

Critically Appraised Topic
Therapeutic drug monitoring
for inflammatory bowel disease.

Author: Apr. Christophe Indevuyst
Supervisor: Prof. Dr. Pieter Vermeersch
Date: 8 april 2013

CLINICAL BOTTOM LINE

Voor de behandeling van inflammatoire bowel disease (voornamelijk de ziekte van Crohn en colitis ulcerosa) worden diverse geneesmiddelen gebruikt, waaronder aminosalicylaten, corticoiden, thiopurines en anti-TNF alfa antistoffen ('biologicals').

Diverse analyses zijn beschreven in verband met TDM voor deze aandoeningen waaronder TPMT fenotypering, meting van thiopurinemetabolieten en recent ook bepaling van infliximab dalsspiegels en neutraliserende antistoffen. In deze CAT wordt getracht een overzicht te geven van het nut van deze bepalingen.

Thiopurines hebben een complexe farmacologie door de variabele absorptie en verschillende metabolisaties die azathioprine en 6-mercaptopurine moeten ondergaan. Dit leidt tot een grote interindividuele variabiliteit.

Het nut van TPMT analyse alvorens thiopurines te starten blijft een onderwerp van discussie. Alhoewel de rationale logisch is: het verminderen van de kans op ernstige toxiciteit, is er onvoldoende harde evidentie die demonstreert dat deze strategie efficiënt is om 'harm' te verminderen, of superieur is aan de vaststaande klinische standaard van hematologische monitoring.

Een meta-analyse van verschillende retrospectieve en observationele studies toonde aan dat 6-TGN-concentraties boven 230-260 pmol/8*10⁸ RBCs geassocieerd waren met remissie. Analoog waren 6-MMP levels > 5700 geassocieerd met hepatotoxiciteit. Er was een slechte correlatie tussen dosis en 6-TGN levels, wat suggereert dat individueel metabolisme, meer dan dosis, belangrijk is voor de 6-TGN levels.

Recentere prospectieve gerandomiseerde trials betwisten echter de geldigheid van deze cutoffs voor efficaciteit en toxiciteit. Er kon geen cutoff gedefinieerd worden om patiënten in remissie te identificeren en zodus zijn dosisaanpassingen op basis hiervan ook niet mogelijk.

Ondanks deze tegenstrijdigheden worden aanbevelingen gepubliceerd voor het patiëntenmanagement op basis van deze waarden. Voornamelijk bij de investigatie naar therapiefalen lijken deze analyses nog toekomstmogelijkheden te vertonen.

Het meten van infliximab dalwaarden en anti-drug antistoffen is momenteel volop in ontwikkeling. Op dit moment, in afwezigheid van prospectieve gerandomiseerde trials en kosteneffectiviteitsdata kan dit nog niet routinematig aangeraden worden. De resultaten van de TAXIT trial worden nog afgewacht. Ook een standaardisatie van de verschillende assays dient in de toekomst bekeken te worden.

INHOUDSTAFEL

<i>Clinical bottom line</i>	1
<i>Inhoudstafel</i>	2
<i>Clinical/Diagnostic scenario</i>	3
I. Aanleiding tot deze CAT	3
II. Inleiding: thiopurine farmacologie	3
a) Toxicologie.....	3
b) Metabolisme.....	4
c) Werkingsmechanisme	5
d) Farmacogenetica	6
1) TPMT	6
2) Andere polymorfismen	7
<i>Question(s)</i>	8
<i>Search terms</i>	8
<i>Relevant evidence/References</i>	9
<i>Abbreviations</i>	16
<i>Appraisal</i>	17
I. Wat is de waarde van TPMT geno-/fenotypering?	17
a) Performantie van TPMT genotypering	17
b) Patiëntenmanagement op basis van TPMT	18
c) Associatie van TPMT status en thiopurine toxiciteit	19
1) Op basis van fenotypering.....	19
2) Op basis van genotypering	19
d) Conclusies.....	19
III. Dosage van thiopurine metabolieten in bloed.	21
a) Analytische aspecten	21
1) Literatuuronderzoek	21
2) Masterproef Katrien Hermans ^[38]	22
3) Recente literatuur	23
b) Klinische toepassingen van de dosage van thiopurine metabolieten.	24
IV. Is dosage van biologicals aangewezen?	28
<i>To do/Actions</i>	29
<i>Bijlagen</i>	30
Bijlage 1: Mediane 6-TGN levels bij patiënten in remissie en met actieve ziekte.....	30
Bijlage 2: Overzicht analysemethoden thiopurinemetabolieten.....	31
<i>References</i>	34

CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO**I. Aanleiding tot deze CAT**

De term inflammatoire darmziekten (Eng. 'Inflammatory bowel disease', IBD) omvat twee grote entiteiten: de ziekte van Crohn ('Crohn Disease', CD) en colitis ulcerosa (CU). Deze beide aandoeningen zijn verschillende pathologische en klinische entiteiten, waarvan de pathogenese nog steeds niet volledig opgehelderd is.

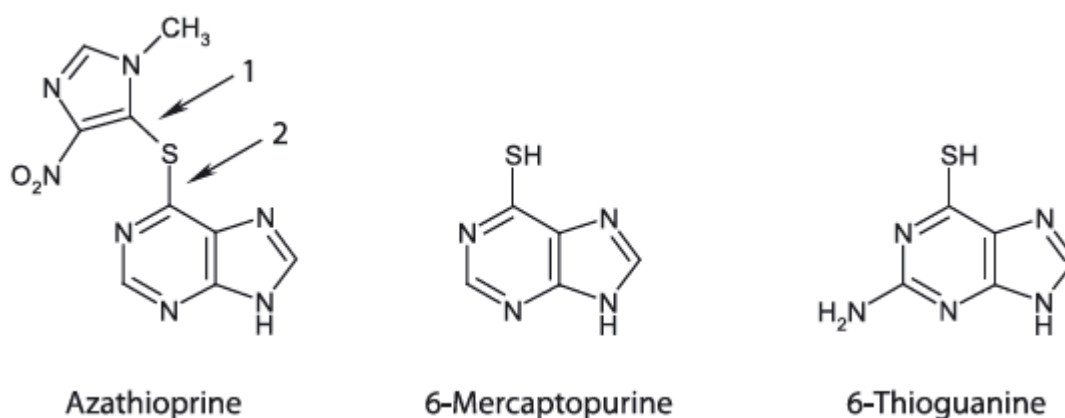
Voor de behandeling van deze aandoeningen wordt gebruik gemaakt van diverse geneesmiddelen waaronder thiopurines en anti-TNFalfa antistoffen.

Vanuit de kliniek is er vraag naar de analyse van thiopurinemetabolieten voor de opvolging van patiënten met deze aandoeningen. Ook worden momenteel aan een onderzoekslaboratorium van de KUL analyses in verband met anti-TNFalfa geneesmiddelen uitgevoerd voor de opvolging van deze patiënten.

Met deze CAT willen wij in de literatuur de beschikbare evidentie over TDM bij IBD patiënten nagaan en de technische mogelijkheden voor de analyse van deze stoffen in het eigen laboratorium onderzoeken.

II. Inleiding: thiopurine farmacologie**a) Toxicologie**

Immuunmodulatoire geneesmiddelen zoals azathioprine (AZA) en 6-mercaptopurine (6-MP) hebben een steroidsparend effect bij patiënten met steroiddependente en steroidrefractaire IBD. Alhoewel beiden in staat zijn om ziekteremissie te induceren en onderhouden, wordt hun gebruik beperkt door mogelijke toxiciteit.^[1]



Figuur 1: Chemische structuur van de thiopurines.^[2]

In IBD-patiënten behandeld met thiopurines moet tot 20% de behandeling staken tengevolge van adverse drug events (ADE) ^[2]. Deze kunnen onderverdeeld worden in dosis-afhankelijke, farmacologisch te verklaren reacties (type A) en daarnaast dosis-onafhankelijke, hypersensitiviteitsreacties (type B).

Type A reacties, welke zich vaak na verloop van tijd pas manifesteren, zijn voornamelijk geassocieerd met de vorming van toxische metabolieten. Typevoorbeelden hiervan zijn algemene malaise en nausea (11%), infectieuze complicaties (7.4%), hepatitis (0.3-1.3%) en beenmergonderdrukking (1.4-5%). Afhankelijk van de definitie en de voorschreven dosis loopt de frequentie van beenmergsuppressie zelfs op tot 11%^[2-6].

Type B reacties (2%) treden sneller op, vaak binnen de 2-4 weken na de start van de behandeling en deze resulteren in immuun-gemedieerde symptomen zoals koorts, rash en arthralgie. Pancreatitis, wat voorkomt met een frequentie van 1.4% tot 3.3%, is vermoedelijk een idiosyncratische reactie.^[2; 5; 7]

Alhoewel er verhoogde incidenties van maligniteiten worden gerapporteerd bij patiënten onder behandeling met thiopurines, lijkt dit niet het geval te zijn voor IBD-patiënten.^[2; 8; 9]

b) Metabolisme

Azathioprine noch 6-mercaptopurine bezitten intrinsieke activiteit, maar moeten uitgebreide metabolisatie ondergaan om hun therapeutisch effect te bekomen.

AZA is een pro-drug die snel en bijna volledig (88%) wordt omgezet in 6-MP en methylnitroimidazole door een niet-enzymatische reactie in de lever (breuksite I in Figuur 1). De resterende 12% wordt omgezet in hypoxanthine en methylnitrothioimidazole (breuksite II in Figuur 1).

Tengevolge van een onvolledige en variabele absorptie is de biologische beschikbaarheid van AZA 16-72%.^[10] Oraal toegediend is de startdosis van 2.5 mg/kg AZA equivalent aan 1,5 mg/kg MP. Dit is voornamelijk het gevolg van de uitgebreide metabolisatie van 6-MP tot 6-thiourinezuur door xanthine oxidase in de darm en de lever wanneer dit oraal wordt toegediend en het verschil in molecuulgewicht tussen beide geneesmiddelen.

De verdere (uitgebreide) metabolisatie is weergegeven in Figuur 2. Na intracellulaire uptake kan 6-MP op 3 verschillende wijzen gemetaboliseerd worden, waarvan 2 katabool (via xanthine oxidase, XO en via thiopurine S-methyltransferase, TPMT) en 1 anabool (hypoxanthine phosphoribosyl transferase, HPRT). De metabolisatie via HPRT leidt tot vorming van 6-TIMP, wat verder wordt omgezet in 6-TXMP en uiteindelijk in de verschillende 6-thioguaninenucleotiden 6-TGMP, 6-TGDP en 6-TGTP. Deze TGN hebben een halfleven van 5 dagen met ruime variabiliteit (3-13 dagen).^[2; 10; 11] Alternatief kan 6-TIMP ook gemetaboliseerd worden via TPMT tot de verschillende 6-methylthioinosinefosfaten (6-mercaptopurine ribonucleotiden, 6-MMP(R)).

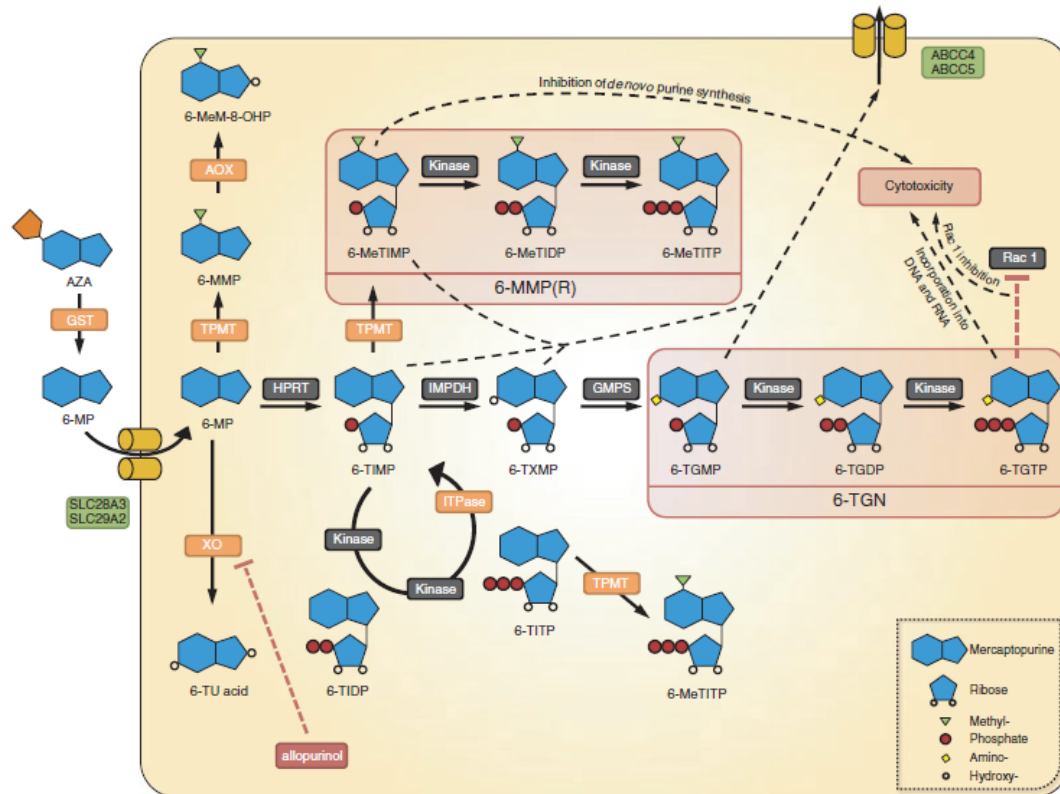


Figure 1 | Thiopurine metabolism. (i) Drugs and metabolites. AZA, azathioprine; 6-MP, mercaptopurine; 6-MMP, 6-methylmercaptopurine; 6-TU acid, 6-thiouric acid; 6-MeTIMP, 6-methylthioinosine monophosphate; 6-MeTIDP, 6-methylthioinosine diphosphate; 6-MeTITP, 6-methylthioinosine triphosphate; 6-TIMP, 6-thioinosine monophosphate; 6-TIDP, 6-thioinosine diphosphate; 6-TITP, 6-thioinosine triphosphate; 6-TXMP, 6-thioxanthosine monophosphate; 6-TGMP, 6-thioguanine monophosphate; 6-TGDP, 6-thioguanine diphosphate; 6-TGTP, 6-thioguanine triphosphate; 6-MeM-8-OHP, 6-methylmercapto-8-hydroxypurine. 6-MeTIMP, 6-MeTIDP and 6-MeTITP together form the 6-methylmercaptopurine ribonucleotides, 6-MMP(R). 6-TGMP, 6-TGDP and 6-TGTP together form the 6-thioguanine nucleotides, 6-TGN. (ii) Enzymes. GST, glutathione S-transferase; AOX, aldehyde oxidase; XO, xanthine oxidase; TPMT, thiopurine S-methyltransferase; HPRT, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase; IMPDH, inosine monophosphate dehydrogenase; GMPS, guanosine monophosphate synthetase; ITPase, inosine triphosphatase. (iii) Transporters. SLC28A3 and SLC29A2: solute carrier family, formerly nucleoside transporter; ABCC4 and ABCC5: ATP-binding cassette, formerly multidrug resistance-associated protein. Adapted with permission from Informa Healthcare: Stocco *et al.*¹⁹⁴

Figuur 2: Overzicht van thiopurine metabolisme, overgenomen uit Chouchana *et al.*^[12]

c) Werkingsmechanisme

De immunosuppressieve eigenschappen van de thiopurines zijn het gevolg van meerdere complexe werkingsmechanismen.

De 6-TGN hebben een structurele verwantschap met de endogene purine-base guanine. Deze worden geïncorporeerd in het DNA van WBC en leiden tot onderbreking van de DNA-streng met immuunsuppressie tot gevolg. Bovendien inhibeert 6-TGTP Rac1 door co-stimulatie van CD28, wat leidt tot T-cel apoptose. Dit mechanisme speelt een belangrijke rol in de werking van thiopurines bij IBD.

Ook de 6-MMPR dragen bij tot het antiproliferatief effect van de thiopurines, waarschijnlijk door inhibitie van de de novo purine synthese.^[13]

Ook AZA op zich heeft een supplementair immuunsupprimerend effect in vergelijking met 6-MP ten gevolge van het afgesplitste methylnitroimidazole. Het mechanisme hiervan is nog niet opgeklaard.^[14]

d) Farmacogenetica

De grote interindividuele verschillen in therapeutische respons en toxiciteit worden gedeeltelijk verklaard door de aanwezigheid van polymorfismen in diverse metaboliserende enzymen van thiopurines. Deze zijn TPMT, XO, HPRT en ITPA.

1) TPMT

Een van de meest bestudeerde polymorfismen is dat van thiopurine S-methyltransferase (TPMT, EC 2.1.1.67), alhoewel de biologische functie en endogene substraten van dit enzym niet gekend zijn. In thiopurine-behandelde patiënten bepaalt dit enzym de delicate balans tussen productie van 6-TGN en 6-MMPR.

De eerste studie naar TPMT activiteit door Weinshilboum en Sladek demonstreerde een trimodale distributie.^[15] In een cohorte van 298 willekeurig gekozen blanken had 89.6% een hoge activiteit, 11.1% een intermediaire activiteit en 0.3% had geen activiteit. In grotere studies werd bevestigd dat 0.5% een deficiënte TPMT activiteit heeft^[16; 17].

Het gen voor TPMT (34 kb) wordt gecodeerd op de korte arm van chromosoom 6 (6p22.3) en bevat 10 exons. De grote variabiliteit in activiteit wordt verklaard door de aanwezigheid van 'single nucleotide polymorphisms' (SNP's) in dit gen. Er wordt nog steeds onderzoek verricht naar dit enzym, waartoe zelfs een speciale TPMT allel website (<http://www.imh.liu.se/tpmtalleles>) werd opgericht. Op dit moment (maart 2013) zijn een 30-tal polymorfismen beschreven, goed voor 40 verschillende allelen^[18]. 3 hiervan (TPMT*1, TPMT*1A en TPMT*1S) hebben een normale functie, de andere allelen resulteren in een verminderde activiteit. Dit is vermoedelijk het gevolg van een versnelde degradatie van TPMT eiwitten. Zo hebben TPMT*2 en TPMT*3A slechts een halfleven van 15 minuten, terwijl dit van TPMT*1 (wild type) 18u bedraagt^[19].

TPMT activiteit kan bepaald worden door genotypering of fenotypering op RBC. Er is een goede correlatie tussen TPMT geno- en fenotype. Een recente meta-analyse^[20] toonde een sensitiviteit en specificiteit van genotypering voor het identificeren van patiënten met een lage en intermediaire TPMT activiteit van respectievelijk 70.33% en 86.15%. Bij discordanties moet men bedacht zijn voor patiënten die recentelijk (<3 maanden) een bloedtransfusie ondergingen. TPMT activiteit wordt gemeten op RBC en is niet betrouwbaar binnen deze periode.

De bovenvermelde trimodale distributie wordt verklaard doordat 89% van de bevolking homozygoot is voor het wild-type allel (TPMT^H), 11% is heterozygoot (TPMT^H/TPMT^L) en 1/300 heeft 2 mutante allelen (TPMT^L).

In een aantal gevallen zijn er discordanties tussen geno- en fenotype. Deze kunnen worden verklaard door de aanwezigheid van andere genabnormaliteiten in de niet-coderende gebieden van het gen. In de 5'-flankerende regio van het TPMT gen werd een 'variable number tandem repeat'-like nucleotide sequentie geïdentificeerd^[21]. Dit kan resulteren in een shift naar zowel hogere als lagere enzymactiviteit. Het belang van deze mutaties wordt echter als mineur ingeschat ten opzichte van de mutaties in coderende genregio's.

De distributie van de verschillende TPMT alleles verschilt significant tussen de verschillende ethnische populaties. In de Caucasische populatie is TPMT*3A het meest frequent (3.2-5.7%) gevolgd door TPMT*2 (0.2-0.5%) en TPMT*3C (0.8%). Deze 3 alleles zijn verantwoordelijk voor > 95% van alle

mutante alleles. In de Aziatische en Afrikaanse populatie is TPMT*3C het meest frequente mutante allel.^[2]

TPMT activiteit is hoger in kinderen dan in volwassenen, hoger bij mannen dan bij vrouwen en hoger in rokers dan niet-rokers. Daarnaast is er ook een toename van TPMT-activiteit gedurende de behandeling als gevolg van enzym-inductie. Er werd bovendien aangetoond dat co-medicatie zoals olsalazine, mesalazine en sulfasalazine, zowel in vitro als in vivo, in staat zijn TPMT te inhiberen^[22].

2) Andere polymorfismen

Naast TPMT vertonen nog andere enzymen polymorfismen.

Xanthine oxidase activiteit is voornamelijk hoog in de intestinale mucosa en lever, wat zorgt voor een substantiële reductie van de biologische beschikbaarheid van mercaptopurine. Er is een viervoudige inter-individuele variatie in de hepatische XO activiteit en wordt een subgroep vermoedt met lage XO-activiteit.

Over HPRT activiteit is slechts weinig gekend. Patiënten die lijden aan het zeldzame Lesch-Nyhan syndroom zijn deficiënt aan dit enzym. Thiopurines zijn niet cytotoxisch bij deze patiënten. Vermoedelijk liggen SNP's aan de basis van deze deficiëntie.

Ook inosinetrifosfaat pyrophosphatase deficiëntie is beschreven. Bij deze patiënten is er een asymptomatische opstapeling van het 6-thioinosinetrifosfaat.

Samengevat:

Thiopurines hebben een complexe farmacologie door de variabele absorptie en de verschillende metabolisaties die azathioprine en 6-mercaptopurine moeten ondergaan. Daarnaast zijn er verschillende polymorfismen in de diverse metaboliserende enzymen, wat bijdraagt aan de interindividuele variabiliteit.

QUESTION(S)

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

SEARCH TERMS

- PubMed: “Therapeutic drug monitoring , Thiopurine metabolites; Thiopurine methyltransferase; inflammatory bowel diseases; infliximab; adalimumab; 6-thioguanine; azathioprine; 6-TG; 6-MMP; thiopurine metabolites”
- MeSH Database (PubMed): MeSH term: “Inflammatory bowel diseases; ”
- UpToDate: thiopurines, inflammatory bowel disease

RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

Guidelines and recommendations

- Anstey AV, Wakelin S, Reynolds NJ. Guidelines for prescribing azathioprine in dermatology *Br J Dermatol* (2004) **151**: pp. 1123-1132.
- Carter MJ, Lobo AJ, Travis SPL. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults *Gut* (2004) **53 Suppl 5**: p. VI-16.
- Chakravarty K, McDonald H, Pullar T, Taggart A, Chalmers R, Oliver S, Mooney J, Somerville M, Bosworth A, Kennedy T, . Bsr/bhpr guideline for disease-modifying anti-rheumatic drug (dmard) therapy in consultation with the british association of dermatologists *Rheumatology (Oxford)* (2008) **47**: pp. 924-925.
- Dignass A, Van Assche G, Lindsay JO, Lémann M, Söderholm J, Colombel JF, Danese S, D'Hoore A, Gassull M, Gomollón F, Hommes DW, Michetti P, O'Morain C, Oresland T, Windsor A, Stange EF, Travis SPL. The second european evidence-based consensus on the diagnosis and management of crohn's disease: current management *J Crohns Colitis* (2010) **4**: pp. 28-62
Relling MV, Gardner EE, Sandborn WJ, Schmiegelow K, Pui C, Yee SW, Stein CM, Carrillo M, Evans WE, Klein TE. Clinical pharmacogenetics implementation consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing *Clin Pharmacol Ther* (2011) **89**: pp. 387-391.
- Travis SPL, Stange EF, Lémann M, Oresland T, Chowers Y, Forbes A, D'Haens G, Kitis G, Cortot A, Prantera C, Marteau P, Colombel J, Gionchetti P, Bouhnik Y, Turet E, Kroesen J, Starlinger M, Mortensen NJ. European evidence based consensus on the diagnosis and management of crohn's disease: current management *Gut* (2006) **55 Suppl 1**: p. i16-35

Systematic Reviews & Meta-analyses

- Armstrong VW, Shipkova M, von Ahsen N & Oellerich M. Analytic aspects of monitoring therapy with thiopurine medications *Ther Drug Monit* (2004) **26**: pp. 220-226.
- Booth RA, Ansari MT, Loit E, Tricco AC, Weeks L, Doucette S, Skidmore B, Sears M, Sy R & Karsh J. Assessment of thiopurine s-methyltransferase activity in patients prescribed thiopurines: a systematic review *Ann Intern Med* (2011) **154**: p. 814-23, W-295-8.
- Osterman MT, Kundu R, Lichtenstein GR & Lewis JD. Association of 6-thioguanine nucleotide levels and inflammatory bowel disease activity: a meta-analysis *Gastroenterology* (2006) **130**: pp. 1047-1053.
- Pearson DC, May GR, Fick GH & Sutherland LR. Azathioprine and 6-mercaptopurine in crohn disease. a meta-analysis *Ann Intern Med* (1995) **123**: pp. 132-142.

Review

- Banerjee S & Bishop WP. Evolution of thiopurine use in pediatric inflammatory bowel disease in an academic center *J Pediatr Gastroenterol Nutr* (2006) **43**: pp. 324-330.

- Chouchana L, Narjoz C, Beaune P, Lorient M & Roblin X. Review article: the benefits of pharmacogenetics for improving thiopurine therapy in inflammatory bowel disease *Aliment Pharmacol Ther* (2012) 35: pp. 15-36.
- Connell WR, Kamm MA, Ritchie JK & Lennard-Jones JE. Bone marrow toxicity caused by azathioprine in inflammatory bowel disease: 27 years of experience *Gut* (1993) 34: pp. 1081-1085.
- Derijks LJJ, Gilissen LPL, Hooymans PM & Hommes DW. Review article: thiopurines in inflammatory bowel disease *Aliment Pharmacol Ther* (2006) 24: pp. 715-729.
- Dewit O. Usefulness of thiopurine methyltransferase and thiopurine metabolite analysis in clinical practice in patients with inflammatory bowel diseases *Acta Gastroenterol Belg* (2010) 73: pp. 331-335.
- Ordás I, Eckmann L, Talamini M, Baumgart DC & Sandborn WJ. Ulcerative colitis *Lancet* (2012) 380: pp. 1606-1619.
- Seidman EG. Clinical use and practical application of tpmt enzyme and 6-mercaptopurine metabolite monitoring in ibd *Rev Gastroenterol Disord* (2003) 3 Suppl 1: p. S30-8.
- **Original Articles**
- Achkar J, Stevens T, Easley K, Brzezinski A, Seidner D & Lashner B. Indicators of clinical response to treatment with six-mercaptopurine or azathioprine in patients with inflammatory bowel disease *Inflamm Bowel Dis* (2004) 10: pp. 339-345.
- Ansari A, Arenas M, Greenfield SM, Morris D, Lindsay J, Gilshenan K, Smith M, Lewis C, Marinaki A, Duley J & Sanderson J. Prospective evaluation of the pharmacogenetics of azathioprine in the treatment of inflammatory bowel disease *Aliment Pharmacol Ther* (2008) 28: pp. 973-983.
- Appell ML, Berg J, Duley J, Evans WE, Kennedy MA, Lennard L, Marinaki T, McLeod HL, Relling MV, Schaeffeler E, Schwab M, Weinshilboum R, Yeoh AEJ, McDonagh EM, Hebert JM, Klein TE & Coulthard SA. Nomenclature for alleles of the thiopurine methyltransferase gene *Pharmacogenet Genomics* (2013) 23: pp. 242-248
- Baumgart DC & Sandborn WJ. Crohn's disease *Lancet* (2012) 380: pp. 1590-1605..
- Belaiche J, Desager JP, Horsmans Y & Louis E. Therapeutic drug monitoring of azathioprine and 6-mercaptopurine metabolites in crohn disease *Scand J Gastroenterol* (2001) 36: pp. 71-76.
- Benkov K, Lu Y, Patel A, Rahhal R, Russell G, Teitelbaum J. Role of thiopurine metabolite testing and thiopurine methyltransferase determination in pediatric ibd *J Pediatr Gastroenterol Nutr* (2013) 56: pp. 333-340.
- Cangemi G, Barabino A, Barco S, Parodi A, Arrigo S & Melioli G. A validated hplc method for the monitoring of thiopurine metabolites in whole blood in paediatric patients with inflammatory bowel disease *Int J Immunopathol Pharmacol* (2012) 25: pp. 435-444.

- Connell WR, Kamm MA, Dickson M, Balkwill AM, Ritchie JK & Lennard-Jones JE. Long-term neoplasia risk after azathioprine treatment in inflammatory bowel disease *Lancet* (1994) 343: pp. 1249-1252.
- Crawford DJ, Maddocks JL, Jones DN & Szawlowski P. Rational design of novel immunosuppressive drugs: analogues of azathioprine lacking the 6-mercaptopurine substituent retain or have enhanced immunosuppressive effects *J Med Chem* (1996) 39: pp. 2690-2695.
- Cuffari C, Théorêt Y, Latour S & Seidman G. 6-mercaptopurine metabolism in crohn's disease: correlation with efficacy and toxicity *Gut* (1996) 39: pp. 401-406.
- Dervieux T & Boulieu R. Simultaneous determination of 6-thioguanine and methyl 6-mercaptopurine nucleotides of azathioprine in red blood cells by hplc *Clin Chem* (1998) 44: pp. 551-555.
- Dervieux T, Blanco JG, Krynetski EY, Vanin EF, Roussel MF & Relling MV. Differing contribution of thiopurine methyltransferase to mercaptopurine versus thioguanine effects in human leukemic cells *Cancer Res* (2001) 61: pp. 5810-5816.
- Dervieux T, Meyer G, Barham R, Matsutani M, Barry M, Boulieu R, Neri B & Seidman E. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of erythrocyte thiopurine nucleotides and effect of thiopurine methyltransferase gene variants on these metabolites in patients receiving azathioprine/6-mercaptopurine therapy *Clin Chem* (2005) 51: pp. 2074-2084.
- Dubinsky MC, Lamothe S, Yang HY, Targan SR, Sinnett D, Théorêt Y & Seidman EG. Pharmacogenomics and metabolite measurement for 6-mercaptopurine therapy in inflammatory bowel disease *Gastroenterology* (2000) 118: pp. 705-713.
- Erdmann GR, France LA, Bostrom BC & Canafax DM. A reversed phase high performance liquid chromatography approach in determining total red blood cell concentrations of 6-thioguanine, 6-mercaptopurine, methylthioguanine, and methylmercaptopurine in a patient receiving thiopurine therapy *Biomed Chromatogr* (1990) 4: pp. 47-51.
- Friedman AB, Sparrow MP & Gibson PR. Why thiopurine metabolites are relevant *Aliment Pharmacol Ther* (2012) 35: p. 400-1; author reply 401-2.
- Gilissen LPL, Wong DR, Engels LGJB, Bierau J, Bakker JA, Paulussen ADC, Romberg-Camps MJ, Stronkhorst A, Bus P, Bos LP, Hooymans PM, Stockbrügger RW, Neef C & Masclee AAM. Therapeutic drug monitoring of thiopurine metabolites in adult thiopurine tolerant ibd patients on maintenance therapy. *J Crohns Colitis* (2012) 6: pp. 698-707.
- Gisbert JP, González-Lama Y & Maté J. [monitoring of thiopurine methyltransferase and thiopurine metabolites to optimize azathioprine therapy in inflammatory bowel disease] *Gastroenterol Hepatol* (2006) 29: pp. 568-583.
- Gisbert JP, Gomollón F, Cara C, Luna M, González-Lama Y, Pajares JM, Maté J & Guijarro LG. Thiopurine methyltransferase activity in spain: a study of 14,545 patients *Dig Dis Sci* (2007) 52: pp. 1262-1269.

- Goldenberg BA, Rawsthorne P & Bernstein CN. The utility of 6-thioguanine metabolite levels in managing patients with inflammatory bowel disease *Am J Gastroenterol* (2004) 99: pp. 1744-1748.
- González-Lama Y, Bermejo F, López-Sanromán A, García-Sánchez V, Esteve M, Cabriada JL, McNicholl AG, Pajares R, Casellas F, Merino O, Carpio D, Vera MI, Muñoz C, Calvo M, Benito LM, Bujanda L, García-Fernández FJ, Ricart E, Ginard D, Velasco M, Carneros JA, Manceñido N, Calvo M, Algaba A, Froilan C, Cara C, Maté J, Abreu L, Gisbert JP. Thiopurine methyltransferase activity and azathioprine metabolite concentrations do not predict clinical outcome in thiopurine-treated inflammatory bowel disease patients *Aliment Pharmacol Ther* (2011) 34: pp. 544-554.
- Haines ML, Ajlouni Y, Irving PM, Sparrow MP, Rose R, Garry RB & Gibson PR. Clinical usefulness of therapeutic drug monitoring of thiopurines in patients with inadequately controlled inflammatory bowel disease *Inflamm Bowel Dis* (2011) 17: pp. 1301-1307.
- Hanai H, Iida T, Takeuchi K, Arai O, Watanabe F, Abe J, Maruyama Y, Oohata A, Ikeya K, Kageoka M, Miwa I, Yoshirou S, Hosoda Y & Kubota T. Thiopurine maintenance therapy for ulcerative colitis: the clinical significance of monitoring 6-thioguanine nucleotide *Inflamm Bowel Dis* (2010) 16: pp. 1376-1381.
- Higgs JE, Payne K, Roberts C & Newman WG. Are patients with intermediate tpmt activity at increased risk of myelosuppression when taking thiopurine medications? *Pharmacogenomics* (2010) 11: pp. 177-188.
- Hindorf U, Lindqvist M, Peterson C, Söderkvist P, Ström M, Hjortswang H, Pousette & Almer S. Pharmacogenetics during standardised initiation of thiopurine treatment in inflammatory bowel disease *Gut* (2006) 55: pp. 1423-1431.
- Hofmann U, Heinkele G, Angelberger S, Schaeffeler E, Lichtenberger C, Jaeger S, Reinisch W & Schwab M. Simultaneous quantification of eleven thiopurine nucleotides by liquid chromatography-tandem mass spectrometry *Anal Chem* (2012) 84: pp. 1294-1301.
- Jharap B, Seinen ML, de Boer NKH, van Ginkel JR, Linskens RK, Kneppelhout JC, Mulder CJJ & van Bodegraven AA. Thiopurine therapy in inflammatory bowel disease patients: analyses of two 8-year intercept cohorts *Inflamm Bowel Dis* (2010) 16: pp. 1541-1549
- Kappelman MD, Rifas-Shiman SL, Kleinman K, Ollendorf D, Bousvaros A, Grand RJ & Finkelstein JA. The prevalence and geographic distribution of crohn's disease and ulcerative colitis in the united states *Clin Gastroenterol Hepatol* (2007) 5: pp. 1424-1429.
- Karner S, Shi S, Fischer C, Schaeffeler E, Neurath MF, Herrlinger KR, Hofmann U & Schwab M. Determination of 6-thioguanosine diphosphate and triphosphate and nucleoside diphosphate kinase activity in erythrocytes: novel targets for thiopurine therapy? *Ther Drug Monit* (2010) 32: pp. 119-128
- Kennedy NA, Asser TL, Mountfield RE, Doogue MP, Andrews JM & Bampton PA. Thiopurine metabolite measurement leads to changes in management of inflammatory bowel disease *Intern Med J* (2013) 43: pp. 278-286.

- Kennedy NA, Asser TL, Mountfield RE, Doogue MP, Andrews JM & Bampton PA. Thiopurine metabolite measurement leads to changes in management of inflammatory bowel disease *Intern Med J* (2013) 43: pp. 278-286.
- Keuzenkamp-Jansen CW, De Abreu RA, Bökkerink JP & Trijbels JM. Determination of extracellular and intracellular thiopurines and methylthiopurines by high-performance liquid chromatography *J Chromatogr B Biomed Appl* (1995) 672: pp. 53-61.
- Lavi LE & Holcenberg JS. A rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic assay for 6-mercaptopurine metabolites in red blood cells *Anal Biochem* (1985) 144: pp. 514-521.
- Lennard L & Singleton HJ. High-performance liquid chromatographic assay of the methyl and nucleotide metabolites of 6-mercaptopurine: quantitation of red blood cell 6-thioguanine nucleotide, 6-thioinosinic acid and 6-methylmercaptopurine metabolites in a single sample *J Chromatogr* (1992) 583: pp. 83-90.
- Lennard L & Lilleyman JS. Individualizing therapy with 6-mercaptopurine and 6-thioguanine related to the thiopurine methyltransferase genetic polymorphism *Ther Drug Monit* (1996) 18: pp. 328-334.
- Lewis LD, Benin A, Szumlanski CL, Otterness DM, Lennard L, Weinshilboum RM & Nierenberg DW. Olsalazine and 6-mercaptopurine-related bone marrow suppression: a possible drug-drug interaction *Clin Pharmacol Ther* (1997) 62: pp. 464-475.
- Lewis JD, Schwartz JS & Lichtenstein GR. Azathioprine for maintenance of remission in crohn's disease: benefits outweigh the risk of lymphoma *Gastroenterology* (2000) 118: pp. 1018-1024.
- Neurath MF, Kiesslich R, Teichgräber U, Fischer C, Hofmann U, Eichelbaum M, Galle PR & Schwab M. 6-thioguanosine diphosphate and triphosphate levels in red blood cells and response to azathioprine therapy in crohn's disease *Clin Gastroenterol Hepatol* (2005) 3: pp. 1007-1014.
- Newman WG, Payne K, Tricker K, Roberts SA, Fargher E, Pushpakom S, Alder JE, Sidgwick GP, Payne D, Elliott RA, Heise M, Elles R, Ramsden SC, Andrews J, Houston JB, Qasim F, Shaffer J, Griffiths CEM, Ray DW, Bruce I, Ollier WER. A pragmatic randomized controlled trial of thiopurine methyltransferase genotyping prior to azathioprine treatment: the target study. *Pharmacogenomics* (2011) 12: pp. 815-826.
- Nguyen T, Vu DH, Nguyen T, Lachaux A & Bouliou R. Relationship between azathioprine dosage and thiopurine metabolites in pediatric ibd patients: identification of covariables using multilevel analysis *Ther Drug Monit* (2013) 35: pp. 251-257.
- Pike MG, Franklin CL, Mays DC, Lipsky JJ, Lowry PW & Sandborn WJ. Improved methods for determining the concentration of 6-thioguanine nucleotides and 6-methylmercaptopurine nucleotides in blood *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* (2001) 757: pp. 1-9.
- Present DH, Meltzer SJ, Krumholz MP, Wolke A & Korelitz BI. 6-mercaptopurine in the management of inflammatory bowel disease: short- and long-term toxicity *Ann Intern Med* (1989) 111: pp. 641-649.

- Reinshagen M, Schütz E, Armstrong VW, Behrens C, von Tirpitz C, Stallmach A, Herfarth H, Stein J, Bias P, Adler G, Shipkova M, Kruis W, Oellerich M & von Ahsen N. 6-thioguanine nucleotide-adapted azathioprine therapy does not lead to higher remission rates than standard therapy in chronic active crohn disease: results from a randomized, controlled, open trial. *Clin Chem* (2007) 53: pp. 1306-1314.
- Roblin X, Oussalah A, Chevaux J, Sparrow M & Peyrin-Biroulet L. Use of thiopurine testing in the management of inflammatory bowel diseases in clinical practice: a worldwide survey of experts *Inflamm Bowel Dis* (2011) 17: pp. 2480-2487.
- Sandborn W, Sutherland L, Pearson D, May G, Modigliani R & Prantera C. Azathioprine or 6-mercaptopurine for inducing remission of crohn's disease *Cochrane Database Syst Rev* (2000) : p. CD000545.
- Sanderson J, Ansari A, Marinaki T & Duley J. Thiopurine methyltransferase: should it be measured before commencing thiopurine drug therapy? *Ann Clin Biochem* (2004) 41: pp. 294-302.
- Schaeffeler E, Fischer C, Brockmeier D, Wernet D, Moerike K, Eichelbaum M, Zanger UM & Schwab M. Comprehensive analysis of thiopurine s-methyltransferase phenotype-genotype correlation in a large population of german-caucasians and identification of novel tpmt variants *Pharmacogenetics* (2004) 14: pp. 407-417.
- Schwab M & Klotz U. Pharmacokinetic considerations in the treatment of inflammatory bowel disease *Clin Pharmacokinet* (2001) 40: pp. 723-751. Shipkova M, Armstrong VW, Wieland E & Oellerich M. Differences in nucleotide hydrolysis contribute to the differences between erythrocyte 6-thioguanine nucleotide concentrations determined by two widely used methods *Clin Chem* (2003) 49: pp. 260-268.
- Stefan C, Walsh W, Banka T, Adeli K & Verjee Z. Improved hplc methodology for monitoring thiopurine metabolites in patients on thiopurine therapy *Clin Biochem* (2004) 37: pp. 764-771.
- Szumlanski C, Otterness D, Her C, Lee D, Brandriff B, Kellsell D, Spurr N, Lennard L, Wieben E & Weinshilboum R. Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: human gene cloning and characterization of a common polymorphism *DNA Cell Biol* (1996) 15: pp. 17-30.
- Tai HL, Krynetski EY, Schuetz EG, Yanishevski Y & Evans WE. Enhanced proteolysis of thiopurine s-methyltransferase (tpmt) encoded by mutant alleles in humans (tpmt*3a, tpmt*2): mechanisms for the genetic polymorphism of tpmt activity *Proc Natl Acad Sci U S A* (1997) 94: pp. 6444-6449.
- Vermeire S & Gils A. Value of drug level testing and antibody assays in optimizing biological therapy *Frontline Gastroenterol* (2013) 4: pp. 41-43.
- Vikingsson S, Almer S, Peterson C, Carlsson B & Josefsson M. Monitoring of thiopurine metabolites - a high-performance liquid chromatography method for clinical use *J Pharm Biomed Anal* (2013) 75: pp. 145-152.

- Weinshilboum RM & Sladek SL. Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity *Am J Hum Genet* (1980) 32: pp. 651-662.
- Winter J, Walker A, Shapiro D, Gaffney D, Spooner RJ & Mills PR. Cost-effectiveness of thiopurine methyltransferase genotype screening in patients about to commence azathioprine therapy for treatment of inflammatory bowel disease *Aliment Pharmacol Ther* (2004) 20: pp. 593-599.
- de Jong DJ, Derijks LJJ, Naber AHJ, Hooymans PM & Mulder CJJ. Safety of thiopurines in the treatment of inflammatory bowel disease *Scand J Gastroenterol Suppl* (2003) : pp. 69-72.
- van Egmond R, Chin P, Zhang M, Sies CW & Barclay ML. High tpmt enzyme activity does not explain drug resistance due to preferential 6-methylmercaptopurine production in patients on thiopurine treatment *Aliment Pharmacol Ther* (2012) 35: pp. 1181-1189.

Reference Works, Handbooks and Databases

- A-Rahim YI & Farrell RJ. Azathioprine and 6-mercaptopurine in inflammatory bowel disease. *UpToDate* 21.1. (2013)
- Farrell RJ & Peppercorn MA. Overview of the medical management of mild to moderate crohn's disease in adults. *UpToDate* 21.2. (2013)
- Hermans K. Bepaling van 6-tg en 6-mmp in volbloed. Katholieke Universiteit Leuven. 2012.
- Peppercorn MA & Farrell RJ. Management of severe ulcerative colitis. *UpToDate* 21.2. (2013)

Thesis

- Bakker JA. Metabolic and genetic aspects of thiopurine metabolism. Universiteit Maastricht.2010.

Posters, “grey literature”, presentations

- Prometheus L. Imuran (azathioprine) tablets prescribing information (2011).

ABBREVIATIONS

6-MMP(R)	6-methylmercaptapurine (ribonucleotiden)
6-MP	6-mercaptapurine
6-TG	6-thioguanine
6-TGN	6-thioguaninenucleotiden
6-TUA	6-thiourinezuur.
ADA	Anti-Drug Antibodies
AZA	Azathioprine
CD	Crohn Disease (Ziekte van Crohn)
CU	Colitis Ulcerosa
ECCO	European Crohn's and colitis organization
HPLC	High Pressure/Performance Liquid Chromatography
HPRT	Hypoxanthine phosphoribosyl transferase
IBD	Inflammatory Bowel Disease
IFX	Infliximab (Remicade®)
LC-MS/MS	Liquid chromatography – mass spectrometry/mass spectrometry
PO	Per os, oraal
RCT	Randomized controlled trial
TDM	Therapeutic drug monitoring
TL	Through Level, dalwaarde
TLI	Through level infliximab
XO	Xanthine Oxidase

APPRAISAL

I. Wat is de waarde van TPMT geno-/fenotypering?

TPMT typering is een onderwerp van debat. In de samenvatting van de kenmerken van het product (SKP, de 'wetenschappelijke' bijsluiter) van de FDA wordt aangeraden typering uit te voeren: "TPMT testing: it is recommended that consideration be given to either genotype or phenotype patients for TPMT". Ook werd dit in maart 2011 in de eerste guidelines voor thiopurine startdosis, opgesteld door de Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium van de U.S. National Institute of Health^[23], opgenomen.

De Europese "evidence based consensus" gepubliceerd in 2006 stelt daarentegen: "It cannot yet be recommended as a pre-requisite to therapy, as decades of experience has shown AZA to be safe in clinical practice".^[24] In de meest recente guidelines van ECCO (2010), de European Crohn's and Colitis Organisation, wordt ook geen woord gerept over TPMT geno- of fenotypering^[25].

De onderzoeksgroep van Ronald Booth publiceerde in juni 2011 een systematische review^[20] over het assessment van thiopurine S-methyltransferase activiteit in patiënten die worden behandeld met thiopurines. Deze systematische review zocht een antwoord op 3 volgende vragen:

1. Wat is de specificiteit en gevoeligheid van TPMT genotypering als vervanging van fenotypering?
2. Leidt het voorafgaand testen van de TPMT status tot veranderingen in het patiëntenmanagement en een vermindering in 'harm'?
3. Wat is de evidentie voor een associatie tussen TPMT status en thiopurine toxiciteit?

Deze systematische review fungeert als belangrijkste basis voor onderstaande bespreking.

a) Performantie van TPMT genotypering

TPMT fenotypering geldt als de gouden standaard voor het bepalen van de enzymactiviteit. Hierbij wordt 6-MP toegevoegd aan een RBC lysaat. Na 1h incubatie wordt vervolgens de productie van 6-MMP gemeten. Naast de fenotypering kan ook genotypering worden uitgevoerd om mutante allelen op te sporen.

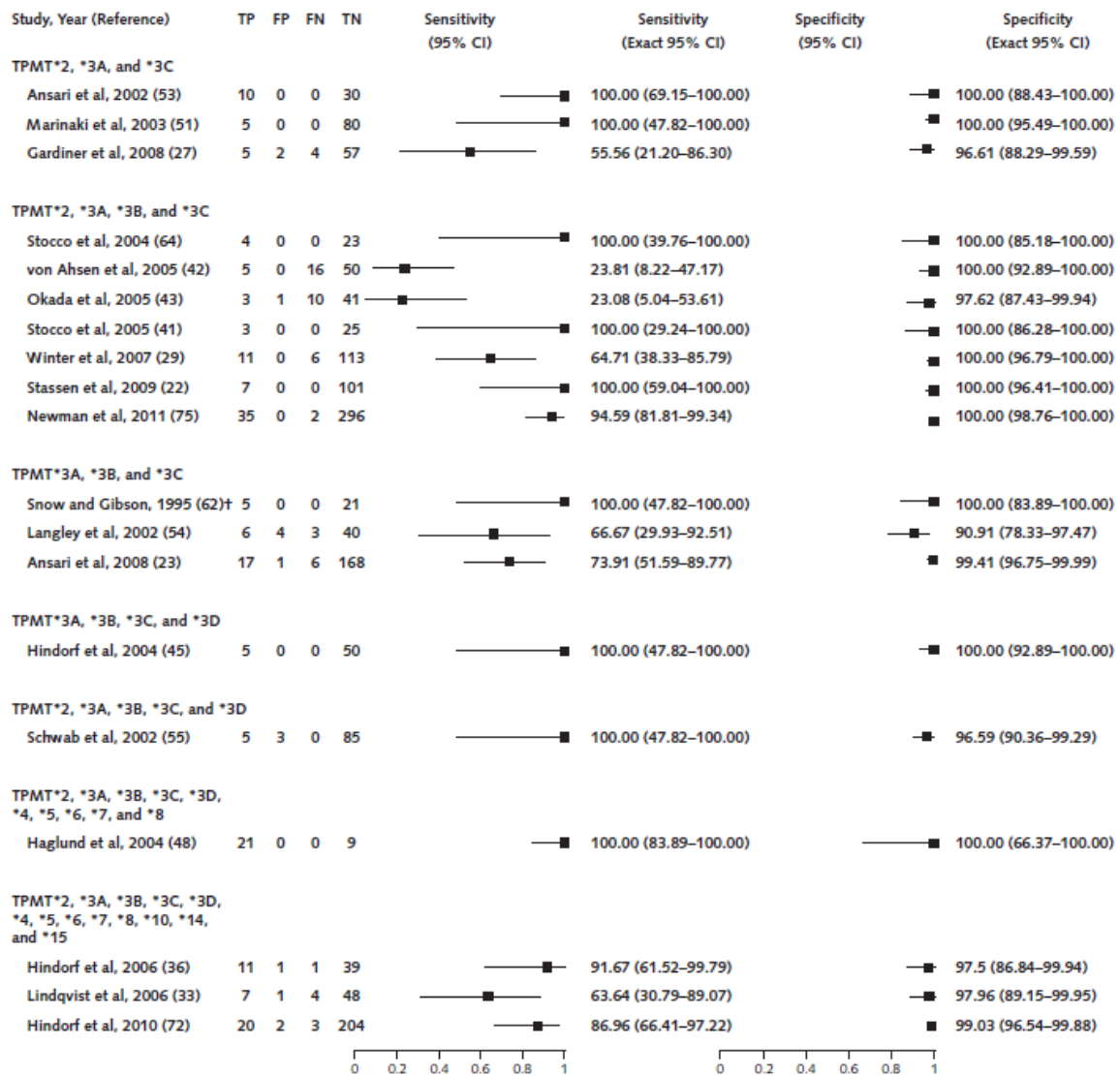
De performantie van TPMT genotypering voor het identificeren van patiënten met verlaagde of afwezige TPMT activiteit werd geanalyseerd op basis van 19 studies, voornamelijk cross-sectionele en prospectieve observationele studies.

De sensitiviteit van genotypering ten opzichte van fenotypering was imprecies en varieerde tussen 70.33% en 86.15%. Een meta-analyse die zich beperkte tot die studies die alle etniciteit-specifieke mutaties met een prevalentie van > 1% evalueerde gaf een gepoolde sensitiviteit van 79,9%. (Figuur 3).

Van de 1735 geïncludeerde patiënten in deze 19 studies waren er slechts 4 heterozygoot die een lage tot afwezige enzymactiviteit hadden.

De specificiteit van het wild-type genotype voor het correct identificeren van patiënten met normale of hoge enzymactiviteit benaderde 100%.

Figure 3. Forest plot of the sensitivity of carrier genotype (heterozygous or homozygous) for correctly identifying patients with subnormal (Intermediate or low) enzymatic activity.



FN = false negative; FP = false positive; TN = true negative; TP = true positive; TPMT = thiopurine S-methyltransferase.

† Tested alleles were not reported, so those we assumed most likely to have been tested in 1993 (when the study was conducted) are reported.

Figuur 3: Forest plot van de sensitiviteit van het carrier genotype voor het identificeren van patiënten met subnormale enzymactiviteit.^[20]

b) Patiëntenmanagement op basis van TPMT.

Slechts 1 RCT^[26] en 1 retrospectieve cohort studie^[27] (van eerder slechte kwaliteit) bevatten evidentie over deze vraag.

De trial werd vroegtijdig beëindigd omdat klinici niet bereid waren patiënten op azathioprine therapie te starten zonder voorafgaande TPMT genotypering. In totaal waren er 298 noncarriers, 34 heterozygoten en 1 homozygote patiënt. Deze RCT was underpowered om klinische events te detecteren. Wegens het kleine aantal events waren er geen verschillen in outcome van neutropenie en pancreatitis, terwijl er grotere odds waren voor het ontwikkelen van hepatitis in de groep die voorafgaand TPMT genotypering kreeg.

Ook de observationele studie was underpowered voor het detecteren van significante verschillen in hepatotoxiciteit en leukopenie.

c) Associatie van TPMT status en thiopurine toxiciteit

1) Op basis van fenotypering

17 studies waren geschikt voor inclusie, maar 24% werd beoordeeld als 'poor-quality' en de overigen als 'fair quality'. 90% van de studies waren onderling slecht vergelijkbaar op vlak van prognostische factoren, outcome-assessment en de geno- en/of fenotypering kon niet duidelijk worden afgeleid. In totaal handelen deze studies over 2211 patiënten waarvan 357 met intermediaire en 74 met lage enzymactiviteit.

De odds voor myelotoxiciteit waren hoger bij lage TPMT enzymactiviteit dan voor intermediaire activiteit (OR 14.53) of normale activiteit (OR 19.12). De odds voor leukopenie waren eveneens groter bij lage activiteit dan bij intermediair (OR 2.74) of normale activiteit (OR 2.56). Er was geen evidentie voor een verschil in sterfte, hospitalisatie, ernstige adverse events of levenskwaliteit.

2) Op basis van genotypering

31 van de 34 studies die in aanmerking komen droegen bij tot de kwantitatieve meta-analyse. Van de 3638 patiënten waren er 260 heterozygoot en 19 waren homozygoot voor variante allelen. De meeste studies hadden een kwaliteit die werd beoordeeld als 'fair' en includeerden patiënten met IBD.

In vergelijking met niet-carriers hadden heterozygoten een gepoolde odds voor leukopenie van 4.29. Een meta-analyse van 5 studies die 7 homozygoten vergeleek met 475 noncarriers toonde een grotere, maar erg imprecieze odds voor leukopenie van 20.84 (CI 3.42-126.89).

Er waren ook significant meer terugtrekkingen uit de studie omwille van toxiciteit bij heterozygote patiënten dan bij noncarriers (OR 6.54).

d) Conclusies

Er is momenteel onvoldoende primair onderzoek van goede kwaliteit. Onderzoek van mindere kwaliteit toont aan dat de schatting van de sensitiviteit van genotypering erg imprecies is, terwijl de specificiteit quasi perfect is voor het identificeren van subnormale enzymactiviteit. Er is momenteel onvoldoende bewijs voor het testen van TPMT vooraleer thiopurine therapie te starten in vergelijking met het routinematig opvolgen van de celtellingen.

De beschikbare evidentie voor de associatie van thiopurine toxiciteit met TPMT status is beperkt door een laag aantal heterozygoten, slechts occasionele homozygoten en een laag aantal events in de studiebevolking. De studieresultaten ontbreken kracht om een significante associatie tussen TPMT status en thiopurine toxiciteit aan te tonen^[20].

Verschillende guidelines, zoals van de dermatologische^[28] en reumatologische beroepsverenigingen^[29], raden analyse van de TPMT status aan alvorens therapie op te starten. Ook de FDA-goedgekeurde productmonografie^[30] raadt voorafgaand testen aan. De richtlijnen van ECCO^[24] daarentegen spreken helemaal niet over TPMT testing en de richtlijnen van British Society of Gastroenterology van 2004^[31] stellen: "it cannot yet be recommended as prerequisite to therapy, because decades of experience has shown clinical azathioprine to be safe in ulcerative colitis or Crohn disease".

Alhoewel de rationale voor het testen van TPMT, vooraleer een behandeling te starten, logisch lijkt, is deze, vanuit een evidence-based perspectief, prematuur.

- Er is geen directe evidentie voor deze praktijk, voornamelijk dat initiële testing de myelotoxiciteit-gerelateerde mortaliteit vermindert.
- Regelmatige hematologische monitoring is zoiezo vereist.
- Er is jarenlange ervaring met AZA en 6-MP, vooraleer TPMT testing bestond en er is grote variatie in de huidige praktijk.
- Thiopurine-toxiciteit wordt niet enkel door TPMT gecontroleerd, maar wordt ook verklaard door mutaties in andere enzymen, geneesmiddeleninteracties, infecties en immunologisch gemedieerde geneesmiddeleninteracties.
- De lage prevalentie van homozygoten betekent dat vele studies underpowered zijn om een effect aan te tonen in de populatie die het meest at-risk is.
- Het gebruik van de TPMT-status vooraleer het instellen van therapie heeft het potentieel om de effectiviteit van thiopurines te reduceren doordat lagere dosissen gebruikt worden.

Uit een wereldwijde survey^[32] bleek dat minder dan de helft van de specialisten gebruik maakt van deze technieken. De belangrijkste determinant was de beschikbaarheid ervan en de terugbetaling door de ziekteverzekering. In UZ Leuven wordt de TPMT genotypering uitgevoerd door het centrum menselijke erfelijkheid. 3 polymorfismen worden opgespoord door directe sequentieanalyse: G238C (exon 5), G460A (exon 7), A719G (exon 10). Deze zijn verantwoordelijk voor > 95% van de TPMT mutaties in de Caucasiche bevolking. De TAT van deze test bedraagt 2-3 weken. In UZ Leuven wordt sinds 4-5 jaar (mogelijk langer) systematisch deze genotypering uitgevoerd bij alle patiënten waarbij gepland wordt om Imuran te zullen opstarten. Wanneer iemand bij diagnose reeds ernstig ziek is, wordt de test onmiddellijk afgenomen. De resultaten worden afgewacht vooraleer Imuran op te starten. Deze test is in België ook terugbetaald.

Samengevat

Het nut van TPMT analyse alvorens het starten van thiopurines blijft een onderwerp van discussie. Alhoewel de rationale voor het testen logisch lijkt: het verminderen van de kans op ernstige toxiciteit, is er onvoldoende harde evidentie die demonstreert dat deze strategie efficiënt is om 'harm' te verminderen of dat deze superieur is aan de vaststaande klinische standaard van hematologische monitoring.

De uiteenlopende meningen in de literatuur uiten zich in het feit dat minder dan de helft van de clinici deze test gebruikt, voornamelijk omdat deze ofwel niet beschikbaar ofwel niet terugbetaald is. In UZ Leuven wordt de test systematisch uitgevoerd om toxiciteit te voorkomen.

III. Dosage van thiopurine metabolieten in bloed.

a) Analytische aspecten

1) Literatuuronderzoek

In de literatuur zijn verschillende methoden voor dosage van thiopurinemetabolieten beschreven. De eerste methoden maakten gebruik van HPLC met UV-detectie^[33; 34], latere publicaties maakten gebruik van HPLC-MS/MS^[35; 36]. Een overzicht van de verschillende analysemethoden is gegeven in Tabel 3, Bijlage 3:

De meeste methoden maken gebruik van een analyse op gewassen rode bloedcellen. Deze vormen een surrogaat voor meting in de WBC, waar de echte TGN-activiteit verwacht wordt. Pike^[34] toonde aan dat er geen verschil is in 6-TGN en 6-MMP(R) tussen volbloed en RBC. Volbloed kan dus gebruikt worden, wat een belangrijke tijdswinst oplevert. De stabiliteit van de metabolieten is beperkt. Per dag op kamertemperatuur is er een verlies van 2-4%. Stalen moeten daarom zo snel mogelijk ingevroren worden. Na 1 week op -20°C is er een verlies van 1%, na 24 weken was er een verlies van 12%.

De diverse analysemethoden vertonen verschillende problemen. De oudere methodes gebaseerd op Lennard & Singleton maken gebruik van extractie met kwik-adduct vorming. Vandaag de dag wordt het gebruik van kwik zoveel mogelijk vermeden.

Bij de analyses gebaseerd op Dervieux et al. wordt gebruik gemaakt van perchloorzuur voor een zure hydrolyse van de thioguaninenucleotiden. Deze hydrolyse brengt de pH < 0, wat buiten de range van de kolom ligt^[33]. Ook de recovery van deze analyses is vrij laag (84% 6-MMP, 73% 6-TGN). Bovendien is de opwerking van het staal vaak omslachtig met meerdere extractiestappen^[34].

De methode van Bakker^[35] is bovendien een methode voor de bepaling van AZA-metabolieten in plasma zonder rekening te houden met de verschillende 6-TGN. Er is geen hydrolysestap bij deze analyse. De verschillende publicaties met therapeutische ranges handelen echter steeds over 6-TGN, nadat deze door hydrolyse omgezet werden in 6-TG^[37].

De resultaten die werden bekomen met deze verschillende methoden kunnen niet zonder meer met elkaar vergeleken worden. Shipkova et al. vergeleek de methoden van Lennard met deze van Dervieux en vond dat de resultaten via Dervieux gemiddeld 2.6x hoger lagen. Door vervanging van zwavelzuur door perchloorzuur daalde het verschil tot 1.4x hogere waarden.

Dervieux zelf vergeleek zijn methode met deze van Cuffari et al. en vond een (aanvaardbare) positieve bias van 18%. (Zie Figuur 4).

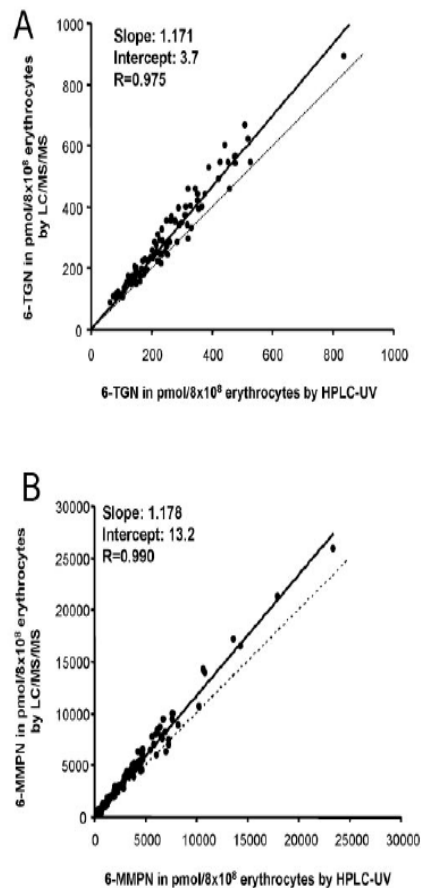


Fig. 3. Method comparison.

Erythrocyte 6-TGNs and 6-MMPNs from 100 patients receiving thiopurine therapy were measured by the method developed by Lennard and Singleton (23) and modified by Cuffari et al. (20), and compared with the perchloric acid extraction-hydrolysis method with MS/MS detection. (A), 6-TGN concentrations; (B), 6-MMPN concentrations. The slope, intercept, and coefficient correlation (R) are given. Dotted lines represent the $y = x$ regression.

Figuur 4: Methodevergelijking tussen Dervieux et al. en Cuffari et al.

2) Masterproef Katrien Hermans^[38]

Omwillen van bovenstaande problemen heeft Katrien Hermans in haar masterproef^[38] tijdens academiejaar 2012-2013 getracht een oplossing te vinden voor bovenstaande problemen. Het doel was een methode te ontwikkelen die routinematig bruikbaar was voor de bepaling van 6-TG en 6-MMP in volbloed met LC-MS/MS. In haar onderzoek werden verschillende aangepaste methoden uitgetest.

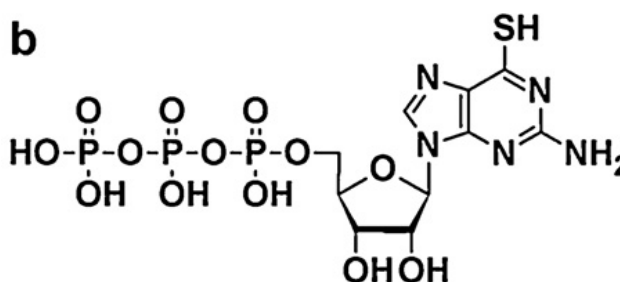
Een aangepaste methode van Dervieux leek het meest geschikt, echter deze is zeer agressief voor de apparatuur en zou vereisen dat de HPLC kolom na iedere batch wordt vervangen. Dat is geen optie. Ook een gemodificeerde methode van Pike was in de routinepraktijk niet bruikbaar wegens de arbeidsintensiviteit. Voor de bepaling van 6-TG en 6-MMP zijn namelijk twee verschillende opwerkingsmethoden noodzakelijk.

Een aanpassing van de methode van Bakker bleek ook niet onmiddellijk bruikbaar omdat hierbij de individuele 6-TG nucleotiden worden bepaald, zonder hydrolysestap. Er zijn echter geen interne standaarden beschikbaar om deze bij elkaar op te tellen. Hiervoor zouden zelf gedeutereerde standaarden moeten gesynthetiseerd worden.

3) Recente literatuur

In recentere publicaties^[39-41] wordt meer en meer gesproken van het bepalen van de individuele thioguaninenucleotiden.

De analyse van thiopurine nucleotiden is moeilijk omwille van hun fysische en chemische eigenschappen. Nucleotiden bestaan uit een purine base, een suiker en 1,2 of 3 fosfaatgroepen (zie Figuur 5). Wegens hun polariteit worden deze moleculen slecht weerhouden op RP-HPLC.



Figuur 5: Moleculaire structuur van 6-thioguanosine

Bovendien worden deze moleculen als bron van energie aangewend in biologische processen, door afsplitsen van fosfaatgroepen. Alhoewel ATP de belangrijkste energiebron is, kunnen ook andere nucleotiden hiervoor gebruikt worden. Dit maakt de staalname en preanalytische fase van deze analyses moeilijk wegens de snelle interconversie tussen de verschillende nucleotiden. Deze is zeer snel en dient onmiddellijk gestopt te worden op het moment van staalname.

Enkele groepen hebben deze analyses reeds uitgevoerd. De groep van Hofmann et al. gebruikt hiertoe LC-MS/MS, terwijl de groep van Vikingsson et al. gebruik maakt van fluorescentie en/of UV detectie.

Er zijn momenteel echter geen guidelines over doelwaarden/streefwaarden met zo'n methode. I studie van Neurath et al. vond een correlatie tussen een hoge TGDP/TGTP ratio en slechtere klinische outcome.^[42]

Samenvatting

Doorheen de jaren werden verschillende analysemethoden ontwikkeld. Waar initeel de analyse gebeurde na extractie met kwikderivaten en detectie via HPLC-UV of fluorescentiemeting, gebruiken de recentere methoden een minder toxische onteiwitging gevolgd door zure hydrolyse met perchloorzuur.

De meeste studies werden uitgevoerd met (varianten) op de methode van Lennard en Singleton. Onderzoek heeft uitgewezen dat de resultaten bekomen met verschillende methoden significant van elkaar kunnen verschillen. De bekomen streefwaarden/doelwaarden uit klinische studies kunnen dan ook niet zonder meer veralgemeend worden.

De meest recente publicaties trachten de verschillende nucleotiden individueel te meten. Door de snelle interconversie tussen de verschillende nucleotiden is de pre-analytische fase cruciaal en moeilijk routinematig uit te voeren. Bovendien ontbreken commerciële standaarden van de verschillende nucleotiden, wat kwantificatie bemoeilijkt. Tenslotte zijn er nog maar zeer beperkte studies over het nut van deze praktijk.

Verder klinisch onderzoek naar het nut en standaardisatie van deze assays is zeker nodig.

b) Klinische toepassingen van de dosage van thiopurine metabolieten.

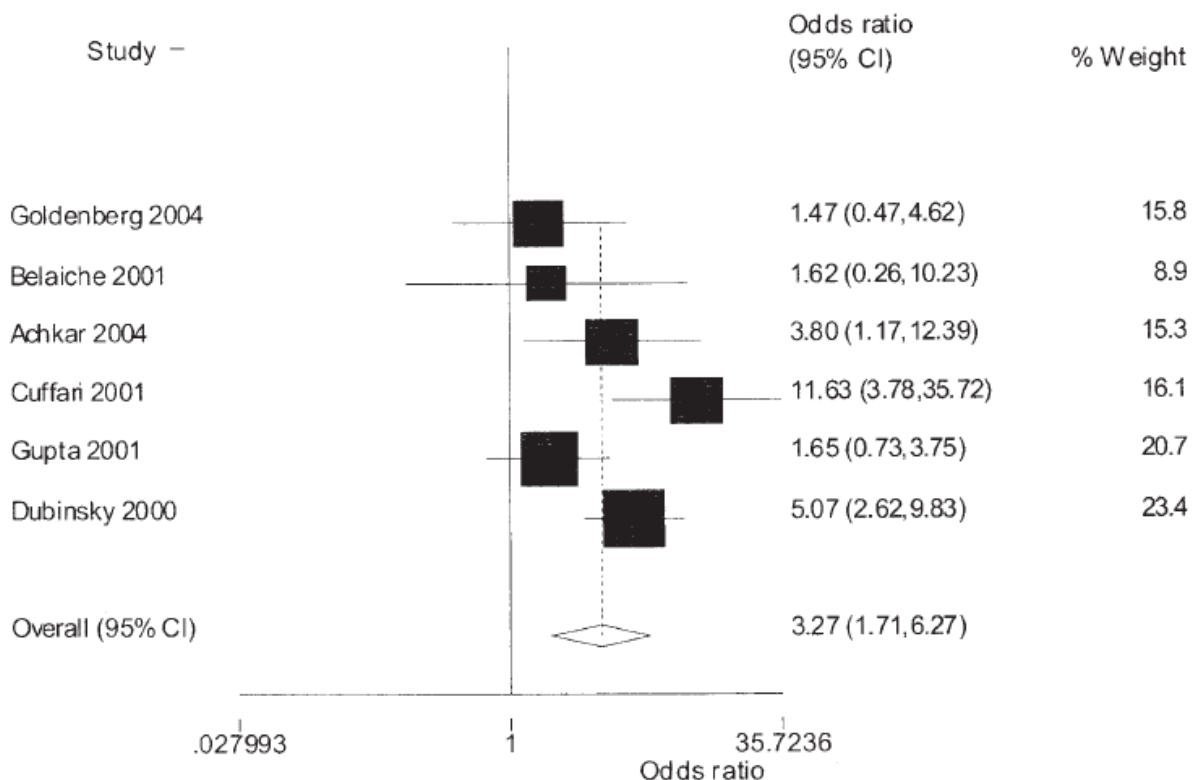
Ongeveer 30% van de patiënten die worden behandeld met thiopurines voor de ziekte van Crohn, beantwoordt niet aan deze therapie^[43].

Verschillende studies hebben gesuggereerd dat hogere levels van 6-TGN waren geassocieerd met klinische respons en toxiciteit bij IBD patiënten. De meeste van deze studies waren echter underpowered om kleine verschillen te detecteren en deze studies kwamen ook vaak tot verschillende conclusies. In 2006 voerden Osterman et al^[37], een meta-analyse uit om de relatie tussen 6-TGN en klinische respons in IBD te onderzoeken.

De resultaten zijn zichtbaar in onderstaande figuur (Figuur 6). Een gepoolde analyse toonde aan dat patiënten in remissie een hogere kans hadden om 6-TGN levels te hebben boven de drempelwaarde (die varieerde tussen 230-260 pmol/8*10⁸ RBC's). De gepoolde odds-ratio was 3.27 (95% CI 1.71-6.27).

Gemiddeld hadden IBD-patiënten in remissie een hoger 6-TGN level dan diegene met actieve ziekte. Het gepoolde verschil was 66 pmol/8*10⁸ RBC's.

De heterogeniteit die aanwezig was in deze meta-analyse was het gevolg van inclusie van studies die als outlier konden beschouwd worden. Eliminatie van deze studies veranderde echter weinig aan de resultaten van de meta-analyse.



Figuur 6: Gepoolde oddsratio's gebaseerd op drempelwaarden van 6-TGN. De 'random-effects' resultaten zijn gebaseerd op de laagste drempelwaarde.^[37]

Deze meta-analyse van retrospectieve en cross-sectionele studies suggereert een sterke associatie tussen 6-TGN levels en inductie van remissie bij patiënten met IBD.

In afwachting van verdere prospectieve studies, bood deze meta-analyse sterke evidentie dat 6-TGN levels geassocieerd zijn met klinische respons in IBD patiënten die worden behandeld met AZA of 6-MP en dat het bepalen van deze levels nuttig kan zijn in de behandeling van deze patiënten, voornamelijk deze met refractaire ziekte op hun huidige dosis AZA of 6-MP.

De (pediatrische) studie van Dubinsky et al.^[44], die ook werd geïncludeerd in bovenstaande meta-analyse, toonde bovendien aan dat hepatotoxiciteit correleerde met verhoogde 6-MMP levels ($> 5700 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBCs}$). Leukopenie was geassocieerd met hogere 6-TG levels.

In 2007 werd een prospectieve gerandomiseerde trial gepubliceerd door de groep van Reinshagen et al.^[45] Hierbij werden patiënten na twee weken behandeling gerandomiseerd tussen een groep waarvan de dosering van AZA werd aangepast op basis van de 6-TGN spiegels en een andere groep waarbij geen aanpassingen gebeurden. Er waren geen verschillen in quality-of-life, ziekte-activiteit, 6-TGN concentraties, AZA dosering of dropouts door toxiciteit. Deze prospectieve gerandomiseerde studie concludeerde dan ook dat er geen benefit was voor 6-TGN dosering bij patiënten met wild-type TPMT. 5 patiënten waren TPMT heterozygoot, maar verlieten de studie na randomisatie. Bovendien had monitoring van 6-MMP geen predictieve waarde voor het optreden van hepatotoxiciteit. Ook Goldenberg et al.^[46] kwamen tot deze conclusie.

In 2011 publiceerden González-Lama et al. eveneens een prospectieve multicentrische studie met als doel een drempelwaarde te identificeren voor TPMT en 6-TGN concentraties en om hun vermogen om veiligheid en efficaciteit van de behandeling na te gaan.

Deze studie concludeerde dat het niet nuttig was om systematisch 6-TGN te meten bij de start van therapie. Deze dosage laat niet toe te voorspellen wie zal reageren en wie niet. Er kon eveneens geen drempelwaarde gedefinieerd worden voor efficaciteit en/of veiligheid. De vroeger voorgestelde waarden van $230\text{-}260 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ hadden een slechte sensitiviteit en specificiteit. Geen andere drempelwaarde kon gedefinieerd worden. Dit is in overeenstemming met een andere prospectieve studie^[47] (die wel gebruik maakte van een andere analysemethode) en met de resultaten van Reinshagen et al.

Deze data zijn complementair aan andere publicaties die aantoonen dat er een grote interindividuele variabiliteit is in 6-TGN spiegels. Deze studies vonden eveneens een slechte correlatie tussen gewichtgebaseerde orale dosis AZA en 6-TGN spiegels^[44; 46; 48]. (Zie ook Tabel 2, pagina 30.)

Haines et al. publiceerden in juni 2011 de resultaten van hun studie waarin de therapie van patiënten die onvoldoende respons vertoonden, op basis van metaboliet metingen werd aangepast. Zij concludeerden dat meting van thiopurinemetabolieten nuttig was om switch naar een andere geneesmiddelenklasse (anti-TNF medicatie) te vermijden of integendeel toxiciteit door dosisverhoging te vermijden. Hierbij baseren ze zich wel op cutoffs die in andere studies niet konden bevestigd worden.

Uit bovenstaande data blijkt dat nog niet onomstotelijk is aangetoond dat het meten van 6-TG metabolieten voorspellende waarde heeft voor efficaciteit of toxiciteit.

De survey van Roblin et al.^[32] toonde aan dat klinici een assay voor TDM van 6-TG metabolieten nuttig zouden vinden. Diegenen die erover beschikken zijn minder geneigd om naar een andere geneesmiddelenklasse over te schakelen. Opnieuw was de belangrijkste factor die het gebruik bepaalde de beschikbaarheid en terugbetaling van de test.

Niet tegenstaande bovenstaande bevindingen kan TDM nuttig zijn voor het ophelderen van mechanismen van klinische resistentie of slechte respons en om toxiciteit te klaren of voorkomen. Chouchana et al. stellen in hun meeste recente review^[12] dan ook 5 metaboliëprofielen voor, met een bijhorende therapeutische aanpak. (Zie Figuur 7 en Tabel 1) Hoe dan ook vervangt TDM van thiopurinemetaboliëten het regelmatig monitoren van de bloedformule en levertesten NIET.

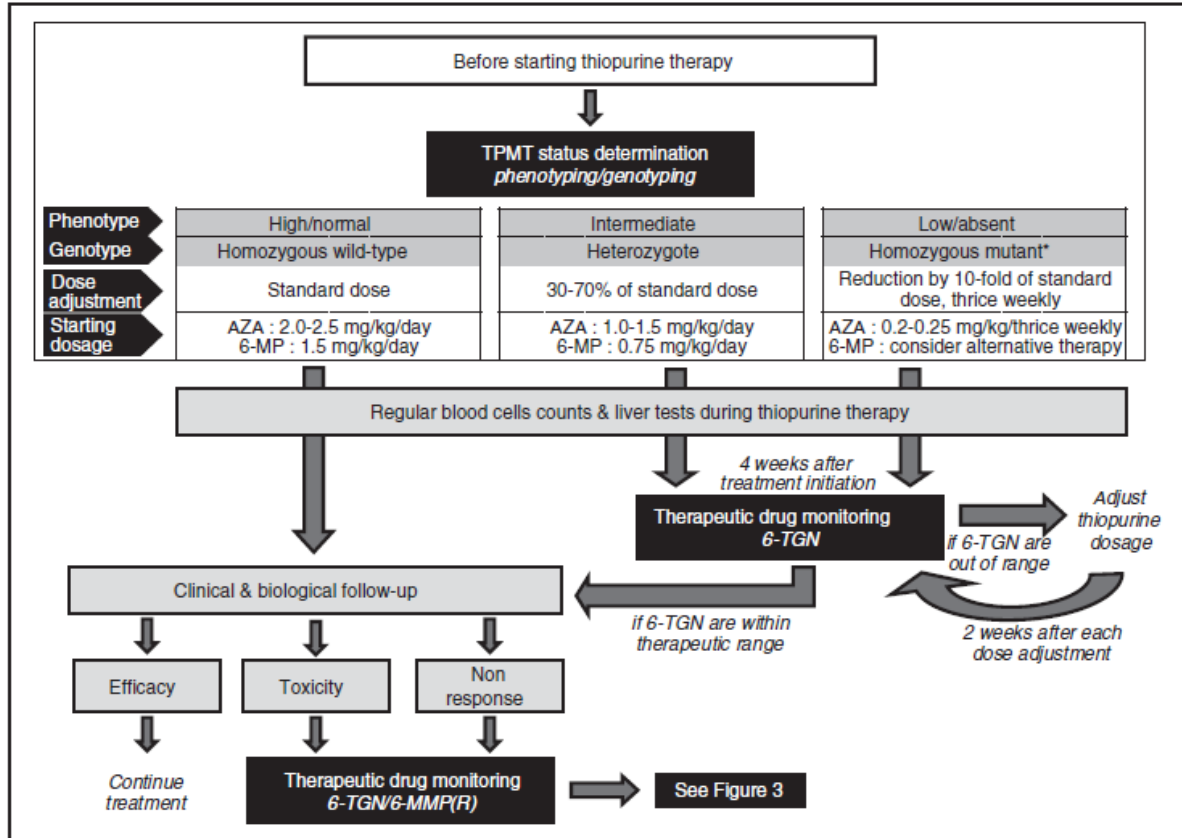


Figure 2 | Therapeutic algorithm for thiopurine therapy management. For patients before initiating thiopurine therapy: recommended starting dose of thiopurines, depending on TPMT phenotype/genotype (Adapted from Relling et al.²²⁶) For patients under thiopurine therapy: recommendations of therapeutic 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.

Figuur 7: Therapeutisch algoritme voor thiopurine management naar Chouchana et al.^[12]

Tabel 1: TDM op basis van thiopurine metabolietprofielen (Chouchana^[12] et al.; Dewit^[49] et al.)

	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.e. 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

Samenvatting:

De meta-analyse van retrospectieve studies door Osterman et al. toonde aan 6-TGN concentraties boven 230-260 pmol/8*10⁸ RBC een OR voor remissie hadden van 3.27. Er was een slechte correlatie tussen drug dosis en 6-TGN levels, wat suggereert dat individueel metabolisme, meer dan dosis, belangrijk is voor de 6-TGN spiegels. De pediatrie studie door Dubinski et al. fungeert als voornaamste bron om te stellen dat 6-MMP levels > 5700 pmol/8*10⁸ RBCs geassocieerd zijn met hepatotoxiciteit.

Sinds 2007 werden enkele prospectieve gerandomiseerde clinical trials uitgevoerd. Deze trials betwisten de geldigheid van TGN drempels voor efficaciteit (230-260 pmol/8*10⁸ RBCs) en 6-MMP levels voor het voorspellen van toxiciteit (> 5700 pmol/8*10⁸ RBCs). Er kon geen cutoff gedefinieerd worden om patiënten in remissie te identificeren en zodus zijn dosisaanpassingen op basis van een cutoff ook niet mogelijk.

Ondanks deze tegenstrijdigheden worden aanbevelingen gepubliceerd voor het patiëntenmanagement op basis van deze waarden. Voornamelijk bij de investigatie naar therapiefalen lijken deze analyses nog toekomstmogelijkheden te vertonen. Verder onderzoek met grote gerandomiseerde gecontroleerde studies is wenselijk.

IV. Is dosage van biologicals aangewezen?

Sinds de jaren '90 werd anti-TNF alfa therapie geïntroduceerd voor verschillende inflammatoire aandoeningen zoals de ziekte van Crohn, colitis ulcerosa, reumatoïde arthritis en spondylarthritis. Het grootste probleem is dat deze behandelingen met de tijd minder efficiënt worden. Dit is in vele gevallen te wijten aan het ontwikkelen van neutraliserende antistoffen.

Dit falen van de behandeling kan aangepakt worden door het dosisinterval te verminderen, de dosis op te drijven, een immuunmodulator toe te voegen of te switchen naar een ander product binnen dezelfde klasse (vb. infliximab (Remicade®) naar adalimumab (Humira®)).

Om goed te werken dient een geneesmiddel een minimale concentratie te bereiken om effectief te zijn. Dit kan opgevolgd worden door het bepalen van de dalwaarde (through level, TL), de spiegel net voor een nieuwe toediening. Bovendien impliceert het optimaal gebruik van een geneesmiddel ook dat piekwaarden en gemiddelde spiegels niet geassocieerd worden met toxiciteit.

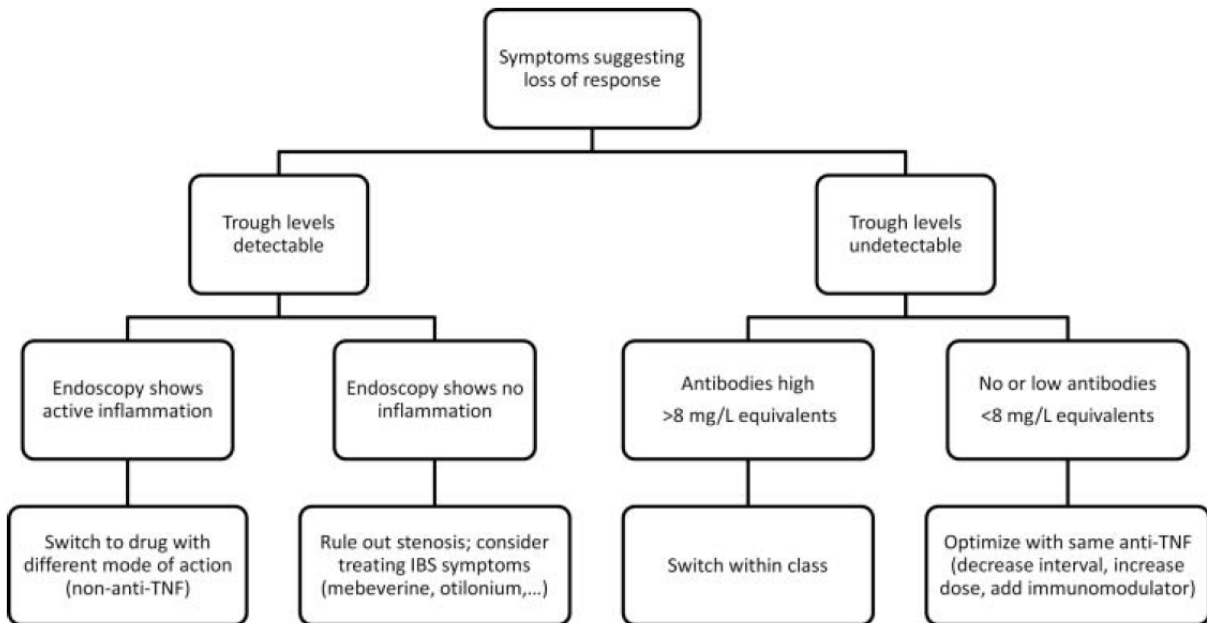
Een bijkomend probleem is dat de immunogeniteit van de behandeling leidt tot de vorming van anti-drug antilichamen (ADA), wat leidt tot een verminderde concentratie van actief geneesmiddel.

Uit retrospectieve studies is gebleken dat langdurige goede serumspiegels van deze biologicals geassocieerd zijn met betere mucosale genezing, een betere langetermijns outcome en zullen leiden tot een betere quality-of-life, minder ziektegerelateerde chirurgie en minder hospitalisatie. Bovendien lijken hoge dalwaarden geassocieerd te zijn met toxiciteit onder de vorm van huidafwijkingen (psoriasiforme eczeem) en arthralgie.^[50]

Momenteel zijn bij IBD patiënten nog geen prospectieve gerandomiseerde trials gepubliceerd die therapie-aanpassing op basis van TL's vergeleken met standaardbehandeling. De onderzoeksgroep uit Leuven startte hiertoe in augustus 2011 de TAXIT trial op. In deze studie worden patiënten geoptimaliseerd tot dalspiegels van infliximab tussen 3-7 µg/ml. Na randomisatie wordt de controlegroep op klinische gronden verder opgevolgd en in de interventiegroep wordt de behandeling aangepast om de spiegels in de range 3-7 µg/ml te houden. De laatste resultaten worden hiervan verwacht in april 2013.

Meerdere groepen hebben assays ontwikkeld. Een 'round robin'-experiment toonde een goede correlatie tussen de resultaten van het laboratorium voor farmaceutische biologie in Leuven en Sanquin in Amsterdam. Er waren wel enkele discrepanties met de resultaten bekomen met de LISA-Tracker Premium IFX kit (BMD Biomedical diagnostics, Marne-La-Vallée, Frankrijk) die in Groningen wordt gebruikt. Dit benadrukt de noodzaak voor standaardisatie.

Op basis van de tot op heden bekomen resultaten stelt de Leuvense onderzoeksgroep momenteel onderstaand algoritme voor.



Figuur 8: Algoritme in patiënten onder anti-TNF therapie die zich presenteren met symptomen suggestief voor verlies van respons.^[50]

Op dit moment, zonder data dat het meten van dalwaarden kosten-effectief is, kan het routinematig meten van dalwaarden en ADA's nog niet worden aangeraden. Een wijde implementatie van deze praktijk vereist een snelle, gestandaardiseerde en makkelijk te interpreteren assay, met bijhorend behandelingsalgoritme.

Samenvatting:

Het meten van dalwaarden en anti-drug antistoffen is momenteel volop in ontwikkeling. Op dit moment, in afwezigheid van prospectieve gerandomiseerde trials en kosteneffectiviteitsdata kan dit nog niet routinematig aangeraden worden. De resultaten van de TAXIT trial worden nog afgewacht. Ook een standaardisatie van de verschillende assays dient in de toekomst bekeken te worden.

TO DO/ACTIONS

- Verdere studies naar het nut van thiopurinedosage dienen afgewacht te worden, evenals een standaardisatie in de analysemethoden.
- De resultaten van de TAXIT-trial worden afgewacht in verband met de analyse van spiegels van anti-TNF antistoffen en neutraliserende antilichamen.

BIJLAGEN

Bijlage I: Mediane 6-TGN levels bij patiënten in remissie en met actieve ziekte

Tabel 2: Overzichtstabel mediane 6-TGN waarden in remissie en bij actieve ziekte. [12]

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
Retrospective	Wright, 2004 ¹⁰¹	IBD	131	Steady state	Lennard, 1992	236	175	P < 0.04
	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.

Bijlage 2: Overzicht analysemethoden thiopurinemetabolieten

Tabel 3: Overzicht van de verschillende 6-TG en 6-MMP analysemethoden.

Studie	Extractiemethode	Analysemethode	Opmerkingen
Lavi et al. ^[51] 1985	Extractie dmv Hg-cellulosehars om selectief thiolen te absorberen.	HPLC met Partisil-SAX kolom en UV detectie.	Hg dient vermeden te worden als reagens. Detecteert 6-TIMP, 6-TUA, 6-TGMP, 6-TGDP, 6-TGTP.
Erdmann et al. ^[52] 1990	Analyse op gewassen RBCs. Zure hydrolyse van de nucleotiden.	Analyse van 6-TG en 6-MP op RP-HPLC C18-kolom met permanganaat oxidatie en fluorescentiedetectie. 6-MMP en 6-MTG analyse op RP-HPLC cyanopropylsilaankolom.	2 chromatografische runs nodig.
Lennard & Singleton 1992	Analyse op gewassen RBC's. Hydrolyse met H ₂ SO ₄ van de TGN. Neutralisatie, fenylkwik-adduct vorming in toluen, waarna vloeistof-vloeistof extractie. Terugextractie met HCl uit de toluenfase.	RP-HPLC met DAD detectie.	Gebruikt kwik als reagens. Een factor van 1.6 is nodig voor vergelijking tussen Erdmann en Lennard. (Shipkova et al. ^[53])
Keuzenkamp-Jansen et al. 1995	Extractie op ijs met perchloorzuur en K ₂ HPO ₄ . Extractie met methanol en methyleenblauw. Derivatisatie met permanganaat.	Anion-exchange HPLC. Fluorimetrische detectie.	

Cuffari et al. ^[54] 1996	Analyse op gewassen RBC's.	Analyse gebaseerd op Lennard & Singleton met enkele wijzigingen.	Aparte bepaling voor 6-TG en 6-MP enerzijds en 6-MMP anderzijds.
Dervieux & Bouliou ^[33] 1998	Analyse op gewassen RBC's Zure hydrolyse van nucleotiden met geconcentreerd perchloorzuur	RP-HPLC Detectie met DAD	Detectie van zowel 6-TG als 6-MMP in 1 run. Zuur perchloorzuur rechtstreeks geïnjecteerd op kolom.
Pike et al. ^[34] 2001	Analyse op RBC's en volbloed toonde aan dat volbloed kan gebruikt worden. Zure hydrolyse cfr. Dervieux et al. 2 verschillende extracties voor 6-MMP en 6-TG	Licht gewijzigde RP-HPLC (2x) op de 2 verschillende extracten. DAD detectie.	Toont aan dat volbloed kan gebruikt worden. Te omslachtig voor routinegebruik door 2 verschillende extracties. Verlies 2-4% 6TGN/dag op kamertemperatuur, 1% per week ingevroren, 12% na 24 weken ingevroren.
Dervieux et al. ^[36] 2005	Analyse op gewassen RBC's. Zure hydrolyse van nucleotiden met geconcentreerd perchloorzuur.	RP-HPLC met dC18-kolom Detectie met MS/MS	Perchloorzuur rechtstreeks op de kolom. Detecteert zowel 6-TGN als 6-MMP(R) Methodevergelijking met Cuffari et al. toont 17% hogere waarden voor 6-TGN en 18% hogere waarden voor 6-MMP. (Zie Figuur 4). Andere studies vonden 1.4x ^[55] en 2.6x ^[53] hogere waarden.
Bakker et al. ^[35] 2010	Analyse op plasma Geen hydrolyse Eiwitprecipitatie met acetonitrile.	RP-HPLC met MS/MS detectie.	Methode meet enkel 6-TG en geen nucleotiden. Richtwaarden uit de literatuur zijn steeds gebaseerd op 6-TG bepaling na hydrolyse van 6-TGN.

<p>Hofmann et al.^[39]</p> <p>2012</p>	<p>Analyse op gewassen RBC's.</p> <p>Optimale sample work-up vraagt onmiddellijk op 4°C plaatsen van de EDTA tubes. Bereiding van gepackete RBC's moet gebeuren binnen 4u.</p> <p>Eiwitdenaturatie na verwarming op 95°C, gevolgd door extractie met methanol en dichloormethaan.</p>	<p>Ion-exchange HPLC op een zwakke anion exchange kolom. Elutie dmv een pH gradient en detectie met triple quadrupole MS/MS in MRM modus.</p> <p>Er werd gebruik gemaakt van gesynthetiseerde gedeutereerde interne standaarden.</p>	<p>11 afzonderlijke nucleotiden werden gemeten. (Mono-, di-, en trifosfaten van thioguanosine, methylthioinosine, methylthioguanosine en thioinosine.)</p>
<p>Vikingsson et al.</p> <p>2013</p>	<p>Analyse op gewassen RBC's. Eiwitneerslag met dichloormethaan en methanol.</p> <p>De TGN worden gederivatiseerd met kaliumpermanganaat.</p>	<p>Analyse door ionenpaar HPLC, gevolgd door detectie op basis van fluorescentie en UV-detectie.</p>	<p>Methodeontwikkeling voor klinische studies.</p> <p>Opsporen van TGMP, TGDP, TGTP, meTIMP, meTIDP, meTITP.</p> <p>Niet routinematig bruikbaar wegens de snelle (binnen enkele seconden) interconversie tussen de verschillende nucleotiden.</p>

REFERENCES

- [1] A-Rahim YI & Farrell RJ. Azathioprine and 6-mercaptopurine in inflammatory bowel disease. *UpToDate* **21.1**. (2013)
- [2] Derijks LJJ, Gilissen LPL, Hooymans PM & Hommes DW. Review article: thiopurines in inflammatory bowel disease *Aliment Pharmacol Ther* (2006) **24**: pp. 715-729.
- [3] de Jong DJ, Derijks LJJ, Naber AHJ, Hooymans PM & Mulder CJJ. Safety of thiopurines in the treatment of inflammatory bowel disease *Scand J Gastroenterol Suppl* (2003) : pp. 69-72.
- [4] Sanderson J, Ansari A, Marinaki T & Duley J. Thiopurine methyltransferase: should it be measured before commencing thiopurine drug therapy? *Ann Clin Biochem* (2004) **41**: pp. 294-302.
- [5] Present DH, Meltzer SJ, Krumholz MP, Wolke A & Korelitz BI. 6-mercaptopurine in the management of inflammatory bowel disease: short- and long-term toxicity *Ann Intern Med* (1989) **111**: pp. 641-649.
- [6] Connell WR, Kamm MA, Ritchie JK & Lennard-Jones JE. Bone marrow toxicity caused by azathioprine in inflammatory bowel disease: 27 years of experience *Gut* (1993) **34**: pp. 1081-1085.
- [7] Sandborn W, Sutherland L, Pearson D, May G, Modigliani R & Prantera C. Azathioprine or 6-mercaptopurine for inducing remission of crohn's disease *Cochrane Database Syst Rev* (2000) : p. CD000545.
- [8] Lewis JD, Schwartz JS & Lichtenstein GR. Azathioprine for maintenance of remission in crohn's disease: benefits outweigh the risk of lymphoma *Gastroenterology* (2000) **118**: pp. 1018-1024.
- [9] Connell WR, Kamm MA, Dickson M, Balkwill AM, Ritchie JK & Lennard-Jones JE. Long-term neoplasia risk after azathioprine treatment in inflammatory bowel disease *Lancet* (1994) **343**: pp. 1249-1252.
- [10] Schwab M & Klotz U. Pharmacokinetic considerations in the treatment of inflammatory bowel disease *Clin Pharmacokinet* (2001) **40**: pp. 723-751.
- [11] Lennard L & Lilleyman JS. Individualizing therapy with 6-mercaptopurine and 6-thioguanine related to the thiopurine methyltransferase genetic polymorphism *Ther Drug Monit* (1996) **18**: pp. 328-334.
- [12] Chouchana L, Narjoz C, Beaune P, Lorient M & Roblin X. Review article: the benefits of pharmacogenetics for improving thiopurine therapy in inflammatory bowel disease *Aliment Pharmacol Ther* (2012) **35**: pp. 15-36.
- [13] Dervieux T, Blanco JG, Krynetski EY, Vanin EF, Roussel MF & Relling MV. Differing contribution of thiopurine methyltransferase to mercaptopurine versus thioguanine effects in human leukemic cells *Cancer Res* (2001) **61**: pp. 5810-5816.

- [14] Crawford DJ, Maddocks JL, Jones DN & Szawlowski P. Rational design of novel immunosuppressive drugs: analogues of azathioprine lacking the 6-mercaptopurine substituent retain or have enhanced immunosuppressive effects *J Med Chem* (1996) **39**: pp. 2690-2695.
- [15] Weinshilboum RM & Sladek SL. Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity *Am J Hum Genet* (1980) **32**: pp. 651-662.
- [16] Schaeffeler E, Fischer C, Brockmeier D, Wernet D, Moerike K, Eichelbaum M, Zanger UM & Schwab M. Comprehensive analysis of thiopurine s-methyltransferase phenotype-genotype correlation in a large population of german-caucasians and identification of novel tpmt variants *Pharmacogenetics* (2004) **14**: pp. 407-417.
- [17] Gisbert JP, Gomollón F, Cara C, Luna M, González-Lama Y, Pajares JM, Maté J & Guijarro LG. Thiopurine methyltransferase activity in spain: a study of 14,545 patients *Dig Dis Sci* (2007) **52**: pp. 1262-1269.
- [18] Appell ML, Berg J, Duley J, Evans WE, Kennedy MA, Lennard L, Marinaki T, McLeod HL, Relling MV, Schaeffeler E, Schwab M, Weinshilboum R, Yeoh AEJ, McDonagh EM, Hebert JM, Klein TE & Coulthard SA. Nomenclature for alleles of the thiopurine methyltransferase gene *Pharmacogenet Genomics* (2013) **23**: pp. 242-248.
- [19] Tai HL, Krynetski EY, Schuetz EG, Yanishevski Y & Evans WE. Enhanced proteolysis of thiopurine s-methyltransferase (tpmt) encoded by mutant alleles in humans (tpmt*3a, tpmt*2): mechanisms for the genetic polymorphism of tpmt activity *Proc Natl Acad Sci U S A* (1997) **94**: pp. 6444-6449.
- [20] Booth RA, Ansari MT, Loit E, Tricco AC, Weeks L, Doucette S, Skidmore B, Sears M, Sy R & Karsh J. Assessment of thiopurine s-methyltransferase activity in patients prescribed thiopurines: a systematic review *Ann Intern Med* (2011) **154**: p. 814-23, W-295-8.
- [21] Szumlanski C, Otterness D, Her C, Lee D, Brandriff B, Kelsell D, Spurr N, Lennard L, Wieben E & Weinshilboum R. Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: human gene cloning and characterization of a common polymorphism *DNA Cell Biol* (1996) **15**: pp. 17-30.
- [22] Lewis LD, Benin A, Szumlanski CL, Otterness DM, Lennard L, Weinshilboum RM & Nierenberg DW. Olsalazine and 6-mercaptopurine-related bone marrow suppression: a possible drug-drug interaction *Clin Pharmacol Ther* (1997) **62**: pp. 464-475.
- [23] Relling MV, Gardner EE, Sandborn WJ, Schmiegelow K, Pui C, Yee SW, Stein CM, Carrillo M, Evans WE, Klein TE. Clinical pharmacogenetics implementation consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing *Clin Pharmacol Ther* (2011) **89**: pp. 387-391.
- [24] Travis SPL, Stange EF, Lémann M, Oresland T, Chowers Y, Forbes A, D'Haens G, Kitis G, Cortot A, Prantera C, Marteau P, Colombel J, Gionchetti P, Bouhnik Y, Tiret E, Kroesen J, Starlinger M, Mortensen NJ. European evidence based consensus on the diagnosis and management of crohn's disease: current management *Gut* (2006) **55 Suppl 1**: p. i16-35.
- [25] Dignass A, Van Assche G, Lindsay JO, Lémann M, Söderholm J, Colombel JF, Danese S, D'Hoore A, Gassull M, Gomollón F, Hommes DW, Michetti P, O'Morain C, Oresland T,

- Windsor A, Stange EF, Travis SPL. The second european evidence-based consensus on the diagnosis and management of crohn's disease: current management *J Crohns Colitis* (2010) **4**: pp. 28-62.
- [26] Newman WG, Payne K, Tricker K, Roberts SA, Fargher E, Pushpakom S, Alder JE, Sidgwick GP, Payne D, Elliott RA, Heise M, Elles R, Ramsden SC, Andrews J, Houston JB, Qasim F, Shaffer J, Griffiths CEM, Ray DW, Bruce I, Ollier WER. A pragmatic randomized controlled trial of thiopurine methyltransferase genotyping prior to azathioprine treatment: the target study *Pharmacogenomics* (2011) **12**: pp. 815-826.
- [27] Banerjee S & Bishop WP. Evolution of thiopurine use in pediatric inflammatory bowel disease in an academic center *J Pediatr Gastroenterol Nutr* (2006) **43**: pp. 324-330.
- [28] Anstey AV, Wakelin S, Reynolds NJ. Guidelines for prescribing azathioprine in dermatology *Br J Dermatol* (2004) **151**: pp. 1123-1132.
- [29] Chakravarty K, McDonald H, Pullar T, Taggart A, Chalmers R, Oliver S, Mooney J, Somerville M, Bosworth A, Kennedy T, . Bsr/bhpr guideline for disease-modifying anti-rheumatic drug (dmard) therapy in consultation with the british association of dermatologists *Rheumatology (Oxford)* (2008) **47**: pp. 924-925.
- [30] Prometheus L. Imuran (azathioprine) tablets prescribing information (2011) : .
- [31] Carter MJ, Lobo AJ, Travis SPL. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults *Gut* (2004) **53 Suppl 5**: p. VI-16.
- [32] Roblin X, Oussalah A, Chevaux J, Sparrow M & Peyrin-Biroulet L. Use of thiopurine testing in the management of inflammatory bowel diseases in clinical practice: a worldwide survey of experts *Inflamm Bowel Dis* (2011) **17**: pp. 2480-2487.
- [33] Dervieux T & Boulieu R. Simultaneous determination of 6-thioguanine and methyl 6-mercaptopurine nucleotides of azathioprine in red blood cells by hplc *Clin Chem* (1998) **44**: pp. 551-555.
- [34] Pike MG, Franklin CL, Mays DC, Lipsky JJ, Lowry PW & Sandborn WJ. Improved methods for determining the concentration of 6-thioguanine nucleotides and 6-methylmercaptopurine nucleotides in blood *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* (2001) **757**: pp. 1-9.
- [35] Bakker JA. **Metabolic and genetic aspects of thiopurine metabolism**. Universiteit Maastricht.2010.
- [36] Dervieux T, Meyer G, Barham R, Matsutani M, Barry M, Boulieu R, Neri B & Seidman E. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of erythrocyte thiopurine nucleotides and effect of thiopurine methyltransferase gene variants on these metabolites in patients receiving azathioprine/6-mercaptopurine therapy *Clin Chem* (2005) **51**: pp. 2074-2084.
- [37] Osterman MT, Kundu R, Lichtenstein GR & Lewis JD. Association of 6-thioguanine nucleotide levels and inflammatory bowel disease activity: a meta-analysis *Gastroenterology* (2006) **130**: pp. 1047-1053.

- [38] Hermans K. Bepaling van 6-tg en 6-mmp in volbloed. *Katholieke Universiteit Leuven*. 2012.
- [39] Hofmann U, Heinkele G, Angelberger S, Schaeffeler E, Lichtenberger C, Jaeger S, Reinisch W & Schwab M. Simultaneous quantification of eleven thiopurine nucleotides by liquid chromatography-tandem mass spectrometry *Anal Chem* (2012) **84**: pp. 1294-1301.
- [40] Vikingsson S, Almer S, Peterson C, Carlsson B & Josefsson M. Monitoring of thiopurine metabolites - a high-performance liquid chromatography method for clinical use *J Pharm Biomed Anal* (2013) **75**: pp. 145-152.
- [41] Karner S, Shi S, Fischer C, Schaeffeler E, Neurath MF, Herrlinger KR, Hofmann U & Schwab M. Determination of 6-thioguanosine diphosphate and triphosphate and nucleoside diphosphate kinase activity in erythrocytes: novel targets for thiopurine therapy? *Ther Drug Monit* (2010) **32**: pp. 119-128.
- [42] Neurath MF, Kiesslich R, Teichgräber U, Fischer C, Hofmann U, Eichelbaum M, Galle PR & Schwab M. 6-thioguanosine diphosphate and triphosphate levels in red blood cells and response to azathioprine therapy in crohn's disease *Clin Gastroenterol Hepatol* (2005) **3**: pp. 1007-1014.
- [43] Pearson DC, May GR, Fick GH & Sutherland LR. Azathioprine and 6-mercaptopurine in crohn disease. a meta-analysis *Ann Intern Med* (1995) **123**: pp. 132-142.
- [44] Dubinsky MC, Lamothe S, Yang HY, Targan SR, Sinnett D, Théorêt Y & Seidman EG. Pharmacogenomics and metabolite measurement for 6-mercaptopurine therapy in inflammatory bowel disease *Gastroenterology* (2000) **118**: pp. 705-713.
- [45] Reinshagen M, Schütz E, Armstrong VW, Behrens C, von Tirpitz C, Stallmach A, Herfarth H, Stein J, Bias P, Adler G, Shipkova M, Kruis W, Oellerich M & von Ahsen N. 6-thioguanine nucleotide-adapted azathioprine therapy does not lead to higher remission rates than standard therapy in chronic active crohn disease: results from a randomized, controlled, open trial *Clin Chem* (2007) **53**: pp. 1306-1314.
- [46] Goldenberg BA, Rawsthorne P & Bernstein CN. The utility of 6-thioguanine metabolite levels in managing patients with inflammatory bowel disease *Am J Gastroenterol* (2004) **99**: pp. 1744-1748.
- [47] Ansari A, Arenas M, Greenfield SM, Morris D, Lindsay J, Gilshenan K, Smith M, Lewis C, Marinaki A, Duley J & Sanderson J. Prospective evaluation of the pharmacogenetics of azathioprine in the treatment of inflammatory bowel disease *Aliment Pharmacol Ther* (2008) **28**: pp. 973-983.
- [48] Achkar J, Stevens T, Easley K, Brzezinski A, Seidner D & Lashner B. Indicators of clinical response to treatment with six-mercaptopurine or azathioprine in patients with inflammatory bowel disease *Inflamm Bowel Dis* (2004) **10**: pp. 339-345.
- [49] Dewit O. Usefulness of thiopurine methyltransferase and thiopurine metabolite analysis in clinical practice in patients with inflammatory bowel diseases *Acta Gastroenterol Belg* (2010) **73**: pp. 331-335.

- [50] Vermeire S & Gils A. Value of drug level testing and antibody assays in optimising biological therapy *Frontline Gastroenterol* (2013) **4**: pp. 41-43.
- [51] Lavi LE & Holcenberg JS. A rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic assay for 6-mercaptopurine metabolites in red blood cells *Anal Biochem* (1985) **144**: pp. 514-521.
- [52] Erdmann GR, France LA, Bostrom BC & Canafax DM. A reversed phase high performance liquid chromatography approach in determining total red blood cell concentrations of 6-thioguanine, 6-mercaptopurine, methylthioguanine, and methylmercaptopurine in a patient receiving thiopurine therapy *Biomed Chromatogr* (1990) **4**: pp. 47-51.
- [53] Shipkova M, Armstrong VW, Wieland E & Oellerich M. Differences in nucleotide hydrolysis contribute to the differences between erythrocyte 6-thioguanine nucleotide concentrations determined by two widely used methods *Clin Chem* (2003) **49**: pp. 260-268.
- [54] Cuffari C, Théorêt Y, Latour S & Seidman G. 6-mercaptopurine metabolism in crohn's disease: correlation with efficacy and toxicity *Gut* (1996) **39**: pp. 401-406.
- [55] Stefan C, Walsh W, Banka T, Adeli K & Verjee Z. Improved hplc methodology for monitoring thiopurine metabolites in patients on thiopurine therapy *Clin Biochem* (2004) **37**: pp. 764-771.