant recipients during the early post-transplantation period. *Ther Drug Monit*. 2008;30(4):412-8.