

THERAPEUTIC DRUG MONITORING VOOR INFLAMMATORY BOWEL DISEASE

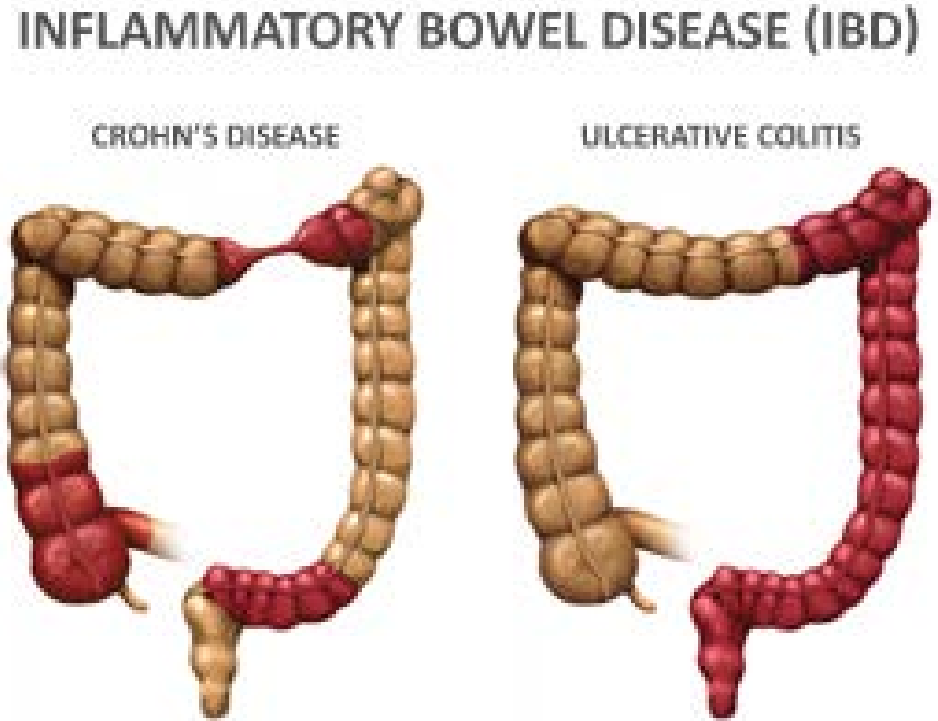
09-04-2013

Apr. Christophe Indevuyst
ASO Klinische biologie

Inflammatory bowel disease

2

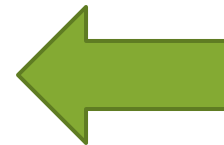
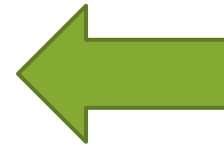
- Groep van chronische inflammatoire maag-darm aandoeningen
 - ▣ Ziekte van Crohn
 - ▣ Colitis ulcerosa
 - ▣ ...
- NL: 25 000 patiënten
- Incidentie: 2 500/jr



Behandeling

3

- 5-aminosalicylaten
- Corticosteroiden
- Thiopurines
 - ▣ Azathioprine (Imuran®)
 - ▣ 6-mercaptopurine (Puri-nethol®)
- Cyclosporine
- Methothrexaat
- Anti-TNF alfa antistoffen:
 - ▣ Infliximab (Remicade®)
 - ▣ Adalimumab (Humira®)



Aanleiding tot deze CAT

4

- Diverse analyses gebeuren bij deze patiënten.

- Kliniek
 - ▣ TPMT genotypering op het centrum menselijke erfelijkheid
 - ▣ Vraag naar analyse van thiopurinemetabolieten.
 - ▣ Recente studies naar spiegels van TNF-alfa antistoffen

- CAT:
 - ➔ Wat is de evidentie voor deze analyses?

Questions

5

1. Wat is de waarde van TPMT genotypering?
2. Is dosage van thiopurinemetabolieten in bloed aangewezen? Welke methoden worden hiervoor gehanteerd.
3. Is dosage van biologicals aangewezen?

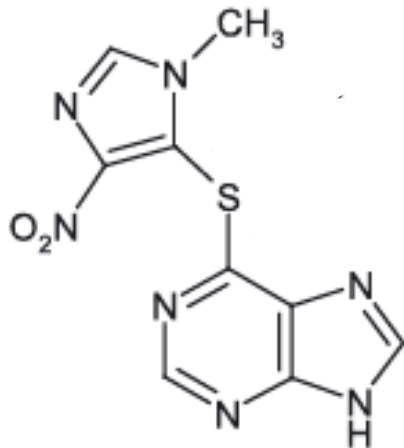
Inleiding: thiopurine farmacologie

6

- Thiopurines hebben een steroidsparend effect bij patiënten met steroiddependente en –refractaire IBD.
- Gebruik beperkt door mogelijke toxiciteit.
 - ▣ Dosisafhankelijk:
 - Na weken (~ vorming van toxische metabolieten)
 - nausea en malaise, infecties, **hepatitis** (0,3%-1,3%) en **beenmergonderdrukking** (1,4% tot 11% ~ definitie)
 - ▣ Dosisonafhankelijk:
 - Sneller (2-4 weken)
 - Koorts, rash, arthralgie
 - Pancreatitis = idiosyncratische reactie

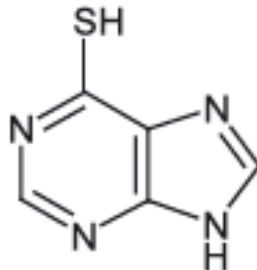
Thiopurine metabolisme

7



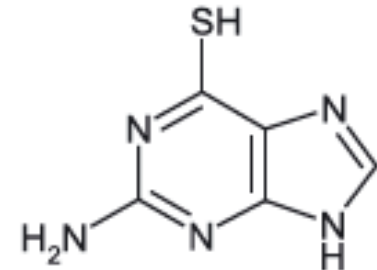
Azathioprine

Imuran®



6-Mercaptopurine

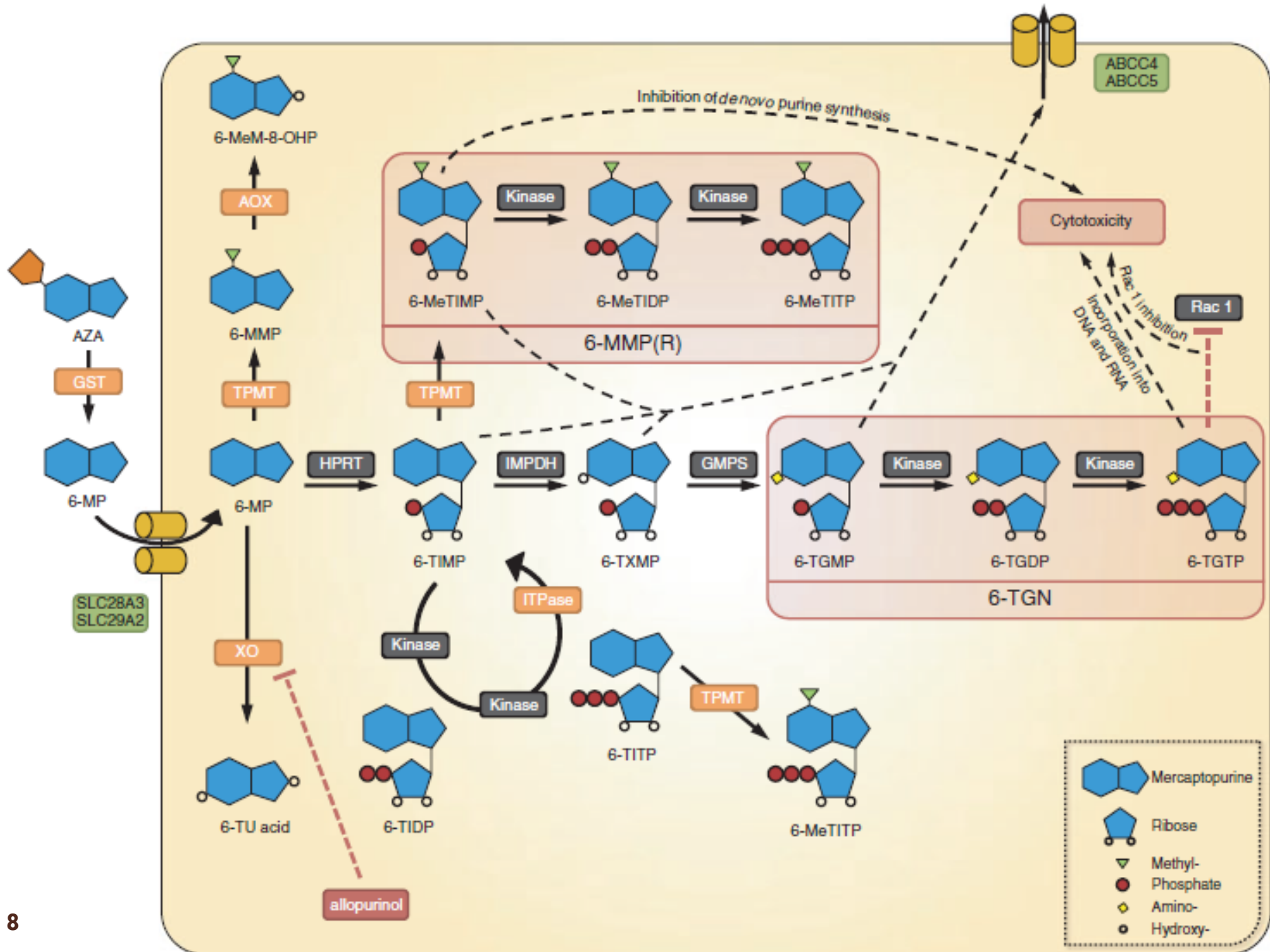
Puri-nethol®



6-Thioguanine

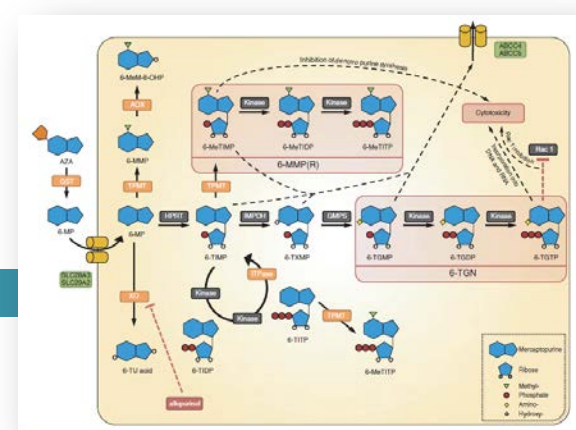
Lanvis®

Metabolisme is **complex...**



Thiopurine werkingsmechanisme

9



- Inhibitie van lymfocyttaire proliferatie.
- Verschillende mechanismen dragen bij
 - ▣ Inbouw in DNA van 6-TGTP ipv guanosinenucleotiden.
 - ▣ Directe inhibitie van Rac1 door 6-TGTP.
 - ▣ Inhibitie van de novo purine syntese door 6-MMPR.
 - ▣ ...?
- Effect na 12-17 weken.

Respons

10

□ Grote **variabiliteit**

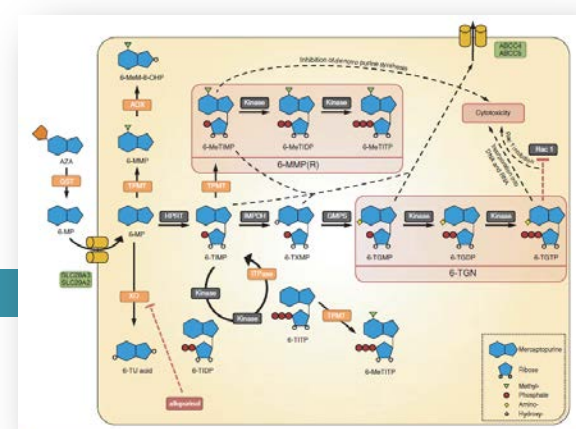
□ AZA

□ Biologische beschikbaarheid: ~ 16% tot 72%

□ T1/2 variabel tussen 3-13 dagen

□ Oa te wijten aan **polymorfismen** in diverse metaboliserende enzymen.

□ Meest gekend **TPMT**



Questions

11

1. Wat is de waarde van TPMT genotypering?
2. Is dosage van thiopurinemetabolieten in bloed aangewezen? Welke methoden worden hiervoor gehanteerd.
3. Is dosage van biologicals aangewezen?

Questions

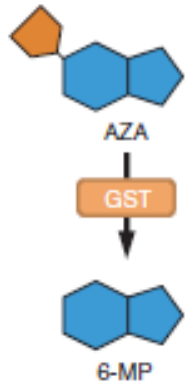
12

1. **Wat is de waarde van TPMT genotypering?**
2. Is dosage van thiopurinemetabolieten in bloed aangewezen? Welke methoden worden hiervoor gehanteerd.
3. Is dosage van biologicals aangewezen?

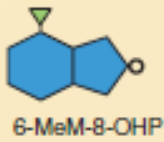
TPMT

13

- Thiopurine-S-Methyl transferase
- Endogene functie niet gekend.
- Bepaalt **balans** tussen productie van **6-TGN** en **6-MMP**
- Weinshilboum & Sladek (1980): trimodale distributie
 - 89,6 % hoge activiteit (homozygoot wild-type)
 - 11,1 % intermediaire activiteit (heterozygoot)
 - 0,3 % lage activiteit (homozygoot mutant)
- Lage activiteit → cave **beenmergsuppressie!**



SLC28A3
SLC29A2



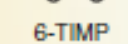
AOX



TPMT



TPMT



IMPDH



GMP



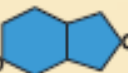
Kinase



Kinase



XO



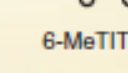
Kinase

Kinase

ITPase



TPMT



Hepatotoxiciteit

Activiteit

(+ beenmergtoxiciteit)

Inhibition of *de novo* purine synthesis

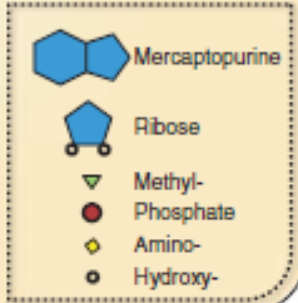
Cytotoxicity

Rac 1 inhibition
Incorporation into
DNA and RNA

Rac 1

ABCC4
ABCC5

allopurinol



Farmacogenetica

16

□ TPMT

- ▣ > 30 polymorfismen beschreven.
- ▣ Meest frequente inactiverende mutaties:
*TPMT*2, TPMT*3A/B/C*

Table 1 *TPMT* allele nomenclature

Allele	dbSNP rsID and corresponding nucleotides on the positive chromosomal strand (for standardization)	Nucleotide changes in the <i>TPMT</i> gene (given on the negative chromosomal strand, NCBI reference sequence NM_000367.2)	Gene location	Amino acid change (NCBI reference sequence NP_000358.1)
<i>TPMT*1</i>	rs2842934 allele A ^a	Wild type 474T ^a	-	-
<i>TPMT*1A</i>	ND, G>A	- 178C>T	Exon I	-
<i>TPMT*1S</i>	A>G at rs2842934	474T>C	Exon VII	Ile158Ile
<i>TPMT*2</i>	C>G at rs1800462	238G>C	Exon V	Ala80Pro
<i>TPMT*3A</i>	C>T at rs1800460	460G>A		
<i>TPMT*3B</i>	C>T at rs1800460	460G>A		
<i>TPMT*3C</i>	T>C at rs1142345	719A>G	Exon X	Tyr240Cys

> 95% Caucasische bevolking

Aanbevelingen

17

- IBD:
 - ▣ ECCO 2010 : geen vermelding
 - ▣ BSG 2004 : “it cannot yet be recommended”

 - ▣ FDA bijsluiter: “recommended that consideration be given”

- Dermatologische & reumatologische beroepsvereniging
 - ▣ raden dit wel aan.

Waarde van TPMT genotypering

18

1. Performantie ten opzichte van fenotypering?
2. Leidt dit tot verandering in het patiëntenmanagement? (Minder harm?)
3. Wat is de evidentie voor de associatie tussen TPMT status en thiopurine toxiciteit?

Systematische review (Booth et al.)

19

- 1. Performantie van TPMT genotypering
 - ▣ Ten opzichte van fenotypering (=activiteitsmeting)

 - ▣ 19 studies geïnccludeerd
(vnl. cross-sectioneel en prospectief observationeel)

 - ▣ **Conclusies**
 - Sensitiviteit = imprecies. Varieert tussen 70-86%
 - Specificiteit ~ 100%

Systematische review

20

- 2. Leidt typering tot wijziging in patiëntenmanagement?
 - Zeer weinig evidentie beschikbaar (2 studies)
 - Clinici waren niet bereid therapie op te starten zonder typering.
 - Vaak underpowered
 - zeer weinig homozygoten
 - Relatief weinig adverse events.
 - **Conclusie:**
 - Geen uitspraak mogelijk.

Systematische review

21

- 3. Associatie TPMT status en toxiciteit?
 - ▣ Op basis van fenotypering (17 studies):
 - Odds voor myelotoxiciteit/leukopenie waren groter bij lage enzymactiviteit dan bij intermediair of normale activiteit.
 - Geen evidentie voor verschil in mortaliteit, hospitalisatie, ernstige adverse events of quality of life.
 - ▣ Op basis van genotypering (31 studies):
 - Heterozygoten meer kans op leukopenie dan wild-type (OR 4,29)
 - Idem voor homozygoot mutanten (weinig patiënten)
 - Meer terugtrekkingen uit studies door heterozygoten dan wild-type.

Conclusie TPMT typering:

22

- Onderwerp van **veel discussie**:
 - ▣ Rationale is logisch
 - ▣ Evidentie ontbreekt
 - Weinig homozygoten
 - Weinig adverse events
 - ➔ studies vaak underpowered.
 - Meer kans op leukopenie, maar geen meetbaar effect op harde eindpunten (mortaliteit, hospitalisatie, QOL,...)

- **Routine hematologische monitoring blijft noodzakelijk.**

Gebruik

23

- Survey Roblin et al.
 - ▣ < helft van de clinici gebruikt deze tests.
 - ▣ Belangrijkste determinant:
 - Beschikbaarheid van de test
 - Terugbetaling

- In UZ Leuven wordt de test systematisch uitgevoerd bij wie Imuran® zal worden opgestart.

Questions

24

1. Wat is de waarde van TPMT genotypering?
2. Is dosage van thiopurinemetabolieten in bloed aangewezen? Welke methoden worden hiervoor gehanteerd?
3. Is dosage van biologicals aangewezen?

Questions

25

1. Wat is de waarde van TPMT genotypering?
2. Is dosage van thiopurinemetabolieten in bloed aangewezen? **Welke methoden worden hiervoor gehanteerd?**
3. Is dosage van biologicals aangewezen?

Analysemethoden

27

- Historisch: Lennard & Singleton en Dervieux et al.
 - ▣ Analyse op **gewassen RBC's**.
 - ▣ Extractie met **kwikderivaten**.
 - ▣ **Hydrolyse** van de nucleotiden tot 6-TG en 6-MMP
 - ▣ Analyse via **RP-HPLC**
 - ▣ Detectie met **UV** en/of **fluorescentie** (na derivatisatie)
- **Problemen:**
 - ▣ Omslachtig + arbeidsintensief
 - ▣ Hydrolyse met perchloorzuur → incompatibel met HPLC kolom

Analysemethoden

28

- Pike et al.
 - ▣ Toonde aan dat volbloed kan gebruikt worden.
 - ▣ Stabiliteit van metabolieten is beperkt.
 - 2-4% verlies per dag op kamertemp.
 - 1% na 1 week op -20 °C.
 - 12% na 24 weken op -20°C.
- Bakker et al.
 - ▣ Geen hydrolyse.
 - ▣ Geen klinische studies met deze methode.

Analysemethoden

29

- Onderling niet zomaar vergelijkbaar.
 - ▣ Shipkova et al.
 - Tot 2,6x hogere waarden met de ene methode versus de andere.

- ➔ Ook doelwaarden uit studies zijn niet zomaar vergelijkbaar!

Thesis K. Hermans

30

- Verschillende methoden uitgetest en aangepast.
- Doel:
 - ▣ Eenvoudige staalvoorbereiding
 - ▣ Detectie van 6-TGN en 6-MMP in 1 run.

- Resultaten:
 - ▣ Niet in geslaagd dit te realiseren.
(pH problemen, omslachtige extractie, onstabiele componenten, toestel onvoldoende gevoelig).

Nieuwere methoden

31

- Hofmann et al., Vikingsson et al.
 - ▣ Bepaling van individuele nucleotiden (zonder hydrolyse)
 - ▣ MSMS

- Problemen:
 - ▣ Zeer **onstabiel** (difosfaat \longleftrightarrow trifosfaat)
 - ▣ Geen studies over doel/streefwaarden.

Conclusie

32

- Verschillende analysemethoden ontwikkeld
 - ▣ Onderling niet steeds vergelijkbaar.
 - ▣ Omslachtige en soms toxische extractie.
 - ▣ Pre-analytische fase is cruciaal (stabiliteit).

- Meting van individuele nucleotiden:
 - ▣ Geen klinische studies beschikbaar.
 - ▣ Nog moeilijkere pre-analytische fase.
 - ▣ Geen commerciële standaarden beschikbaar.

Questions

33

1. Wat is de waarde van TPMT genotypering?
2. Is dosage van thiopurinemetabolieten in bloed aangewezen? Welke methoden worden hiervoor gehanteerd?
3. Is dosage van biologicals aangewezen?

Questions

34

1. Wat is de waarde van TPMT genotypering?
2. **Is dosage van thiopurinemetabolieten in bloed aangewezen?** Welke methoden worden hiervoor gehanteerd?
3. Is dosage van biologicals aangewezen?

Meta-analyse

35

□ Osterman et al. (2006)

Table 2. Differences in Mean/Median 6-TGN Levels Between Patients With Active and Inactive Disease

Study	N	6-TGN level remission (pmol/8 × 10 ⁸ RBC)	6-TGN Level Active (pmol/8 × 10 ⁸ RBC)	% Weight
Achkar et al, 2004 ^a	53 ^a	Mean, 320 SD, 22	Mean, 215 SD, 20	18.9
Goldenberg et al, 2004 ¹²	74	Mean, 325 SD, 284	Mean, 223 SD, 159	6.6
Hindorf et al, 2004 ¹³	55	Median, 288 SD, 196	Median, 210 SD, 116	11.5
Wright et al, 2004 ¹⁰	131 ^b	Median, 236 Range, 70–717	Median, 175 Range, 70–517	15.5
Dubinsky et al, 2002 ¹⁵	51	Median, 306 Range, 168–853	Median, 155 Range, 90–707	10.0
Belaiche et al, 2001 ⁹	22 ^c	Median, 166 Range, 105–188	Median, 160 Range, 52–194	13.5
Lowry et al, 2001 ¹⁸	170	Mean, 250 SD, 186	Mean, 285 SD, 142	15.1
Dubinsky et al, 2000 ¹¹	173 ^d	Median, 312 Range, 49–1203	Median, 199 Range, 0–705	9.0
Pooled difference (95% CI)		66 (18,113) P = .006		

NOTE: Random-effects results shown only.

^aBased on patients with only active disease or remission (7 partial responders excluded because SD could not be calculated).

^bBased on 131 patients with steady-state values.

^cBased on patients with only active disease or remission (6 partial responders excluded because median value could not be calculated).

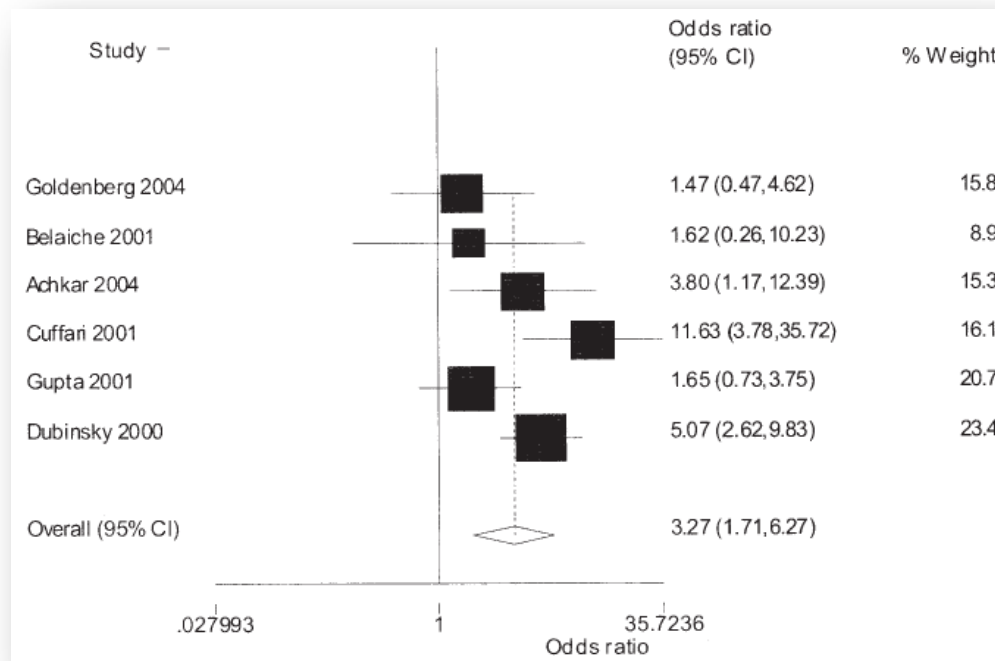
^dBased on 173 samples from patients with active disease and remission (NB: samples are not independent).

- Gemiddelde 6-TGN levels hoger bij remissie dan actieve ziekte.
- Heterogene resultaten.

Meta-analyse

36

- Cutoff 230-260 pmol/ 8×10^8 RBCs



- “*Patiënts above cutoff were more likely to be in remission (62%) than those below cutoff (36%)*”

Cutoffs uit literatuur (pmol/8x10⁸ RBCs)

37

□ 6-TGN

Respons

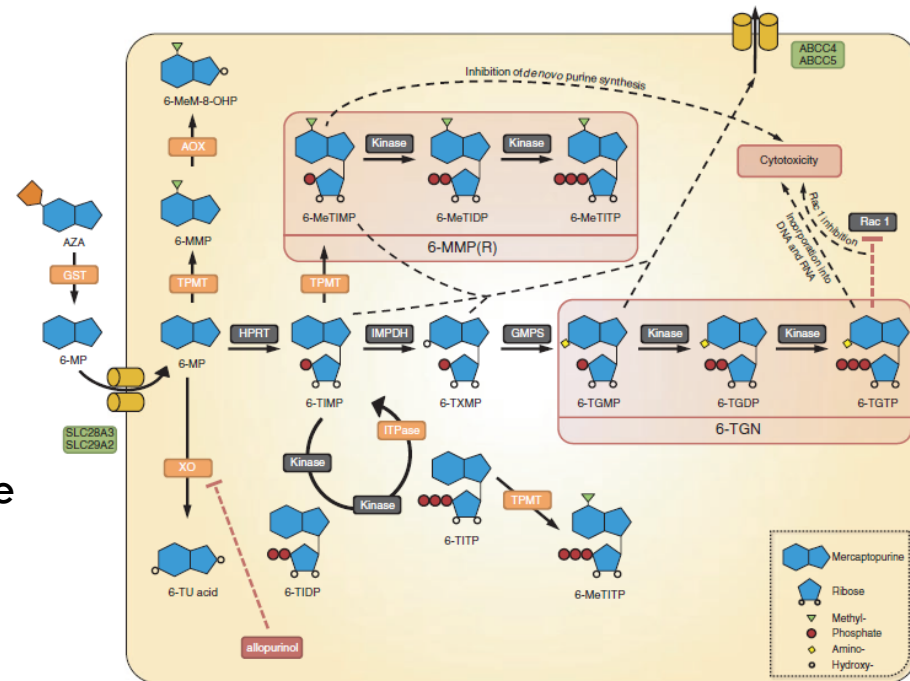
> 230-260

Toxiciteit

Beenmergsuppressie
> 450


□ 6-MMP

Hepatotoxiciteit
> 5700



Prometheus

38

- Commercieel labo USA.
 - Wou deze test met referentiewaarden patenteren.
- 
- Proces vs. Mayo clinic.
 - **Geen patent toegekend.**

The Economist | Log in | Register | Subscribe | Digital & mobile

World politics | Business & finance | Economics | Science & technology | Culture | Blogs

Our cookies policy has changed, review our [cookies information](#) for more details. By continuing to browse

Biotech patents

Taking it personally

A legal fight over a new generation of medicine

Dec 10th 2011 | NEW YORK | From the print edition

Like 29 | Tweet 60



DRUG research is in dark times, as pipelines dry up and development budgets are cut. But one shaft of light pierces the gloom. "Personalised medicine" promises to craft drugs for individuals. Genetic tests will identify those who will benefit from specific medicines. Treatment will be more effective; waste will drop. Personalised medicine has sparked excitement among drugmakers, doctors, hospitals and patients. It has also sparked a legal brawl.

On December 7th America's Supreme Court heard arguments in *Mayo v Prometheus*. The suit, despite a name that suggests an ancient liver sandwich, may be crucial for

Recentere literatuur

39

- Reinshagen et al. 2007
 - ▣ Prospectieve gerandomiseerde controlled trial
 - ▣ Interventiegroep: 6-TGN spiegels tussen 250-400 pmol
 - ▣ **Conclusies**
 - Geen verschillen in toxiciteit, 6-TGN levels, AZA dosering of dropouts door toxiciteit.
 - ➔ geen benefit voor 6-TGN dosering bij normale TPMT.
 - Geen associatie tussen 6-MMP > 5700 pmol en hepatotox.
 - ➔ Geen voorspellende waarde van 6-MMP dosage
- Goldenberg et al. (2004)
 - ▣ Zelfde bevindingen.

Recentere literatuur

40

- Gonzàlez-Lama et al. 2011
 - ▣ Prospectieve multicentrische studie
 - ▣ Doel
 - identificeren cutoff's efficaciteit/veiligheid
 - ▣ Resultaten:
 - Cutoffs uit literatuur slechte performantie.
 - Geen andere drempelwaarde kon geïdentificeerd worden.
 - ▣ **Conclusie:**
 - Aanpassingen hierop baseren is zinloos.

Recentere literatuur

41

□ Haines et al. 2011

▣ Studieopzet

- Retrospectieve studie bij patiënten niet in remissie.
- Vergeleek outcome ifv spiegels en de genomen actie

▣ Resultaten:

- 87% vs 18% verbeterde
(behandeling cfr. protocol vs. niet volgens protocol)

▣ Conclusie:

- Thiopurine dosage is nuttig voor het vermijden van een klasse-switch. (naar 'biologicals')
- Om non-compliance detecteren (11% !)
- Potentiële toxiciteit te vermijden

Recentere literatuur

Table 2 | Median 6-TGN levels in patients in remission and in patients with active disease

Data collection	Author, year	Disease	Number of patients assessed	Time delay to 6-TGN assay after initiation	6-TGN reference method assay	6-TGN level (pmol/8 × 10 ⁸ RBC)		P
						Patients in remission	Patients with active disease	
Prospective	Cuffari, 2001 ⁹⁹	IBD	82	3 months	Lennard, 1992; modified	316	176	P < 0.01
	Dublinsky, 2000 ⁹⁸	Paediatric IBD	92	4 months	Lennard, 1992; modified	312	209	P < 0.004
	Hanai, 2010 ²²⁸	Ulcerative colitis	170	12 months	Erdmann, 1990; modified	322	204	P < 0.001
	Hindorf, 2006 ³⁰	IBD	27	5 months	Lennard, 1992	176	163	NS
	Reinshagen, 2007 ¹⁰⁴	Crohn's disease	39	4 months	Lennard, 1992	222	222	NS
	González-Lama, 2011 ¹⁰⁸	IBD	70	6 months	Dervieux, 2005	427	318	P = 0.9
	Wright, 2004 ¹⁰¹	IBD	131	Steady state	Lennard, 1992	236	175	P < 0.04
Retrospective	Achkar, 2004 ²²⁹	IBD	60	3 months	Lennard, 1992; modified	320*	215*	P < 0.003
	Andoh, 2008 ²³⁰	IBD	83	4 months	Erdmann, 1990; modified	343	233	P < 0.05
	Belaiche, 2001 ²³¹	Crohn's disease	22	3 months	Lennard, 1992	166	160	NS
	Goldenberg, 2004 ¹⁵⁸	IBD	74	2.5 months	Erdmann, 1990	325*	223*	NS
	Gupta, 2001 ¹⁰⁰	Paediatric IBD	101	4 months	Erdmann, 1990	217	173	NS (P = 0.09)
	Kwan, 2008 ²³²	IBD	39	1 month	Lennard, 1992	236*	202*	NS
	Lowry, 2001 ¹⁰⁶	IBD	170	3.5 months	Erdmann, 1990	131	139	NS

6-TGN, 6-thioguanine nucleotides; RBC, red blood cells; IBD, inflammatory bowel disease.

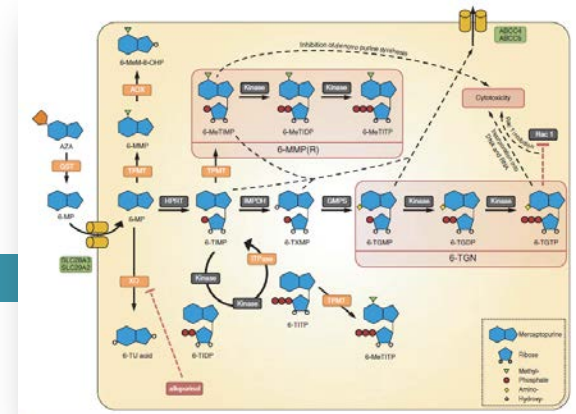
A conversion factor of 1.6 is required to compare results between Erdmann *et al.*²³³ and Lennard *et al.*²³⁴ method assay (Shipkova *et al.*²³⁵).

* Mean 6-TGN level reported.

Besluit

43

- Veel tegenstrijdige resultaten.
 - ▣ Cutoffs zijn nog niet onomstotelijk bewezen.
- Mogelijk wel nuttig bij **investigatie non-responders**:
 - ▣ Non-compliance
 - ▣ Shunting naar 6-MMP ipv 6-TGN
- Niet opgenomen in officiële guidelines
 - ▣ Wel suggesties in diverse artikels



Voorgesteld algoritme

44

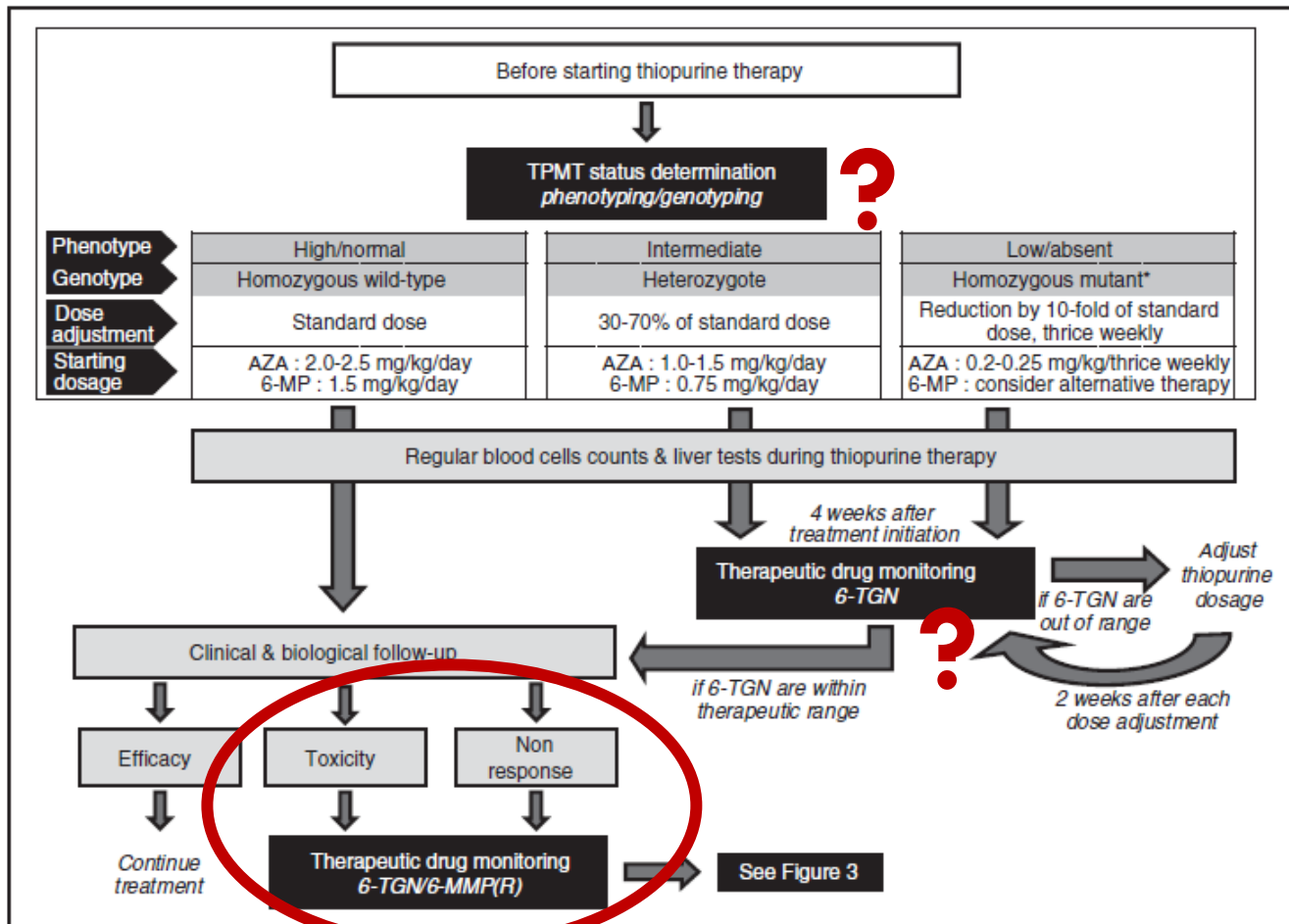
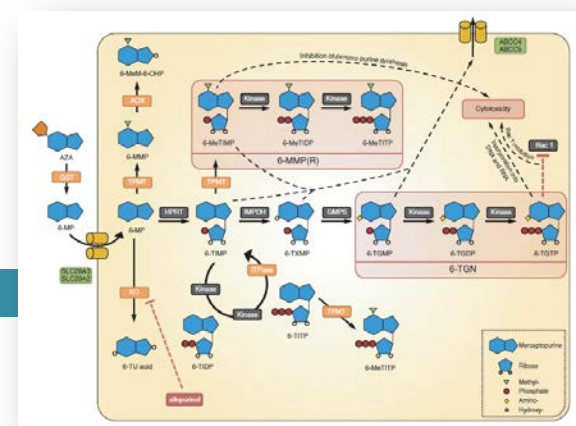


Figure 2 | Therapeutic algorithm for thiopurine therapy management. For patients before initiating thiopurine therapy: recommended starting dose of thiopurines, depending on TPMT phenotype/genotype (Adapted from Relling *et al.*²²⁶) For patients under thiopurine therapy: recommendations of therapeutic monitoring, based on thiopurine metabolites measurement [6-TGN and 6-MMP(R)]. TPMT, thiopurine S-methyltransferase; AZA, azathioprine; 6-MP, 6-mercaptopurine; 6-TGN, 6-thioguanine nucleotides; 6-MMP(R), 6-methylmercaptopurine ribonucleotides. * Or compound heterozygote.

Metabolietprofilen

45



	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5
TDM	Low/absent 6-TGN and Low/absent 6-MMP(R)	Low 6-TGN and Low 6-MMP(R)	Low 6-TGN and High 6-MMP(R)	High 6-TGN and Low 6-MMP(R)	High 6-TGN and High 6-MMP(R)
Risk	Inefficacy (false resistance)	Inefficacy or poor response	Poor response and/or hepatotoxicity	Myelotoxicity	Myelotoxicity and/or hepatotoxicity
Hypothesis	Poor compliance to treatment	Underdosing	Very high TPMT activity <i>i.e.</i> pharmacological resistance to thiopurines	Deficient TPMT activity	Overdose or refractoriness to thiopurines
Action	Therapeutic patient education	Increase thiopurine dosage	Add allopurinol 100mg/day and decrease thiopurine dosage (25-50% of original dose)	Decrease thiopurine dosage according to TPMT phenotype*	Switch to another drug if active disease

Figure 3 | Therapeutic drug monitoring, based on thiopurine metabolite profiles, in inflammatory bowel disease patients experiencing toxicity or resistance: what to do? TDM, therapeutic drug monitoring; 6-TGN, 6-thioguanine nucleotides; 6-MMP, 6-methylmercaptapurine; TPMT, thiopurine S-methyltransferase. * Particular attention should be raised to patients with low/absent activity (homozygous mutant or compound heterozygote). Adapted from Dewit *et al.*¹⁰⁹

Questions

46

1. Wat is de waarde van TPMT genotypering?
2. Is dosage van thiopurinemetabolieten in bloed aangewezen? Welke methoden worden hiervoor gehanteerd.
3. Is dosage van biologicals aangewezen?

Questions

47

1. Wat is de waarde van TPMT genotypering?
2. Is dosage van thiopurinemetabolieten in bloed aangewezen? Welke methoden worden hiervoor gehanteerd.
3. Is dosage van biologicals aangewezen?

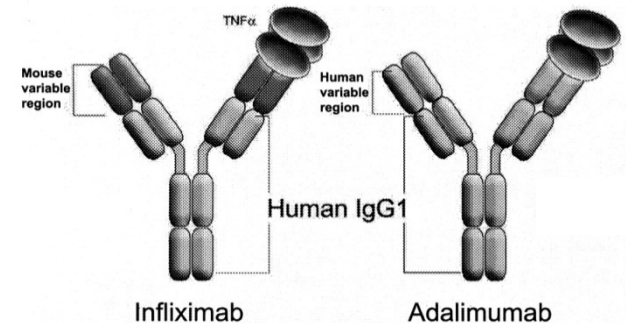
Anti-TNF antistoffen

48

- Infliximab (Remicade®)
- Adalimumab (Humira®)

- Effect daalt na verloop van tijd
 - ▣ Ontwikkeling neutraliserende antistoffen.

- Laboratorium voor farmaceutische biologie (KUL).
 - ▣ Ontwikkeling ELISA voor infliximab en detectie neutraliserende antistoffen.



Klinisch nut

49

- Retrospectieve studies:
 - ▣ Goede dalwaarden ~ mucosale genezing, betere outcome, minder hospitalisatie, meer QOL
 - ▣ Te hoog ~ toxiciteit (arthralgie, psoriatisch eczeem)

- Momenteel loopt de TAXIT trial:
 - ▣ Prospectieve studie
 - Behandelingsoptimalisatie op basis van dalspiegels 3-7 µg/ml versus standard of care.
 - Laatste bloedstalen worden verwacht april 2013

Besluit

50

- Op dit moment nog volop **in ontwikkeling**. In afwachting van RCT's en kosteneffectiviteitsdata nog niet routinematig aan te raden.
- TAXIT trial lopende.

51

Bottomline

Questions

52

1. Wat is de waarde van TPMT genotypering?
Rationeel, maar harde evidentie ontbreekt.
2. Is dosage van thiopurinemetabolieten in bloed aangewezen?
Recente studies trekken dit in twijfel. Mogelijk wel nuttig bij investigatie non-responders.
3. Is dosage van biologicals aangewezen?
De resultaten van RCTs moeten verder worden afgewacht.

Dank U voor uw aandacht.

