

Mastergradsoppgave i farmakologi for graden Master of Pharmacy

Monitorering av mykofenolatbehandling ved måling av IMPDH-aktivitet hos levertransplanterte pasienter

*En beskrivende studie av farmakokinetikk-farmakodynamikk-
forhold*

Tore Jakob Meltevik



Seksjon for farmakologi og endokrinologi

Avdeling for medisinsk biokjemi

Rikshospitalet

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

14.05.2008

Forord

Oppgaven foregikk under veiledning fra Dr. Philos. Stein Bergan, ved Avdeling for medisinsk biokjemi på Rikshospitalet, Seksjon for analytisk farmakologi og endokrinologi. Arbeidet ble initiert mai 2007 og avsluttet mai 2008. Oppgaven var del av et større prosjekt, "individuell immunmodulering", hvor målet er å dosere MPA individuelt slik at man reduserer forekomsten av bivirkninger og/eller avstøtningsepisoder.

En stor takk rettes til professor Stein Bergan. Takk for alt jeg har lært i min tid på Rikshospitalet. Det har vært et fantastisk år for min del. Ditt gode humør, fremragende faglige kunnskap og alltid positive tone har gjort det gøy å gå på "jobb". Takk for at du alltid tar deg tid til gode faglige diskusjoner, og for at du til tider også snakker om andre ting. En inspirator!

Stipendiat Ingjerd Sæves. Tusen takk for et fantastisk godt samarbeid! Din innsats på laben har gjort denne oppgaven mulig å gjennomføre. Takk for at du alltid stiller opp med din positive innstilling.

Takk til stipendiat Nils Tore Vethe for gode faglige diskusjoner og konstruktive tilbakemeldinger. Din kunnskap innen immunsuppressive legemidler har vært uunnværlig. Gode innføringer i metoder har gjort det vanskelig å gjøre feil.

Takk til stipendiat Sara Bremer som alltid har et godt humør og kommer med gode faglige innspill.

Takk rettes til avdelingsbioingeniør Laila Gjerdalen og hennes lag av bioingeniører. Takk for måten jeg ble tatt imot som ny på laboratoriet. Det er lett å trives på en arbeidsplass sammen med dere. En spesiell takk rettes til bioingeniør Karin Apneseth som utrettelig har hjulpet til med analyser. Hadde vært vanskelig å bli ferdig i tide uten din innsats.

Hjertelig takk til familien min; mamma, pappa, Andreas og Stine som alltid er der for meg og gir meg støtte når jeg trenger det. Uten deres støtte gjennom tøffe tider, hadde ikke studiet vært mulig å gjennomføre. Dere er fantastiske!

Camilla, tusen takk for alt! Det siste "året" hadde ikke vært det samme uten deg. Jeg blir glad når jeg tenker på deg, og det hjelper på humøret når det går i nedoverbakke. Til tider vanskelig å holde fokus på oppgaveskriving når du er i tankene mine, men uten deg der hadde hverdagen blitt lang og kjedelig. Du er alltid der når jeg trenger deg. Takk for all støtte, din positivitet og fantastiske væremåte. Du er herlig!

Tusen takk til gutta som har måttet tåle sure miner fra en til tider sliten student!

Innhold

FORORD	2
INNHold	4
SAMMENDRAG	7
FORKORTELSER	9
1. INNLEDNING	13
1.1 TRANSPLANTASJON	13
1.2 IMMUNSUPPRESSIV BEHANDLING	16
1.3 MYKOFENOLAT - FARMAKOLOGI.....	19
1.3.1 <i>Farmakokinetikk</i>	19
1.3.2 <i>Farmakodynamikk</i>	22
1.3.3 <i>Interaksjoner av klinisk betydning</i>	26
1.4 FARMAKOLOGISK MONITORERING.....	27
2. FORMÅL	29
3. MATERIALE OG METODER	30
3.1 PASIENTREKRUTTERING	30
3.2 IMMUNSUPPRESSIVT REGIME	30
3.3 FORSØKSPLANLEGGING	31
3.4 METODER	32
3.4.1 <i>Konsentrasjonsbestemmelse av MPA</i>	32
3.4.2 <i>Bestemmelse av IMPDH-aktivitet</i>	33
Isolering av CD4+ celler til bestemmelse av IMPDH-aktivitet.....	33
Kjernetelling	34
Aktivitetsbestemmelse av IMPDH	35

3.4.3	<i>Takrolimus konsentrasjonsbestemmelse</i>	36
4.	RESULTATER	38
4.1	FARMAKOKINETIKKFORHOLD HOS LEVERTRANSPLANTERTE	38
4.2	FARMAKODYNAMIKKFORHOLD HOS LEVERTRANSPLANTERTE	43
5.	DISKUSJON	47
5.1	FARMAKOKINETIKKFORHOLD HOS LEVERTRANSPLANTERTE	47
5.2	FARMAKODYNAMIKKFORHOLD HOS LEVERTRANSPLANTERTE	53
5.3	MONITORERING.....	56
5.4	METODER.....	59
5.4.1	<i>Bestemmelse av IMPDH-aktivitet</i>	60
	Kjernetelling.....	60
	Aktivitetsbestemmelse	61
6.	KONKLUSJON	62
	KILDELISTE	63
	APPENDIKS A	71
	REAGENSER OG UTSTYR	71
	APPENDIKS B	72
	UTDRAG FRA IMMUNSUPPRESSIV PROTOKOLL VED LEVERTRANSPLANTASJON	72
	APPENDIKS C	73
	PILOTSTUDIE	73
	APPENDIKS D	75
	PRØVEPLAN	75
	APPENDIKS E	76
	MEDIAN KONSENTRASJON-TID KURVER.....	76
	APPENDIKS F	77

KONSENTRASJON-TID PROFILER FOR MYKOFENOLAT OG TAKROLIMUS	77
APPENDIKS G	79
PK-PD PROFILER STUDIEPERIODE 2 OG -4	79

Sammendrag

Mykofenolatmofetil (MMF) (CellCept®) er et immunsuppressivt legemiddel som brukes i kombinasjonsbehandling som profylakse mot akutt reaksjon etter allogen transplantasjon. MMF er et prodrug som deesterifiseres presystemisk til den aktive substansen mykofenolat (MPA).

Formålet med oppgaven er å beskrive farmakodynamikk- og farmakokinetikkforhold ved mykofenolat hos levertransplanterte pasienter. Oppgaven inngår som en beskrivende del av en større studie (Monitoring of mycophenolate by IMPDH in liver tx; Monomix) på Rikshospitalet.

MPA utfører sin immunsuppressive virkning ved å inhibere enzymet inosin-5'-monofosfat dehydrogenase (IMPDH). IMPDH deltar i biosyntesen av guaninnukleotider, hvor enzymet katalyserer det hastighetsbestemmende trinnet i nysyntesen av purinnukleotider, oksidering av inosinmonofosfat (IMP) til xantinmonofosfat (XMP). Inhiberingen resulterer i at cellene tømmes for guanosinnukleotider som er nødvendig for differensiering og proliferasjon. Virkningen til MPA ser ut til å være relativt selektiv mot lymfocytter. Grunnen til målstyringen er sannsynligvis at lymfocytter er mer avhengige av nysyntese av guanosinnukleotider, i motsetning til andre celletyper som i større grad kan resirkulere nukleotidene.

Farmakokinetiske- og dynamiske forhold ved MPA hos levertransplanterte pasienter er i liten grad beskrevet tidligere, og dette er den første studien med parallell undersøkelse av MPA og IMPDH hos denne pasientgruppen. Det ble opparbeidet konsentrasjon-tid profiler basert på 12 timers doseintervall for 5 levertransplanterte pasienter. Samme doseintervall ble gjentatt på 4 studieperioder fordelt på de første 25 dagene etter transplantasjon. Profilene viste store intra- og interindividuelle variasjoner i farmakokinetiske variabler for MPA i tidlig fase etter transplantasjon. Variasjonen ligger til grunn for monitorering.

Farmakodynamiske data ble basert på 4 pasienter i løpet av 2 studieperioder. Som følge av lymfocyttenes sentrale rolle i rejeksjonsmekanismen, så vi på de farmakodynamiske forholdene i CD4+ celler hos pasientene. Det ble gjort analyser som gjorde at man kunne sammenlikne den underliggende aktiviteten til IMPDH med aktiviteten hos celler under påvirkning av MPA. Sammenlikningen viste en sterk inhibering av IMPDH på henholdsvis 93 % og 86 % i forhold til basalaktiviteten som følge av MPA-eksponering. IMPDH-aktiviteten ble også sett i forhold til MPA-konsentrasjonen over 12-timers doseintervall, og et inverst forhold mellom variablene ble observert. Den tette korrelasjonen mellom de to åpner for farmakodynamisk monitorering av MPA ved IMPDH-aktivitetsmålinger. Det faktum at det til tider ble observert fluktuasjoner i IMPDH-aktiviteten som ikke gjenspeiles av MPA-konsentrasjonen styrker grunnlaget for farmakodynamisk monitorering. På denne måten vil man kunne fange opp andre variabler enn MPA-konsentrasjon som påvirker enzymaktiviteten.

Resultatene som er oppnådd i løpet av studien kombinert med beskrivelse av flere pasienter vil danne plattform for å teste ut monitorering av MPA ved IMPDH hos levertransplanterte pasienter.

Forkortelser

AcMPAG	- mykofenolat acyl glukuronid
ADA	- adenosin deaminase
ADME	- absorpsjon, distribusjon, metabolisme og eliminasjon
ADP	- adenosin difosfat
AMP	- adenosin monofosfat
APC	- antigen-presenting cell (antigenpresenterende celle)
ATP	- adenosin trifosfat
AUC	- area under the curve (arealet under kurven)
B7	- ligand for reseptor cluster of differentiation 28 (CD28)
b.i.d.	- bis in die (2 ganger om dagen)
CD4+	- cluster of differentiation 4 positive celler
CD8+	- cluster of differentiation 8 positive celler
CD28	- cluster of differentiation 28 (reseptor for B7)
Cl	- clearance
Cl _{int}	-clearance intrinsic (et bestemt organs iboende evne til å metabolisere/-eliminere)
Cl/F	- oral clearance
C _{max}	- maksimum plasmakonsentrasjon
C _{min}	- minimum plasmakonsentrasjon
C ₀ /trough	- plasmakonsentrasjon like før inntak av ny dose

dADP	- deoksyadenosin difosfat
dATP	- deoksyadenosin trifosfat
dGDP	- deoksyguanosin difosfat
dGTP	- deoksyguanosin trifosfat
DNA	- deoksyribonukleinsyre
F	- biotilgjengelighet
fu	- fraction unbound (fri fraksjon – fraksjon av legemiddel som ikke er proteinbundet)
GDP	- guanosin difosfat
GI	- gastro intestinalis
GMP	- guanosin monofosfat
GTP	- guanosin trifosfat
HGPRT	- hypoksantin-guanin-fosforibosyl transferase
HLA	- human leucocyte antigen
HPLC	- high performance liquid chromatography
IL	- interleukin
IMP	- inosin monofosfat
IMPDH	- inosin monofosfat dehydrogenase
<i>IMPDH</i>	- genene som koder for inosin monofosfat dehydrogenase
IMPDHa	- inosin monofosfat dehydrogenase aktivitet
IMPDHa _{min}	- minimumsaktivitet for inosin monofosfat dehydrogenase
IMPDHa _{max}	- maksimumsaktivitet for inosin monofosfat dehydrogenase

i.v.	- intravenøs
K_i	- inhibisjonskonstant
M	- makrofager
MHC	- major histocompatibility complex
MMF	- mykofenolatmofetil
MPA	- mykofenolsyre
MPAG	- glukuronidert mykofenolsyre
MRP	- multi-drug resistant protein
NAD^+	- nikotin adenin dinukleotid
NADH	- nikotin adenin dinukleotid hydrat - redusert form for NAD^+
PBS	- phosphate-buffered saline (fosfatbuffer i saltvann)
PD	- pharmacodynamics (farmakodynamikk)
PK	- pharmacokinetics (farmakokinetikk)
PMN	- polymorfonukleære leukocytter
PRPP	- 5-fosforibosyl-1-pyrofosfat
PSC	- primær scleroserende cholangitt
RNA	- ribonukleinsyre
rpm	- rounds per minute
RR	- ribonukleotid reduktase
TCR	- T-celle reseptor
TDM	- therapeutic drug monitoring (legemiddelmonitorering)

$T(A)_{\min}$ - tidspunkt for minimum enzymaktivitet

t_0 - tidspunkt for doseinntak

t_{\max} - tidspunkt for maksimum plasmakonsentrasjon

tx - transplantasjon

UDP - uridindifosfat

UGT - uridindifosfat glukuronosyltransferaser

UV - ultrafiolett

XMP - xantin monofosfat

1. Innledning

1.1 Transplantasjon

Transplantasjon defineres som overføring av celler eller vev fra et individ til et annet, og kan deles inn i flere typer. Den viktigste form for organtransplantasjon er såkalt allogen transplantasjon. Med allogen transplantasjon menes overføring av celler eller vev mellom genetisk forskjellige individer innenfor samme art. I 1954 ble verdens første organtransplantasjon gjennomført. Dette var en nyretransplantasjon hvor giver og resipient var genetisk identiske. Når det gjelder levertransplantasjon, ble det første forsøket utført i Denver, USA, i 1963. I 1971 ble det første forsøket gjort i Norge, og det påfølgende året overlevde en pasient 53 dager med sitt implantat ved Ullevål sykehus. Første levertransplantasjon med moderne immunsupprimerende behandling i Norge ble utført i 1984 av et team ledet av Audun Flatmark på Rikshospitalet. (1)

I dag er levertransplantasjon en vanlig prosedyre, og i 2007 ble det gjennomført 72 transplantasjoner av lever på Rikshospitalet (2). Slike transplantasjoner utføres hos pasienter som har komplikasjoner og symptomer grunnet progressiv irreversibel leversykdom. Eksempler som kan gi slike komplikasjoner er akutt leversvikt (eksempelvis viral hepatitt), pasienter som er ved endestadium av kronisk leversykdom (primær scleroserende cholangitt (PSC)) og malign sykdom (levercancer). (3)

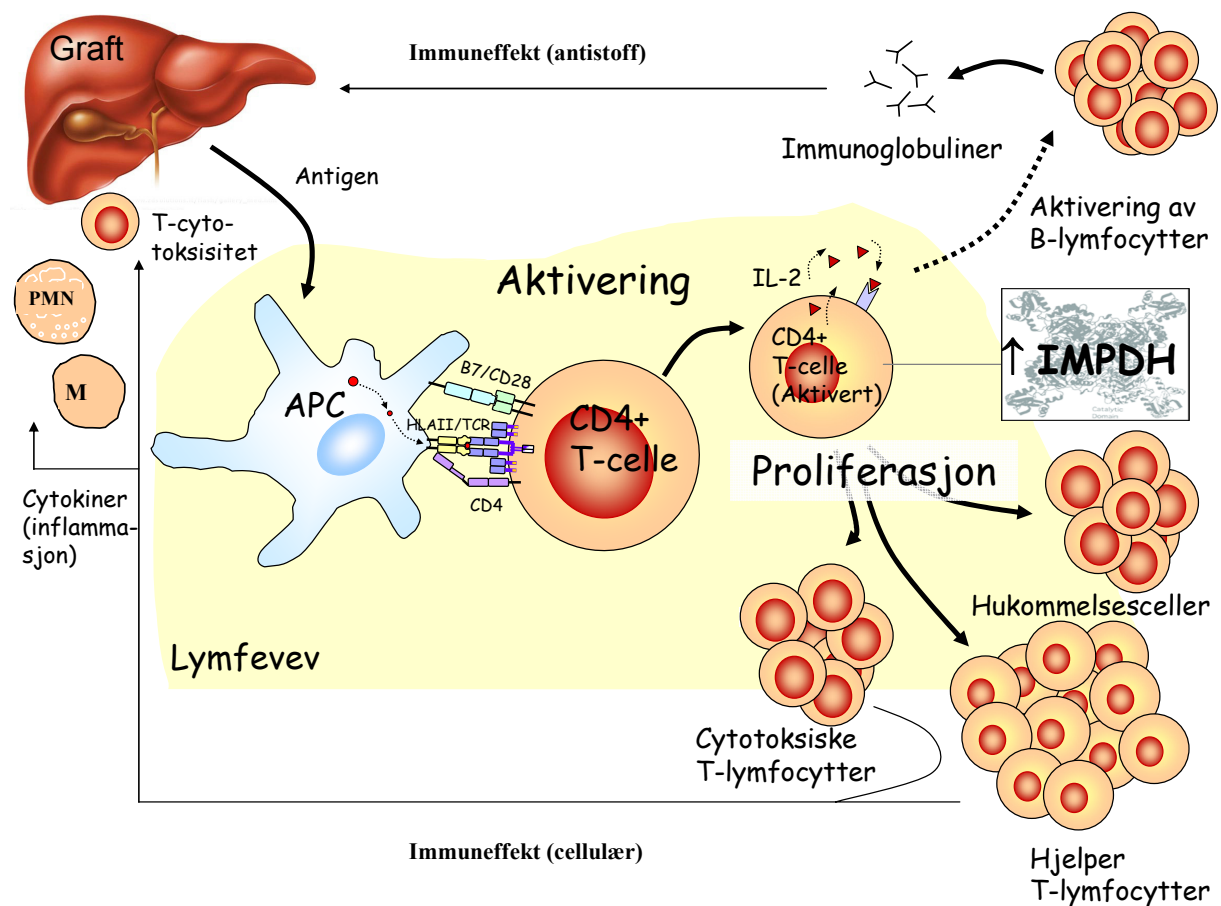
For at utfallet av en transplantasjon skal bli best mulig, velges donor ut fra grad av forlikelighet mellom blodtypene, samt vevstypeforlikelighet mellom donor og resipient. Blodtypen klassifiseres etter ABO-systemet, hvor A, B og O beskriver hvilke blodtypeantigen individets erytrocytter har. Antigen er uttrykt hos alle nukleære celler. Erytrocyttene kan ha antigen av typen A og/eller B eller ingen av de to, som vil si at man har blodtype O. Vi har dermed fire forskjellige blodtyper; A, B, AB og O. Dersom en person har

blodtype A, vil B-lymfocytter produsere antistoff mot antigen B. En person med blodtype A kan dermed ikke uten videre motta transplantat fra en person med blodtype B. De naturlig forekommende antistoffene som er mest aktuelle i transplantasjonssammenheng er immunoglobulin M (IgM). For at en transplantasjon skal bli mest mulig vellykket tilstrebes ABO identitet. Dersom donorkvaliteten er god, eller situasjonen er kritisk, kan man benytte ABO-*forlikelig* lever. Det vil si at man kan for eksempel bruke lever fra donor med blodtype O til resipient med blodtype A, men i slike tilfeller vil det være økt risiko for komplikasjoner. (3,4) I senere tid er det også tatt i bruk spesielle behandlingsprotokoller som tillater transplantasjon av nyre mellom blodtypeuforlikelig donor og resipient.

Vevstypemolekyler kalles Major Histocompatibility Complex (MHC). Hos mennesker kaller man MHC-molekylene for Human Leucocyte Antigen (HLA). HLA-molekylene utviser stor grad av polymorfisme, og et sett gener er som regel alltid forskjellig fra individ til individ. HLA deles inn i klasse I og klasse II. HLA klasse I finnes hos flesteparten av kroppens nukleære celler, og subgrupperes videre til HLA -A, -B og -C. Disse molekylene binder peptider som stammer fra proteiner produsert i cytosol. Deretter vandrer komplekset til celleoverflaten, hvor HLA presenterer peptidet til CD8+ T-lymfocytter. HLA klasse II finnes normalt hos monocytter, B-lymfocytter og dendritiske celler. Disse kalles antigenpresenterende celler (APC). HLA klasse II finnes også i tre forskjellige varianter; henholdsvis HLA -DP, -DQ og -DR. Disse molekylene binder både peptider fra cytosol og peptider som stammer fra endocyterte proteiner. Peptidene presenteres så til CD4+ T-lymfocytter som interagerer med HLA-kompleksene gjennom sine T-celle reseptorer (TCR). (4,5)

Den allogene immunreaksjonen (se figur 1) starter med antigen fra det transplanterte organet som blir tatt opp og prosessert av APC hos mottaker. Deretter blir dette presentert i peptidform av HLA på celleoverflaten. Det fremmede peptidet vil bli oppdaget av T-lymfocytter som binder seg til HLA komplekset. Ved binding aktiveres lymfocytten, hvilket utløser intracellulære reaksjoner som blant annet fører til proliferasjon. Cytotoksiske T-lymfocytter

som så blir dannet vil angripe celler som er bærere av fremmede antigen. Et annet fenomen som oppstår ved den cellemedierte immunresponsen er produksjon av cytokiner fra T-hjelperlymfocytter, som resulterer i inflammasjon og invasjon av makrofager og polymorfnukleære lymfocytter (PMN) i vev (transplantatet). Aktiverte lymfocytter vil også kunne aktivere B-lymfocytter som gir produksjon av HLA-antistoff rettet mot fremmede antigen. Den viktigste kilden til fremmede proteiner fra et transplantat er HLA-molekylene i transplantatet. Dersom HLA-molekylene er uforlikelige, blir immunreaksjonen spesielt kraftig. (6)



Figur 1 Den allogene immunreaksjon

Figuren er modifisert etter figur 1, Bergan et al (6)

Det skilles mellom tre hovedtyper reaksjoner, avhengig av tidspunkt etter transplantasjonen og hvilke typer immunologiske reaksjoner som oppstår:

1. Hyperakutt reaksjon skjer fra minutter til 24 timer posttransplantasjon. Den skyldes tidligere dannede antistoffer rettet mot fremmede HLA klasse I-molekyler eller ABO-blodtypeantigener. (6)
2. Akutt reaksjon kommer som regel fra et par uker til måneder etter transplantasjonen, men kan også komme flere år etter dersom immunsuppressiv behandling svikter. Denne typen reaksjon skyldes i hovedsak aktiverte T-lymfocytter som har reagert med fremmede peptid/HLA komplekser. Stor grad av undertrykkelse av immunforsvaret ved hjelp av immunsuppressiva kan ofte stoppe avstøtningsprosessen. (6)
3. Kronisk reaksjon oppstår fra måneder til år etter transplantasjon og skyldes et samspill av forskjellige faktorer. Graftet mister gradvis sin funksjon. Den kroniske typen er dårligere kartlagt enn de to foregående reaksjonene, og derfor er også terapien vanskelig å optimalisere. Dagens metoder ser ut til å ha dårlig effekt hos pasienter med kronisk reaksjon. (6)

1.2 Immunsuppressiv behandling

Avstøtningsreaksjoner oppstår alltid etter allotransplantasjoner. Immunforsvaret oppfatter transplantatet som fremmed, og setter i gang en immunologisk reaksjon for å uskadeliggjøre de fremmede cellene. Dette kan til slutt føre til reaksjon. Derfor er det viktig å dempe resipientens immunforsvar ved hjelp av immunsupprimerende legemidler. Ved å kombinere flere forskjellige legemidler med ulike angrepspunkt kan man få en synergistisk effekt. Synergisme er positivt ved at man kan bruke lavere dose av hvert enkelt legemiddel, og dermed unngå alvorlige bivirkninger. På Rikshospitalet brukes et trippelregime som protokoll for behandling av

levertransplanterte. Behandlingen består av steroider (som oftest prednisolon), takrolimus (Prograf®) og mykofenolatmofetil (CellCept®) (3). Pasienter med takrolimusintoleranse, eller andre problemer som tilsier det, kan få ciklosporin (Sandimmun Neoral®) i stedet.

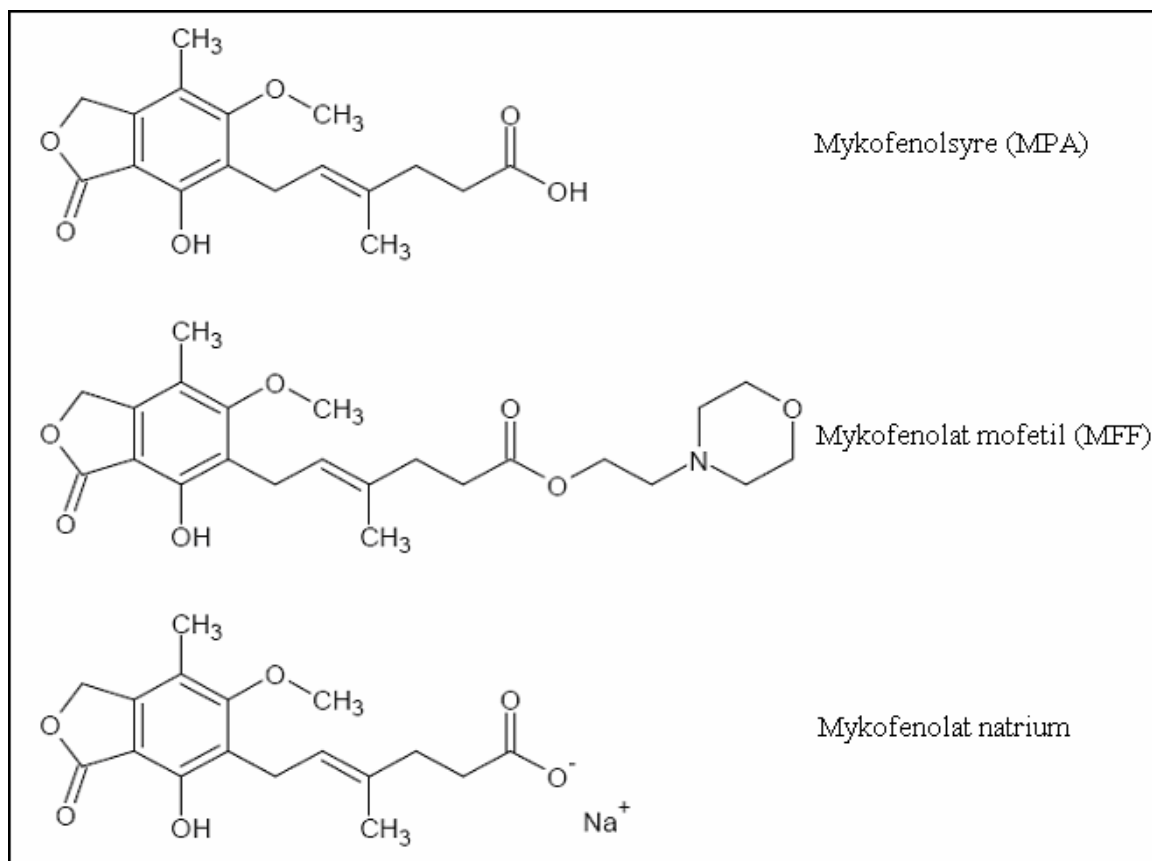
Før introduksjon av ciklosporin bestod den immunsuppressive behandlingen i hovedsak av azatioprin og prednisolon. I tiden etter at ciklosporin ble innført, ble det en periode benyttet dobbeltregime, med ciklosporin og steroid. Etter kort tid valgte man å ta i bruk azatioprin igjen, fordi dette kunne bidra til lavere dosering av de to førstnevnte.

Mykofenolat produseres av forskjellige arter fra soppfamilien *Penicillium* (7), og ble oppdaget av Gosio i 1893. Substansen ble funnet å ha en svak antibiotisk effekt. En japansk gruppe var den første til å beskrive den immunsuppressive effekten til MPA i 1969 (8). På 1970-tallet var det stor interesse rundt mykofenolat med psoriasis som indikasjon. Nok en gang ble den immunsuppressive effekten observert, men det ble ikke satset på reaksjonsprofylakse som indikasjon. Det var på bakgrunn av et prosjekt, initiert av Tony C. Allison og Hans W. Sollinger i 1988, at U.S. Food and Drug Administration (FDA) i 1995 godkjente MPA med indikasjonen profylakse mot akutt reaksjon etter nyretransplantasjon. Mykofenolat ble standardbehandling ved nyretransplantasjoner mye på bakgrunn av multisenterstudier som ble gjort av grupper fra USA, Europa og en trikontinental gruppe (Canada, Europa og Australia) på omtrent samme tid. Resultatene fra de tre studiene ble slått sammen, og det ble vist at mykofenolat, sammen med ciklosporin og kortikosteroider, reduserte antallet reaksjoner signifikant i forhold til azatioprin, ciklosporin og kortikosteroider som var standard på den tiden. Samtidig var overlevelsen til graftet upåvirket. Resultatet var likt for 2 og 3 g MPA per dag, men dosen på 2 g ble bedre tolerert enn den på 3 g og ble derfor foretrukket. (9,10)

Mange av pasientene som levertransplanteres, kan ha risiko for å utvikle hepatorenalt syndrom, og en del får annen nyrepåvirkning postoperativt. Trippelbehandlingen med glukokortikoider, takrolimus og MPA antas å

reduere nyrekomplikasjonene (11). Det er ønskelig at pasientene fortsetter på mykofenolat, men legemiddelet må ofte seponeres på grunn av bivirkninger. Dersom man må seponere eksponeringen for mykofenolat må dosen av andre immunsuppressiva (kalsineurinhemmere) økes, og dermed øker også risikoen for nedsatt nyrefunksjon. (3)

Mykofenolsyre finnes i dag kommersielt som den aktive komponenten i to legemiddelformuleringer: mykofenolatmofetil og EC (enteric coated) mykofenolat natrium (figur 2). Mykofenolatmofetil (MMF) er 2,4-morfolinetylesteren av mykofenolat, og produseres av Roche Pharmaceuticals i form av CellCept®. Prodruget ble laget fordi den biologiske tilgjengeligheten til MPA er relativt lav. CellCept® er formuleringen som brukes mest i Norge, og som på bakgrunn av dette har blitt brukt i studien denne oppgaven baserer seg på. EC mykofenolat natrium er natriumsaltet til MPA. Saltet er tilgjengelig som en enterotablett, Myfortic®, laget av Novartis Pharmaceuticals. Årsaken til at vi skiller mellom de to i oppgaven er at det er forskjeller i farmakokinetikken formuleringene utviser.



Figur 2 Strukturformler av MPA, MMF og mykofenolat natrium

1.3 Mykofenolat - farmakologi

1.3.1 Farmakokinetikk

Etter oral administrering av MMF skjer en rask hydrolysering av prodruget til den aktive formen av legemiddelet. Hydrolyseringen blir utført av esteraser i mage, tynntarm og diverse vev. Deesterifiseringen skjer raskt, og MMF plasmakonsentrasjon er under deteksjonsgrensen til enhver tid etter oral dose på 1,5 gram hos friske frivillige. De friske frivillige har en rask og fullstendig absorpsjon, hvor maksimum plasmakonsentrasjon oppstår etter gjennomsnittlig 0,99 timer ($\pm 0,41$ timer). Halveringstiden er beregnet til å være $17,9 \pm 6,5$ timer, men tallet er kalkulert med stor usikkerhet på grunn av at enterohepatisk resirkulering vil interferere med beregningene. (12)

Absorpsjonen av MPA er ekstensiv, hvor flere populasjoner viser en biotilgjengelighet på over 90 %. Hos friske frivillige er det vist et gjennomsnitt på 94 % (12), og hos pasienter som har gjennomgått hjertetransplantasjon er det vist et gjennomsnitt på 95 % (13). Nyretransplanterte pasienter ser ut til å ha en nedsatt biotilgjengelighet i forhold til de tidligere beskrevne populasjonene med et gjennomsnitt på 81 % (14). En studie av levertransplanterte viser til resultater som skulle tilsi at biotilgjengeligheten hos denne pasientpopulasjonen er lavere enn hos andre transplantasjonspopulasjoner (15). Det ser ut som om pasientene har redusert opptak av MPA, i forhold til friske frivillige, men også i forhold til hva som tidligere er observert hos andre transplantasjonspopulasjoner.

Etter at MPA er absorbert og har nådd sirkulasjonen, bindes 97-99 % av forbindelsen til serumalbumin hos pasienter med normale lever- og nyrefunksjoner. Plasmaproteinbindingen er avhengig av albuminkonsentrasjonen, men uavhengig av mykofenolatkonsentrasjonen over et stort konsentrasjonsområde. (16) Hos pasienter med leversykdom er vanligvis produksjon av albumin redusert. Dette må tas med i betraktning ettersom albumin er det viktigste plasmaproteinet med hensyn til binding av

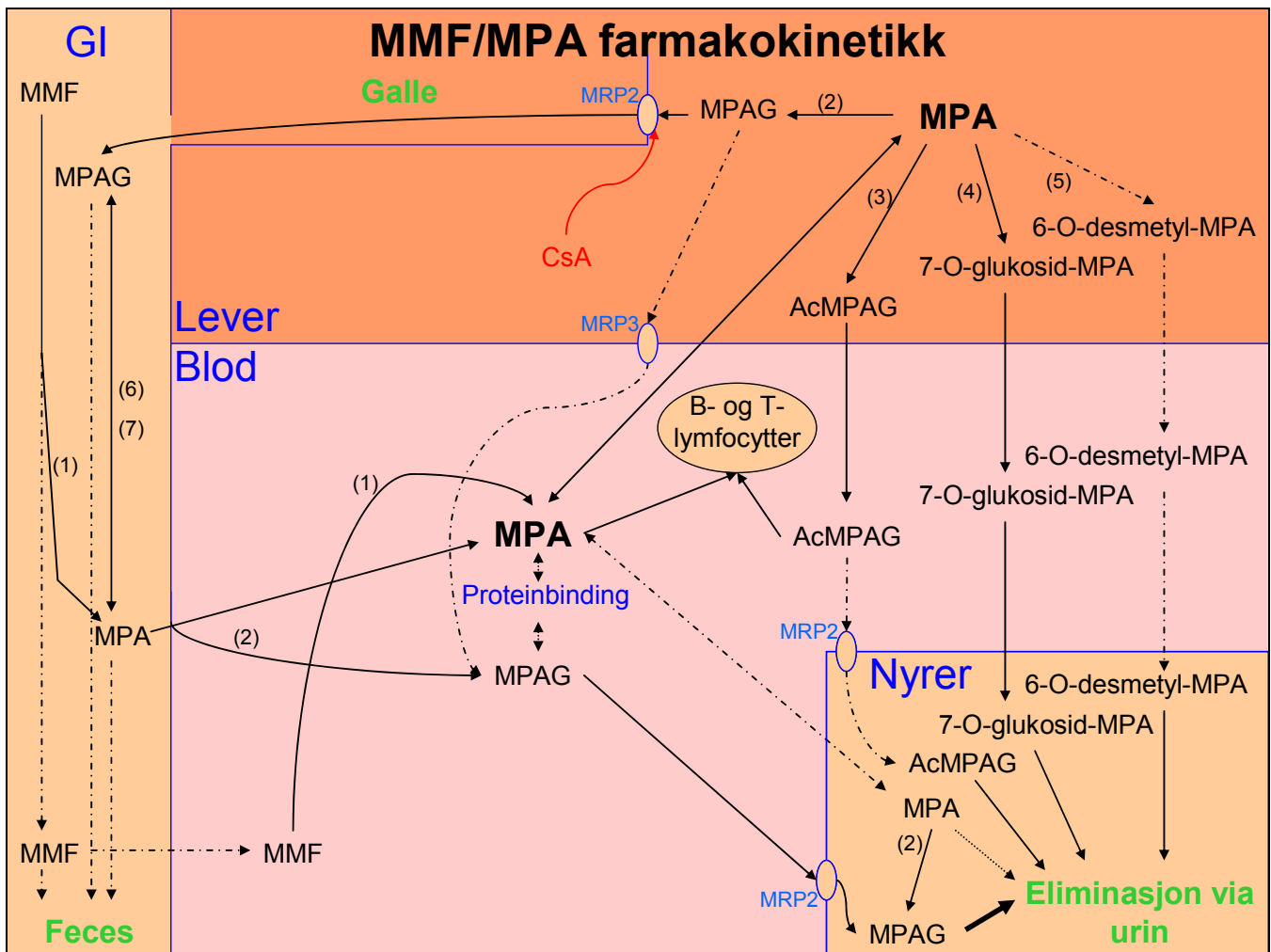
MPA. Hypoalbuminemi og hyperbilirubinemi oppstår ofte i tidlig posttransplantasjonsperiode. Begge tilstandene vil gi økt fri fraksjon av MPA. Etter pasienten har mottatt ny frisk lever, vil produksjonen av albumin øke mot normale nivåer ettersom den nye leveren syntetiserer proteinet. Dermed ser bindingsgraden av MPA ut til å øke med tiden etter transplantasjonen. MPA er et low-clearance legemiddel, og clearance vil derfor i stor grad påvirkes av proteinbindingsgraden. (17)

Metabolisme av MPA foregår i lever, tarmvegg og nyrer hovedsaklig ved glukuronidering utført av uridindifosfat (UDP) glukuronosyltransferaser. UDP glukuronosyltransferasene (UGT) utviser polymorfisme, og finnes i flere ulike isoformer. Ulike UGT1-isoformer, samt UGT-2B7, gir den kvantitativt største metabolitten MPA glukuronid (MPAG). Metabolitten er farmakologisk inaktiv med tanke på inhibering av målenzymet, inosin-5'-monofosfat dehydrogenase (IMPDH). Omdannelsen fra MPA til MPAG er det hastighetsbestemmende ved clearance av MPA (18). Hovedmetabolitten er til stede i plasmakonsentrasjoner som er 20-100 ganger høyere enn MPA. Glukuronidert MPA, blant annet elimineres med galle, kan bli dekonjugert tilbake til MPA av bakterier i tarmen som en del av enterohepatisk resirkulering (12,19). Det er kjent at 30-40 % av MPA eksponering kan være sekundært på grunn av denne resirkuleringen, hvilket gir en karakteristisk sekundær topp i en dose-respons kurve hos pasienter eksponert for MPA (12,19,20). Minst 2 andre metabolitter dannes. Den ene, acylMPAG, er farmakologisk aktiv sammenliknbar med MPA. Generelt er acylglukuronider reaktive, elektrofile metabolitter som kan forårsake vevsskade. Det er mulig at denne reaktiviteten kan bidra til hypersensitivitet, toksisitet og immunrespons hos pasienter som mottar MPA. Den andre metabolitten, et 7-O-glukosid, ser ikke ut til å påvirke aktiviteten til IMPDH. Det er også holdepunkter for fase I metabolisme av cytokrom P450 3A isoformer (21). (19,22)

Etter oral administrering av MMF kan man finne spor etter prodrug, den aktive substans samt dennes metabolitter som tyder på at ekskresjonen går via forskjellige ruter. Mesteparten skilles ut gjennom nyrene, hovedsaklig som

MPAG, men små mengder MPA og AcMPAG kan også detekteres i urin. I og med at MPA og MPAG i stor grad er proteinbundet, kan ikke tubulær sekresjon forklare total clearance av MPA/MPAG. Det er foreslått at multi-drug resistance protein 2 (MRP-2) i den apikale membranen til nyrecellene står for aktiv sekresjon (23). MPAG og AcMPAG ser også ut til å kunne bli skilt ut gjennom aktiv tubulær ekskresjon, sannsynligvis gjennom det samme proteinet. Data som er kommet fram til nå tyder på at MPA er gjenstand for renal reabsorpsjon som involverer enten passive eller aktive mekanismer (12). Litt av den administrerte dosen (MMF), samt MPA og MPAG, vil man kunne finne igjen i avføring. Molekyler som gjennomgår fekal eliminasjon er molekyler som ikke har blitt absorbert enten ved første gangs passasje gjennom gastrointestinaltrakten (GI) eller etter to eller flere passasjer (enterohepatisk resirkulering). MRP-2 antas å stå for transporten av MPAG til galle. Det ser også ut til at MPAG kan bli transportert tilbake til blodbanen ved hjelp av MRP-3 i leveren (24,25). (19) Kinetikken rundt MMF og MPA er oppsummert i figur 3.

Stor intra- og interindividuell variabilitet i farmakokinetikken til MPA er observert hos pasienter som har gjennomgått transplantasjon (17,26-30). Hos levertransplanterte ser det ut til at den interindividuelle kinetiske variabiliteten er mer utstrakt enn hos andre transplanterte pasientgrupper (18), men foreløpig er det lite data som er hentet inn fra pasientgruppen. Derfor er det ønskelig å sette fokus på blant annet intra- og interindividuell variabilitet hos denne pasientpopulasjonen i oppgaven. Variabiliteten observeres i alle elementer som beskriver et legemiddels kinetikk; absorpsjon, distribusjon, metabolisme og eliminasjon (ADME). Faktorer som bidrar til variabilitet kan for eksempel være endringer i: tarm- og gallefunksjon, proteinbindingsgrad, funksjonen til metaboliserende/eliminerende organ og samtidig bruk av legemidler som kan være nefrotoksiske. (17) Dersom variabiliteten er så stor at det går ut over den kliniske responsen til legemiddelet, vil dette være et tema som er viktig å sette fokus på.



Figur 3 Oppsummering av MMF og MPAs kinetikk. (1) Karboksylestereaser hydrolyserer MMF til MPA. (2) UDP-glukuronosyltransferase-1A9 (UGT1A9) og -2B7 (UGT2B7) er de isoformene som primært glukuroniderer MPA til MPAG. Dette er sannsynligvis på grunn av at de er mye uttrykt i hepatisk, renalt og testinalt vev. UGT1A7, -1A8 og 1A10 produserer også MPAG, men disse er kun uttrykt i GI og nyrene. (3) UGT2B7 glukuroniderer MPA til AcMPAG. (4) UDP-glukosyltransferase glukosylerer MPA til MPA-7-O-glukosid. (5) CYP3A (cytokrom P450 3A isoformer) antas å produsere minst 50 % av 6-O-desmethyl-MPA som blir produsert. (6) Bakterier i tarm dekonjugerer MPAG til MPA i tarmen. (7) UGT1A9 glukuroniderer MPA til MPAG

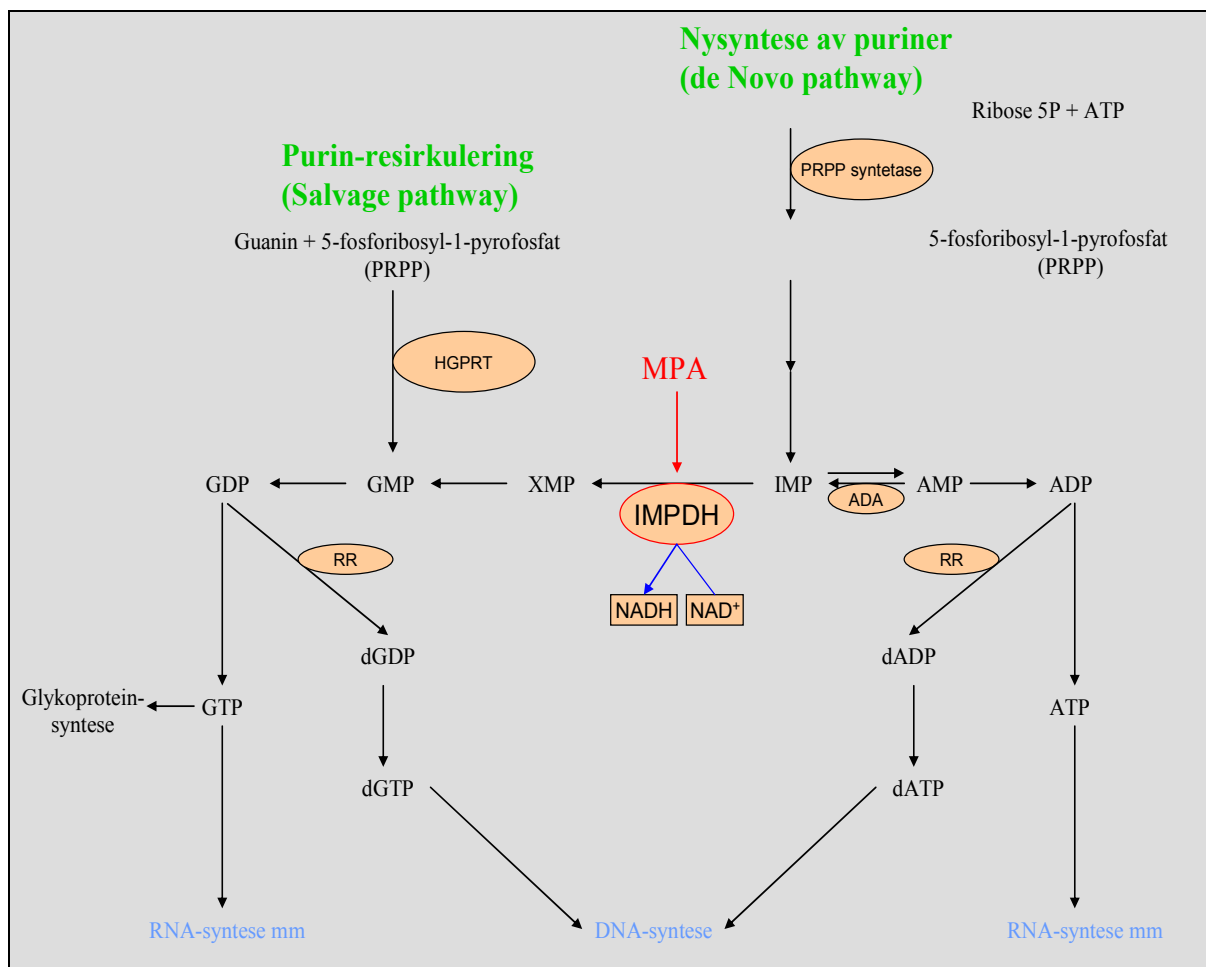
1.3.2 Farmakodynamikk

Målenzymet til mykofenolsyre er IMPDH. Enzymet katalyserer direkte det hastighetsbestemmende trinnet i biosyntesen av guaninnukleotider, oksidering av inosinmonofosfat (IMP) til xantinmonofosfat (XMP). Den enzymatiske reaksjonen skjer ved tilstedeværelsen av nikotinamidadenindinukleotid (NAD^+). Den enzymatiske reaksjonen skjer

gjennom cellenes såkalte *de novo* biosyntese (se figur 4), som er cellenes måte å nysyntetisere purinnukleotider på. (31) Når purinbiosyntesen går som normalt i cellen binder IMPDH seg først til IMP. Deretter bindes NAD^+ , og redusert form av NAD^+ (NADH) spaltes av før XMP produseres. Dersom MPA er til stede i cellen, vil substansen bindes til IMPDH-XMP komplekset etter at NADH er spaltet av, slik at XMP ikke produseres (32,33). MPA inhiberer IMPDH ved å inngå sterke bindinger med enzymet (lav K_i – se figur 5). Bindingen er non-kompetitiv i forhold til IMP og NAD , men er reversibel dersom man tilfører eksogent guanin (34,35). Den enzymatiske aktiviteten til IMPDH utøves av to separate isoenzymer, type I og type II. Hver av dem bestående av 514 aminosyrer med 84 % sekvenslikhet. En studie har rapportert at IMPDH type II er 4,8 ganger mer sensitiv for inhiberingseffekten til MPA enn type I. (36)

Ikke-lymfoide celler kan benytte seg av to forskjellige omsetningsveier for syntese av purinnukleotider. Grunnen til at de disse cellene i tillegg til nysyntese av puriner også kan resirkulere (*salvage*) guaninnukleotider er at de uttrykker enzymet hypoksantin-guanin-fosforibosyltransferase (HGPRT). Det ser ut som om T- og B- lymfocytter uttrykker HGPRT i mindre grad, og dermed er mer avhengige av *de novo* biosyntese for tilstrekkelig purinnukleotidsyntese i forbindelse med proliferasjon enn andre celletyper. Dette gjør at man kan se en slags målstyring mot lymfocytter ved at disse cellene er mer ømfintlige ovenfor IMPDH-inhibering enn andre celler. Den cytostatiske effekten til MPA har blitt vist å være omtrent fem ganger mer potent på lymfocytter enn på fibroblaster og andre celletyper (36). Et annet aspekt som kan være med på forklare målstyringen mot lymfocytter er at isoenzymene er uttrykt forskjellig hos de forskjellige celletypene. Dermed vil MPA som følge av bindingsaffiniteten til de to isoenzymene ha bedre effekt hos celler som i større grad har IMPDH type II aktivitet. Dette er i følge Carr et al tilfellet hos lymfocyttene (36). Det er imidlertid sannsynlig at begge isoformer må inhiberes for å bremse proliferasjonen (37,38). Ved å inhibere IMPDH tømmes lymfocyttenes lager av guanosinnukleotider. Cellene har behov for dATP og dGTP til syntese av deoksyribonukleinsyre (DNA) og

celledeling (proliferasjon). Når cellene tømmes for guanintrifosfat (GTP) og deoksyguanintrifosfat (dGTP), vil celleprogresjonen stoppe opp i fase G1 hos aktiverte T-lymfocytter (35). Guanoinnukleotidene er også nødvendige for syntese av henholdsvis glykoproteiner og ribonukleinsyre (RNA) (transkripsjon). (31)



Figur 4 Biosynteseveiene til purinene. IMP har en sentral rolle i biosynteseveiene. MPA inhiberer IMPDH, og tømmer dermed cellen for GDP, og følgelig GTP og dGTP. Et av de hastighetsbestemmende enzymene, PRPP syntetase, inhiberes av IMP, AMP og GMP via negative tilbakekoblingsmekanismer. (39)

Figuren er modifisert etter figur 1, Allison and Eugui(31)

Tidligere er det vist at det er et tett, inverst konsentrasjon-aktivitetsforhold mellom MPA og IMPDH i fullblod hos nyretransplanterte pasienter (40). Studien sammenliknet korrelasjonen med transplantasjonspasienter som ikke mottok MPA, og viste at enzymaktivitetsnivået hos disse var mer stabilt. Studien viste dermed at inhibering av IMPDH er en del av

farmakodynamikken til mykofenolat. Det tette forholdet mellom MPA og IMPDH er ikke vist i isolerte CD4+ celler, og heller ikke hos levertransplanterte pasienter.

Dersom vi ser på genene som koder for isoenzymene, *IMPDH I* og *IMPDH II*, er de lokalisert på forskjellige kromosomer (henholdsvis 7q31.3-q32 og 3p21.2-p24.2 (41,42)) *IMPDH I* og *-II* er uttrykt hos de fleste av kroppens celler, men data tyder på at de reguleres på transkripsjonelt nivå og at reguleringen av dem er forskjellig (38,43). Tidligere er det vist at isoenzymgenene hos lymfocytter oppreguleres ved aktivering (44,45). Ekspresjonen av *IMPDH* etter transplantasjon (nyre) og initiering av immunsuppressiv terapi øker for begge isoenzymene (43). Oppreguleringen ser ut til å korrelere bra med administrasjonen av glukokortikoider, og er sannsynligvis relatert til denne. Til støtte for dette ser man at de initiale ekspresjonsendringene har store likheter med endringene som oppstår når pasienter behandles for akutt rejeksjon. Rejeksjonsbehandlingen består blant annet av glukokortikoider i høye doser. T-lymfocytene påvirkes også av glukokortikoider ved at proliferasjon inhiberes gjennom blokade av vekstfaktoren IL-2, at lymfocytene redistribueres fra sirkulasjonen til andre deler av kroppen og ved å indusere apoptose (46). Dette er fenomenene som ligger til grunn for at man ser en nedgang i antallet CD4+ celler som blir isolert postdose i forhold til predose. (43)

MPA er assosiert med høy innsidens av gastrointestinale - (diaré, kvalme, brekninger og blødninger), hematologiske - (leukopeni, trombocytopeni) og andre bivirkninger (ex sirkulasjonsforandringer, opportunistiske infeksjoner) (47). Bivirkningene ser ut til å ha multiple årsaker, og det er vanskelig å tilkjenne disse egenskapene en bestemt faktor (48). I en studie som så på bivirkninger av MPA i forhold til farmakokinetiske variabler, måtte 42 % av pasientene redusere den initiale doseringen av MPA på grunn av uønskede virkninger (49).

1.3.3 Interaksjoner av klinisk betydning

En studie har sett på effekten av steroider på mykofenolsyre ved administrering basert på et trippelregime med CsA, MPA og steroider. Steroidene ble etter hvert trappet ned og til slutt seponert. AUC_{0-12} for MPA økte i forhold til nedtrappingen av kortikosteroider, samtidig som det ble observert en nedgang i plasmakonsentrasjonen til MPAG ved seponering av steroidene. Resultatene bygger opp under tidligere hypoteser om at steroider inducerer ekspresjonen av UGT. (50)

Ved koadministrering av MPA og ciklosporin vil plasmakonsentrasjonen til MPA være redusert i forhold til hva som er tilfellet ved samtidig administrasjon av takrolimus. Fenomenet ser ut til å skyldes at CsA hemmer MRP-2 som normalt pumper MPAG ut i gallen, men til nå er det kun dyreforsøk som har vist dette. Dersom CsA også hemmer MRP-2 hos mennesker, vil det si at den enterohepatiske resirkuleringen av MPA hemmes ved inntak av CsA. Sekundærtoppen i et konsentrasjon-tid plot hos en slik pasientgruppe ville da være mindre, og nesten ikke til stede hos disse pasientene i forhold til pasientene på et takrolimusbasert regime (51). (52) Et annet fenomen som oppstår ved nedsatt ekspresjon av MRP-2, er at MRP-3 oppreguleres (24,25). En hypotese vil være at dette er grunnen til de høye nivåene av MPAG i plasma hos ciklosporinbehandlede pasienter i forhold til pasienter som får takrolimus som kalsineurinhemmer (53) (se figur 3).

Suppresjon av immunsystemet gjør kroppen mer mottakelig for infeksjoner, inkludert opportunistiske infeksjoner og alvorlige infeksjoner med bakterier, virus og sopp. Et eksempel er infeksjon av cytomegalovirus (CMV) som 60 % av voksne er bærere av, men som normalt gir en latent infeksjon. Herpesviruset vil kunne gi klinisk sykdom dersom immunforsvarets responser på sykdom dempes. (47,54) Infeksjon med CMV kan forebygges og behandles med ganciklovir. Et problem er at ganciklovir kan gi diaré og andre gastrointestinale plager. I tillegg er leukopeni et problem både ved administrering av legemiddelet og som følge av virusinfeksjonen. Begge bivirkningene er klassifiserte som hyppige ($>1/100$) for ganciklovir, og

samsvarer med bivirkninger som frekvent blir observert ved behandling med MPA (55). Andre immunsuppressiva, som for eksempel takrolimus, gir ofte gastrointestinale bivirkninger (56). I tillegg kan det store kirurgiske inngrepet i tidlig postoperativ fase lede til plager relatert til mage- og tarmsystemet. Med så mange potensielle bivirkningsårsaker, er det ofte vanskelig å identifisere hvilket legemiddel som eventuelt er årsaken. Ofte leder allikevel denne typen bivirkninger til redusering av dosen eller i verste fall seponering av MPA. (47)

1.4 Farmakologisk monitorering

Therapeutic drug monitoring (TDM) kan man definere som laboratoriemåling av et legemiddels farmakologiske parametere med formål å individualisere terapi. Prinsippet som gjelder er at man ønsker å bruke den laveste effektive dosen for å unngå unødvendige bivirkninger. På norsk sier man ofte at man individualiserer pasientenes behandling, eller skreddersyr den til den enkelte pasient.

Ettersom den kliniske bruken av MMF har økt, og nye data har kommet frem, har det blitt klart at MPA deler mange av egenskapene sine med legemidler som i dag trenger monitorering: variasjoner i farmakokinetikk- og farmakodynamikkforhold, interaksjonspotensial, og variert klinisk respons. Argumentasjonen for monitorering av MPA, er at monitorering vil kunne bedre nytte/risiko indeksen til legemiddelet, og dermed også forbedre de gode resultatene man allerede har ved bruk av MPA. Ofte seponeres MMF på grunn av bivirkninger, og i disse tilfellene øker man dosen av andre immunsuppressiva (kalsineurinhemmere) dersom pasienten trenger det. Dermed økes risikoen for nedsatt nyrefunksjon. Derfor er det ønskelig at pasienten holdes på MMF. Dette er en problematikk som har ført til at kliniske miljøer har etterlyst enklere måter å bestemme doseringen til hver enkelt pasient på.

Målt på et enkelt tidspunkt har ikke plasmakonsentrasjonen til MPA vist sterk korrelasjon med behandlingsresultat, verken i form av bivirkninger eller

releksjonsfrekvens. At farmakokinetisk monitorering basert på et prøvetidspunkt er så vanskelig kan man se ut i fra at dose-responskurvene fra pasient til pasient har veldig forskjellig profil. Av de monitoreringsmetodene vi kjenner i dag, er predose troughprøver den som er enklest i bruk og mest økonomisk (57). Troughverdier er konsentrasjon målt rett før ny dose gis. Dessverre har det vist seg at troughverdier er mer variable enn AUC verdier, og korrelerer også dårlig med disse (18). Den dårlige korrelasjonen skyldes antakelig varierende enterohepatisk resirkulering, og dermed også hvilken type kalsineurinhemmer som brukes. Det er motstridende data når det gjelder sammenheng mellom trough og kliniske endepunkter og bivirkninger (57-59).

AUC-verdier for hele doseintervallet vil gi det totale bildet av et individs eksponering for MPA. Dersom man ser på sammenhengen mellom MPA AUC og behandlingsresultat er denne god (60). Man kan dermed definere et terapeutisk område for AUC som reduserer risikoen for akutt releksjon (18). Det store problemet med $AUC_{0-12/tot}$ -monitorering er at det er dyrt, upraktisk, tidskonsumerende og lite pasientvennlig (57). Dette er forhold som gjør denne type monitorering upassende som rutine-monitorering.

En måte å forenkle AUC_{0-12} på, er å bruke færre måletidspunkter for å estimere AUC_{tot} . Man bruker da eksempelvis tre-fem måletidspunkter, estimerer AUC_{0-12} ut fra en algoritme eller ved hjelp av Bayes metoder, for så å endre doseringen til pasienter slik at verdiene ligger innenfor et gitt intervall. Denne måten å monitorere på har vist signifikant reduksjon i releksjonsfrekvens, samtidig som antall bivirkninger er upåvirket (61).

Metodene som er beskrevet til nå er farmakokinetiske monitoreringsmetoder. En annen mulighet vil være farmakodynamisk monitorering som kan gjøres ved å gjøre målinger på målenzymet til MPA, IMPDH.

2. Formål

Formålet med oppgaven er å beskrive farmakodynamiske- og farmakokinetiske forhold ved mykofenolat hos levertransplanterte pasienter. Oppgaven inngår som en beskrivende del av en større studie (Monitoring of mycophenolate by IMPDH in liver tx; Monomix) på Rikshospitalet.

Målet til Monomix er å finne ett tidspunkt for prøvetaking som best kan karakterisere minimum IMPDH-aktivitet i CD4+ celler innen doseintervallet, og undersøke om dette er gyldig på ulike tider i det postoperative forløpet.

Den beskrivende studien vil forhåpentligvis gi data og informasjon som vil ligge til grunn for den prospektive studien. Eventuelle positive resultater vil bli brukt til å forbedre immunsuppressiv behandling, og dermed også livskvaliteten til pasientene som har gjennomgått en transplantasjon.

Det er få studier av levertransplanterte som kan gi støtte til anbefalt terapeutisk område for mykofenolat. Inntil videre følger man derfor de samme retningslinjer som er angitt for nyretransplanterte (62). Det er derfor ønskelig å gjøre studier på levertransplanterte pasienter for å utrede eventuelle forskjeller hos de to populasjonene som kan påvirke dynamiske- og kinetiske forhold vedrørende MPA.

3. Materiale og metoder

Reagenser og utstyr som er brukt i forbindelse med oppgaven er oppført i appendiks A.

3.1 Pasientrekruttering

Mastergradsprosjektet er del av en deskriptiv, åpen, ikke-randomisert studie uten intervensjon. Inkludering av pasienter til studien ble gjort av levertransplantasjonskirurg. Totalt er det planlagt å inkludere 15 pasienter i denne fase av studien. For mastergradsprosjektet ble det tatt peiling på å inkludere cirka de 5 første pasientene i studien. Skriftlig, informert, samtykke ble innhentet. Samtykket ble som regel innhentet i forkant av transplantasjon, men kunne også innhentes snarlig etter inngrep dersom forholdene tilsa det (akutte situasjoner). I en slik situasjon ble de innledende prøvene rekvirert på lik linje som hos inkluderte pasienter, men prøvene ble destruert dersom pasienten ikke samtykket i ettertid. Pasienter ble ekskludert fra studien dersom de var under 18 år, eller deltok i andre studier som intervenerte med terapien. De ville også bli ekskludert dersom klinisk vurdering foretatt av behandlende lege skulle tilsa det. Dersom pasienter ønsket det kunne de til enhver tid avslutte sin deltakelse i studien. Studien ble godkjent av Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk.

3.2 Immunsuppressivt regime

Det ble kun inkludert pasienter som startet med steroider, takrolimus og mykofenolat i henhold til standard immunsuppressiv protokoll ved levertransplantasjon (summarisk gjengitt i appendiks B) (63). Steroider (Solu-Medrol®), monoklonale antistoff (Orthoclone OKT 3®) og Antitymocyttglobulin (Thymoglobulin®) kunne bli benyttet som reaksjonsbehandling dersom kliniske forhold tilsa det. Den immunologiske

responser mot transplantatet er størst i umiddelbar fase etter transplantasjon, og derfor er også doseringen av legemidlene høyest i denne fasen (6). Steroidene initieres med høye doser, etter perioperative doser på 580 mg metylprednisolon i.v., gis prednisolon 40 mg 2 ganger daglig med påfølgende nedtrapping. Etter innledende standarddose (0,05 mg/kg/12 timer), blir takrolimusdosen individualisert ved farmakologisk monitorering som et hjelpemiddel i tillegg til kliniske observasjoner. MPA-administrering starter med doser på 1 g MMF 2 ganger daglig. Felles for alle legemidlene er at man gradvis senker døgndosen til lavest mulige vedlikeholdsdose ved fravær av reaksjoner. Dersom protokollen kan følges uten at det oppstår komplikasjoner ender steroidene opp med en vedlikeholdsdose på 5 mg daglig etter cirka et år og takrolimusdosen slik at fullblodkonsentrasjonen er halvert. MPA vil bli gitt som 1 g kun en gang daglig. (3)

3.3 Forsøksplanlegging

Som en del av forsøksplanleggingen til studien, ble det utført konsentrasjonsmålinger innen et doseintervall for hver av tre pasienter samt enzymaktivitetsmålinger for to av pasientene (appendiks C). Målingene ble utført for å se hvor mange prøver innenfor hvert doseintervall som var nødvendig, samt til hvilket tidspunkt prøvene skulle legges for å kartlegge profilene til de enkelte pasientene best mulig. På bakgrunn av undersøkelsene ble det konkludert at profilene var så forskjellige at 12 prøver ble ansett som nødvendig for å få med seg de forskjellige ekstrem- og vendepunktene. I tillegg ble det besluttet å ta med 2 prøver før dosen ble tatt. Predoseprøvene vil kunne forklare eventuelle uventede utslag som kan komme av at forrige dose for eksempel blir tatt for seint. De kan også være en kontroll på at dosen som skal inntas samme dag ikke allerede har blitt tatt ved tidspunkt 0. Kontrollen er at vi kan se en dalende tendens på kurven i forkant av doseinntak. Prøver ble bestemt tatt ved innkomst, samt på optimalt et doseintervall innen hver av fire utvalgte studieperioder i løpet av de 25

første dagene etter transplantasjon. De fire studieperiodene bestod av intervallene: dag 1-4, dag 5-10, dag 10-17 og dag ≥ 18 etter transplantasjon.

De forskjellige analysene vi skulle utføre hadde ulik prøveopparbeidelse, og ble gjort på ulike tidspunkt i forløpet. Derfor delte vi prøveglassene inn i prøveglass A, -B og C. Prøveglass A – C var EDTA glass (Vacutainer, jfr appendiks A, tabell AII) for å forhindre koagulering av fullblodet. Alle EDTA-glassene var 4 ml glass, bortsett fra prøveglass A som var 6 ml. I prøveplanen kan man se hvilke glass som ble brukt til hvilke tidspunkt (appendiks D). Prøveglass A ble splittet i tre til forskjellige analyser. 2 ml fullblod ble tatt ut til konsentrasjonsmåling av takrolimus (A_3). De resterende 4 ml ble sentrifugert, og 2 ml plasma ble tatt ut til konsentrasjonsmåling av MPA (A_1) og 2 ml fullblodlysate ble brukt for å se på IMPDH-aktivitet (IMPDHa) (A_2). I løpet av et doseintervall ga hver pasient 138,5 ml fullblod i tillegg til 36 ml i løpet av to intervaller predose. Det store volumet fullblod skyldes at det innsamlede prøvematerialet vil bli brukt i to parallelle studier.

3.4 Metoder

3.4.1 Konsentrasjonsbestemmelse av MPA

Metoden som er brukt i oppgaven er basert på en revers fase væskekromatografisk metode (HPLC) med UV-deteksjon utviklet av Svensson et al (64). Prøveopparbeidelsen var en enkel proteinutfelling ved bruk av fosforsyre 0,1 M i acetonitril. Blodprøven med fellingsreagens ble satt på vorteksmikser i cirka 5 sekunder, før den ble sentrifugert ved 10900 rpm i 3 min (Abbott bordsentrifuge). Minimum 25 μ l av supernatanten ble deretter overført til inserts for injisering i HPLC systemet.

HPLC systemet som brukes ved analyse av MPA består av en C8 forkolonne (Zorbax Eclipse XDB-C8, 2,1 x 12,5 mm, 5 μ m) som går over i en C18 separasjonskolonne (Zorbax SB-C18, 4,6 x 75 mm, 3,5 μ m). Mobilfasen, acetonitril/vann/fosforsyre pH 2,1, pumpes med 1,5 mL/min. Deteksjonen med

UV foregår i området 215 nm bølgelengde, og løpetiden for analysen er 10 minutter.

3.4.2 Bestemmelse av IMPDH-aktivitet

Metoden for å bestemme IMPDH-aktivitet i CD4+ celler som ble brukt i denne oppgaven er utviklet av Vethe og Bergan (65). Metoden er HPLC-basert for analyse av IMPDH-aktivitet, enten i fullblod eller i CD4+ celler som er isolert ved bruk av paramagnetiske kuler. IMPDH-metoden er modifisert i forhold til en metode publisert av Albrecht et al (66).

Isolering av CD4+ celler til bestemmelse av IMPDH-aktivitet

For å isolere CD4+ celler benyttet vi paramagnetiske polystyrenkuler som er drasjert med anti-CD4 monoklonalt antistoff. Hovedfraksjonen av sirkulerende CD4+ celler er T-hjelpeceller. Ved å isolere CD4+ celler kan man se på effekten av MPA selektivt hos disse cellene som gir et godt bilde av farmakodynamikken til MPA. Isoleringen ble gjort fortløpende ettersom prøvene ble samlet inn.

I forkant av prøveopparbeidelsen vasket vi kulene. Vaskingen ble gjort med fosfatbuffer i saltvann (PBS). Vi resuspenderte kulene, før vi tok ut ønsket mengde kuler til et reagensglass (25 µl per ml fullblod samt litt overskudd). Reagensglasset ble plassert på magnet i 30 sekunder, slik at de paramagnetiske kulene holdt seg i bunnen og langs veggen av prøveglasset hvor dette var i kontakt med magneten. Supernatanten ble så pipettert av, før kulene ble resuspendert i PBS i likt volum som det som opprinnelig ble tatt ut.

Blodprøven, i EDTA-rør (Vacutainer, jfr appendiks A, tabell All), ble satt i kjøleskapet for å kjøles ned til en temperatur på 4° C. 25 µl vaskede kuler per ml fullblod ble så tilsatt. Deretter ble prøvene satt til inkubering på rulle ved 2-8° C i 30 minutter, før prøven ble satt på magnet i 2-3 minutter for å fange opp kulene med CD4+ celler. Supernatanten ble fjernet og sentrifugert. Plasma ble separert fra, etterfulgt av mikrofiltrering. Mikrofiltreringen gjør at blodplater og platederiverte vesikler fjernes, samtidig som fritt og albuminbundet MPA

blir værende. Plasma ble oppbevart kaldt inntil videre prosessering senere i prosedyren. De CD4+ cellene som satt igjen i prøveglasset ble vasket med 3X1 ml PBS. Cellene ble så oppbevart i nunc-rør (Nunc Cryo Tube), suspendert i 400 µl PBS, som et fjerde vasketrinn. PBS ble pipettert av, og cellene ble resuspendert i 500 µl av det forbehandlede plasma som ble tatt av tidligere i prosedyren. Plasma vil fremdeles ha en viss konsentrasjon av MPA i og med at 2-3 % av MPA holder seg ekstracellulært som fri fraksjon. Deretter ble resuspensjonen inkubert ved 37° C i 30 minutter med en rask vorteks midtveis. Til slutt ble plasma fjernet en siste gang etter sentrifugering. Dette gav en pellet av celler og kuler som ble resuspendert i 150 µl PBS ved 3-4 ml fullblod som utgangsmateriale. Suspensjonen ble satt på vorteks for å få en homogen suspensjon, og 25 µl ble tatt ut til kjernetelling. Resten av resuspensjonen ble oppbevart i kjøleskap til tellingen ble utført, slik at dersom noe gikk galt med tellingen, kunne nye 25 µl bli tatt ut. Dersom alt gikk som det skulle frøs jeg resuspensjonen ned til -20° C inntil aktivitetsbestemmelse av IMPDH.

For å måle den virkelige nedgangen i aktivitet, og dermed effekten til MPA, hos den enkelte pasient, bør man relatere IMPDHa i cellene ved tilstedeværelse av MPA til den aktiviteten vi ser når MPA ikke er tilstede. For å få dette til ble nesten samme prosedyre som den beskrevet ovenfor fulgt, men i stedet for å resuspendere cellene i samme plasma det kom fra, ble cellene resuspendert i blankt humant plasma (Octaplas). Bortsett fra denne endringen vil prosedyrene være tilnærmet like. Det er gjort små endringer i vasketrinnene for å få en mer grundig vask av cellene.

Kjernetelling

Kjernetelling ble utført på en Beckman Coulter® Z1 partikkelteller. Til en 25 µl suspensjon av PBS, celler og kuler ble det tilsatt 50 µl lyseringsvæske (100 ml NaCl (0,9 %)/ 2 ml cetrime (50 mg/ml)/ 1 ml formalin (37 %)/ 0,5 ml iseddik). Blandingen ble homogenisert ved hjelp av vorteksmikser i 5 sekunder før den ble satt på magnet i 5 minutter. 50 µl av supernatanten ble så overført til 19 ml isoton løsning i et tellebeger. Begeret ble vendt forsiktig

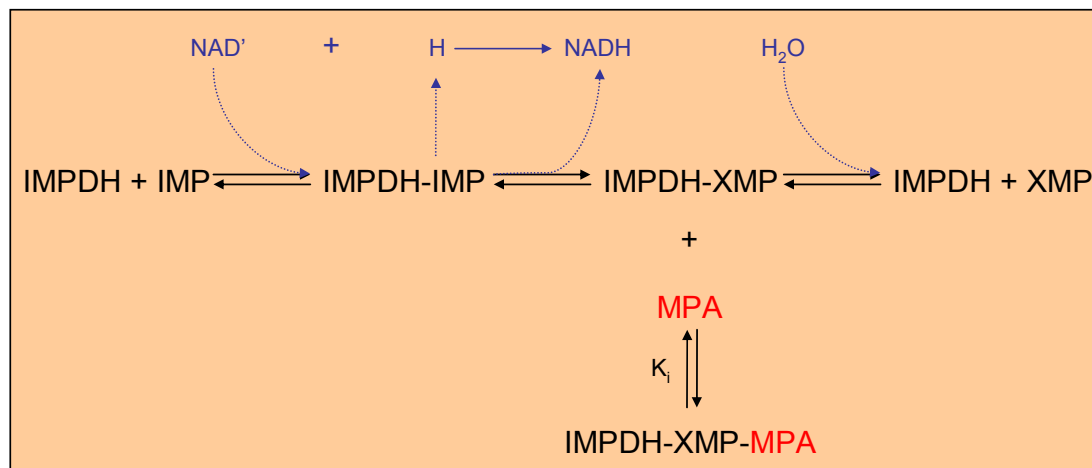
om like før telling av cellekjerner. Størrelsesintervallet partikkeltelleren skulle telle mellom ble innstilt fra 3 til 8,637 μm , og fortynningsfaktoren ble satt til 381 (19,05 ml (isoton løsning)/0,05 ml (supernatant)). Det ble talt tre paralleller per prøve, og snittet av de tre ble regnet ut. Mellom hver prøve talte vi en blank for kontroll og for at cellerester som kunne interferere med det endelige antallet ikke skulle bli overført mellom prøvene.

Aktivitetsbestemmelse av IMPDH

Først ble cellene tint. Deretter ble innholdet homogenisert ved vorteksmiksing i 30 sekunder og 2 minutter i ultrasonisk bad. For å få cellekonsentrasjonene til å ligge innenfor det lineære området for aktivitetsanalysen, ble cellematerialet fortynnet med PBS til riktig konsentrasjon. Dersom celletallet i en pasientprøve var lavt, fortynnet jeg ikke prøven. Så ble det tilsatt 100 μL tris-EDTA-allopurinol-buffer, samt IMP og NAD til et totalt volum på 220 μL . De endelige konsentrasjonene av IMP og NAD skulle være på henholdsvis 1,79 og 0,38 $\mu\text{mol/L}$, som tilsier mettet løsning. Løsningen ble satt på vorteks et lite øyeblikk før den ble inkubert i vannbad ved 37° C. Inkuberingen starter opp den enzymatiske reaksjonen (se figur 5). Etter 120 minutter på vannbadet, ble reaksjonen avsluttet ved å sette blandingen på is og tilsette 3 μL perklorisyre (4,0 M), etterfulgt av vorteks i 5 sekunder. Blandingene ble sentrifugert, og supernatanten ble pipettert av i et volum på 220 μL . Denne overførte vi til et glassrør. For å hydrolysere XMP til xantin, ble løsningen varmet opp til 100° C i 60min. 25 μL kaliumhydroksid (4.0 M) ble tilsatt etter at blandingen hadde nådd romtemperatur. Til slutt ble røret satt på vorteks i 5 sekunder og sentrifugering ved 3500 G i 10min, og supernatanten ble injisert for HPLC-analyse.

Kalibratorer med XMP 0 til 5,5 $\mu\text{mol/L}$ lages med PBS. Tris-EDTA allopurinol buffer, IMP og NAD ble lagt til, og prosessert parallelt med prøvene. For å beregne mengde XMP som ble produsert under inkubasjonen ble det brukt lineær regresjon. Vi målte xantin, og relaterte den til XMP.

Aktiviteten til IMPDH bestemmes ved å måle reaksjonshastigheten på omdannelsen av IMP til XMP. Aktiviteten uttrykkes som xantinmonofosfat (XMP) produksjonsrate (pmol XMP/ 10^6 celler/min), og responsen er bestemt som nedgang i V_{\max} . Aktiviteten relateres som man kan se fra benevningen til aktiviteten til de talte cellene. Celler vil normalt inneholde varierende mengder av XMP, og for å ekskludere variasjonen er det inkludert en såkalt 0-prøve i analysen. 0-prøven tilsettes ikke kofaktoren NAD, og inkuberes heller ikke slik at det er basalnivået av XMP som trekkes fra. Ut ifra de ulike likningene på figur 5 kan man se at tilstedeværelse av MPA inne i cellene vil senke V_{\max} til reaksjonen og indikerer dermed en nedgang i IMPDH-aktiviteten.



Figur 5 Reaksjonslikning som viser MPAs interaksjon med IMPDH

HPLC systemet som brukes ved bestemmelse av IMPDH-aktivitet består av to hovedkolonner for best mulig separasjon. Først benyttes en Chromolith Performance kolonne (100x4,6 mm) og deretter en C18 kolonne (Supelco Nucleosil C18 5 μ m, 150x4,6 mm). Pumpehastigheten for mobilfasen, fosfatbuffer pH 1,8 / metanol (96/4), settes til 1 mL/min. Deteksjonen med UV foregår ved 260 nm bølgelengde, og løpetiden for analysen er 20 minutter.

3.4.3 Takrolimus konsentrasjonsbestemmelse

Takrolimuskonsentrasjonen ble målt ved hjelp av et Waters MassTrak Immunosuppressants Kit ved LC-MS/MS (liquid chromatography – mass spectrometry/mass spectrometry).

Takrolimusanalysene ble foretatt av stipendiater Nils Tore Vethe og Ingjerd Sæves ved Rikshospitalet, og er derfor ikke beskrevet i nærmere detalj her.

4. Resultater

Tabell 1: Demografiske data

Demografiske data for pasientene er presentert i tabell 1. For pasient 1 ble det samlet inn fullblod på bare to - (studieperiode 1 og 2) og for pasient 5 på tre (studieperiode

Kjønn	3 menn / 2 kvinner
Alder, år	36 (19 - 63)
Vekt, kg	75 (57,5 - 98)
Sykdom	Primær scleroserende cholangitt (PSC) (n = 5)

2,3 og 4) av de fire studieperiodene. Øvrige pasienter fullførte studieperiode 1-4. Farmakokinetiske data er basert på alle studieperiodene det ble tatt prøver i. Farmakodynamiske data baserer seg på målinger som er gjort i studieperiode 2 og -4. Immunsuppressive legemidler ble dosert etter gjeldende protokoll (3) (se også avsnitt 2.1.2.), og alle pasientene mottok like doser MMF (1 g b.i.d.). Det faktum at kinetiske- og dynamiske data sjeldent er normalfordelte og at det ikke er gjort tilstrekkelig antall observasjoner til å si om verdiene er normalfordelte, gjør at data blir uttrykt som median med intervall (minimum-maksimum).

4.1 Farmakokinetikkforhold hos levertransplanterte

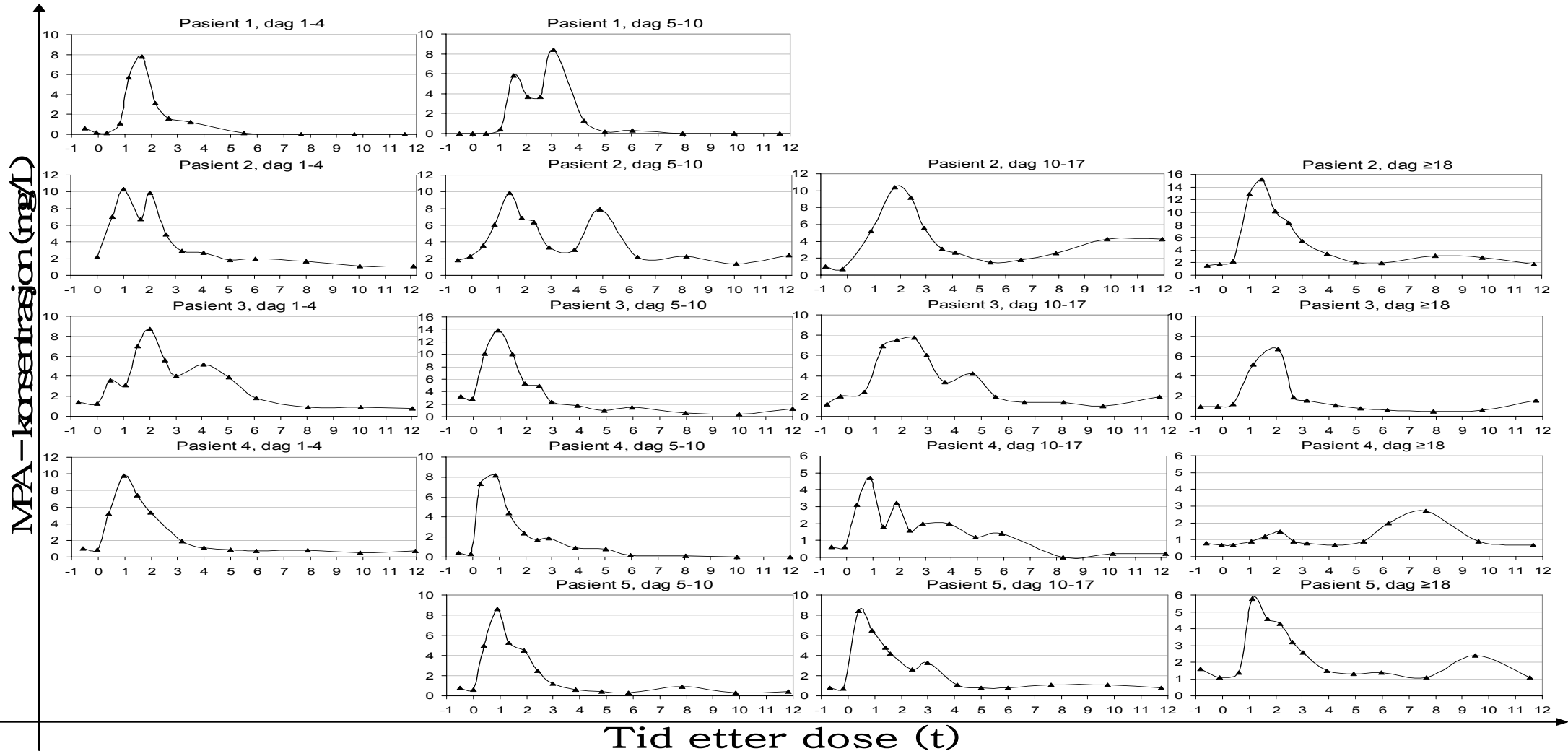
For pasientene ble det utarbeidet konsentrasjon-tid kurver basert på prøvetakingstidspunktene -1, 0, ½, 1, 1½, 2, 2½, 3, 4, 5, 6, 8, 10 og 12 timer i forhold til doseinntak. Profilene er vist i figur 6, og beskriver det kinetiske forløpet til MPA hos de fem levertransplanterte pasientene. Figuren demonstrerer kvalitative forskjeller i konsentrasjonsforløpet individuelt og mellom pasienter: profiler med én topp, profiler med dobbel topp hvor sekundærtoppen enten var sen eller tidlig og mer atypiske profiler med multiple topper. Hos 7 av 17 profiler kunne man se en siste plasmakonsentrasjonsøkning som fortsatte frem til slutten av 12-timersintervallet.

Basert på faktiske observasjoner ble kinetiske variabler for mykofenolat hos de fem levertransplanterte pasientene beskrevet: plasmakonsentrasjon like før inntak av ny dose (C_0 - trough), maksimum plasmakonsentrasjon (C_{max}) og tiden det tok for å oppnå maksimum plasmakonsentrasjon (t_{max}). Arealet under konsentrasjonskurven (AUC) ble beregnet ved hjelp av trapesmetoden. I tillegg ble oral clearance av MPA (Cl/F) beregnet som $(dose \cdot 0,739) / AUC$, hvor 0,739 er fraksjon av molekylær masse mellom MPA og MMF. I tabell 2 vises de farmakokinetiske resultatene for plasma-MPA oppsummert i henhold til studieperiodene. Tabell 3 viser de samme farmakokinetiske resultater, oppsummert med hensyn på pasienter. Figur 7 viser hvordan utvalgte kinetiske variabler endrer seg for hver pasient utover i forløpet.

Individuelle data for C_0 viser at variasjonen mellom pasientene var 11-foldig den første studieperioden. Den interindividuelle variasjonen sank til 2,4-fold i siste studieperiode. Intraindividuell variasjon varierte fra 1,8-fold (pasient 5) til 3,3 (pasient 2). De foregående og påfølgende oppsummeringer av relativ variasjon må sees i lys av at absoluttverdien i enkelte doseintervall var spesielt lav for noen av variablene.

C_{max} viste en tendens til å synke med korrelasjon til tid fra transplantasjon. Fra studieperiode 1 til studieperiode 4 var nedgangen for median C_{max} -48 % (figur E1, appendiks E). Individuelle data viste at hos tre av pasientene (pasient 3, 4 og 5) var det nedgang i den samme variabelen mellom studieperiodene. Hos pasient 2 kunne man se økning. Maksimum plasmakonsentrasjon hos pasientene viste gradvis større interindividuell variasjon. Ved studieperiode 1 var interindividuell variasjon 1,3-foldig og ved studieperiode 4 var variasjonen 5,6-foldig. Den intraindividuelle variasjonen varierte fra 1,1- (pasient 1, studieperiode 1 til -2) til 3,6-fold (pasient 4, studieperiode 1 til -4).

Figur 6: Individuelle konsentrasjon-tid kurver for de 5 levertransplanterte pasientene etter inntak av lik dose MMF (1 g b.i.d) på utvalgte studieperioder etter transplantasjon¹⁾



¹⁾ Y-aksene med MPA-konsentrasjon (mg/L) er forskjellig skalert

Tabell 2: Farmakokinetiske variabler og parametre fordelt på studieperiodene. Data er oppgitt i median med tilhørende intervall

Dager etter tx	Dag 1-4 (n=4)			Dag 5-10 (n=5)			Dag 10-17 (n=4)			Dag ≥18 (n=4)		
	Median	Intervall		Median	Intervall		Median	Intervall		Median	Intervall	
		Maks	Min		Maks	Min		Maks	Min		Maks	Min
C_0 (mg/L)	1,1	2,2	0,2	0,6	2,8	0,0	0,7	1,8	0,6	1,1	1,7	0,7
C_{max} (mg/L)	9,3	10,3	7,8	8,6	13,8	8,2	8,1	10,4	4,7	6,3	15,2	2,7
t_{max} (t)	1,34	2,02	0,97	0,95	3,05	0,88	1,35	1,85	0,42	1,79	7,62	1,13
CI/F (L/t)	26,2	65,1	20,0	41,4	47,1	16,3	25,8	49,4	15,6	34,6	50,3	14,7
AUC (mg*t/L)	29,0	36,9	11,4	17,9	45,3	15,7	29,6	47,4	15,0	21,7	50,3	14,7

n = antall pasienter i studieperioden

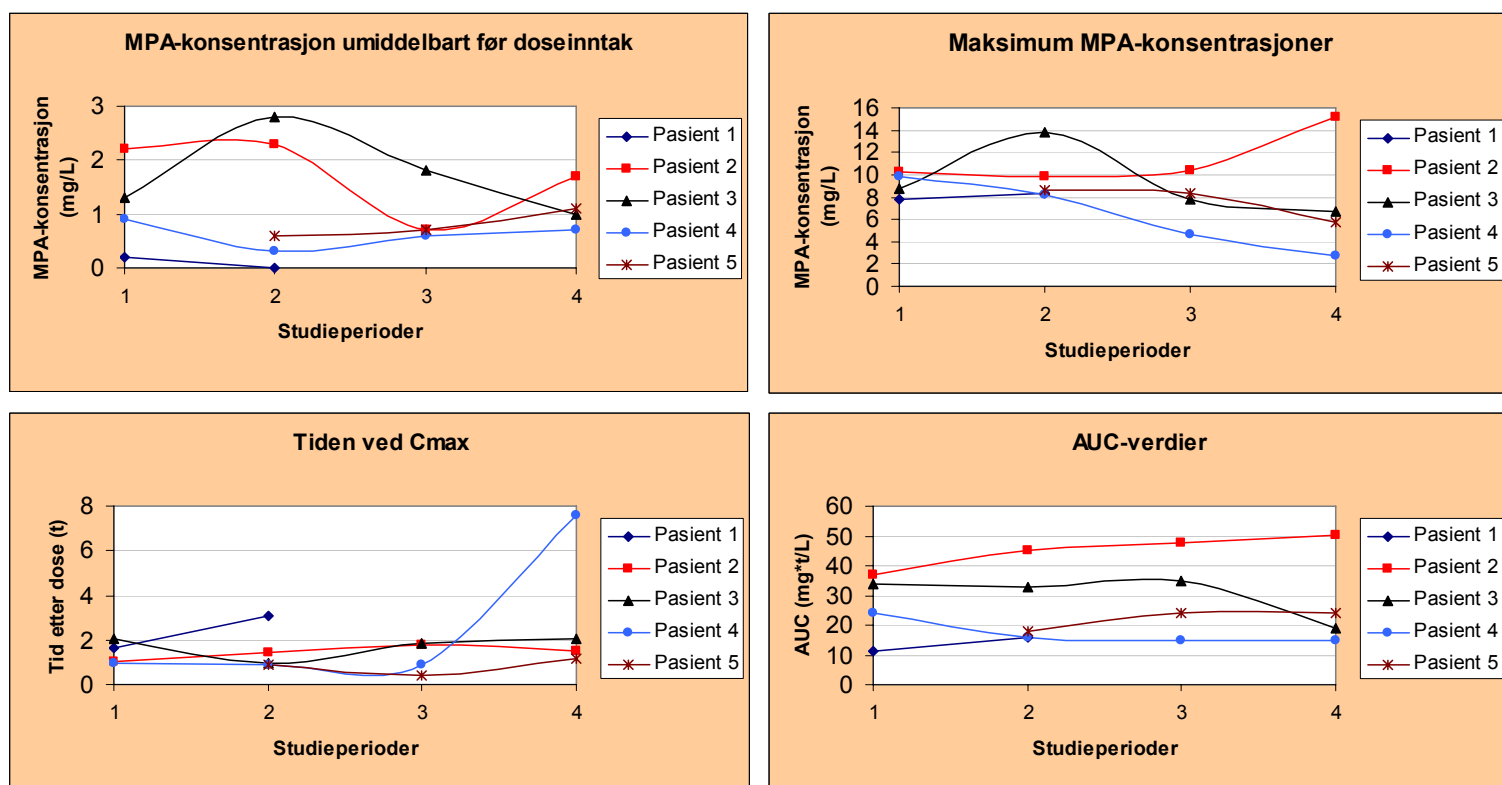
Tabell 3: Farmakokinetiske variabler og parametre fordelt på pasientene som ble inkludert. Data er oppgitt i median med tilhørende intervall

	Pasient 1 (n=2)			Pasient 2 (n=4)			Pasient 3 (n=4)			Pasient 4 (n=4)			Pasient 5 (n=3)		
	Median	Intervall		Median	Intervall		Median	Intervall		Median	Intervall		Median	Intervall	
		Maks	Min		Maks	Min		Maks	Min		Maks	Min		Maks	Min
C_0 (mg/L)	0,1	0,2	0,0	2,0	2,3	0,7	1,6	2,8	1,0	0,7	0,9	0,3	0,7	1,1	0,6
C_{max} (mg/L)	8,1	8,4	7,8	10,4	15,2	9,9	8,3	13,8	6,7	6,5	9,8	2,7	8,4	8,6	5,8
t_{max} (t)	2,4	3,1	1,7	1,5	1,8	1,0	1,9	2,1	1,0	0,9	7,6	0,9	0,9	1,1	0,4
CI/F (L/t)	56,1	65,1	47,1	16,0	20,0	14,7	22,2	38,7	21,2	47,7	50,3	30,4	30,5	41,4	30,4
AUC (mg*t/L)	13,5	15,7	11,3	46,4	50,3	36,9	33,3	34,8	19,1	15,5	24,3	14,7	24,2	24,3	17,9

n = antall studieperioder pasienten var med i

Interindividuell variasjon for t_{max} økte med tiden, og var 2,1-foldig ved første studieperiode og 6,7-foldig ved den siste. Den intraindividuelle variasjonen var median 2,2-foldig (1,8 - 8,6).

Som et mål for den totale eksponeringen for MPA ble AUC_{0-12} kalkulert. AUC_{0-12} -verdiene viste stor interindividuell variasjon. Variasjonen var 3,3-, 2,9-, 3,2- og 3,4-foldig i de respektive studieperiodene ($n_{pasienter} = 4$). Den intraindividuelle variasjonen var mindre, og for pasient 1-5 ble den beregnet til median 1,4-foldig (1,4 - 1,8).



Figur 7: Endringer i farmakokinetiske variabler med tid etter transplantasjon¹⁾

¹⁾ Oral clearance (CL/F) er ikke tatt med i figuren på grunn av at grafene vil oppføre seg inverst av hva som er tilfellet med AUC-grafene siden pasientene mottok like doser

Samtidig som man observerte en nedgang i AUC-verdiene med tiden hos pasient 3 og -4, var det en økning i oral clearance for de samme pasientene. De resterende pasientene viste en nedgang i oral clearance med tiden.

Det ble gjort sammenlikninger mellom konsentrasjon-tid kurvene for takrolimus og MPA hos noen utvalgte pasienter (appendiks F). Sammenlikningene kan tyde på at endringer i absorpsjonsforholdene til MPA ikke er spesifikke for substansen.

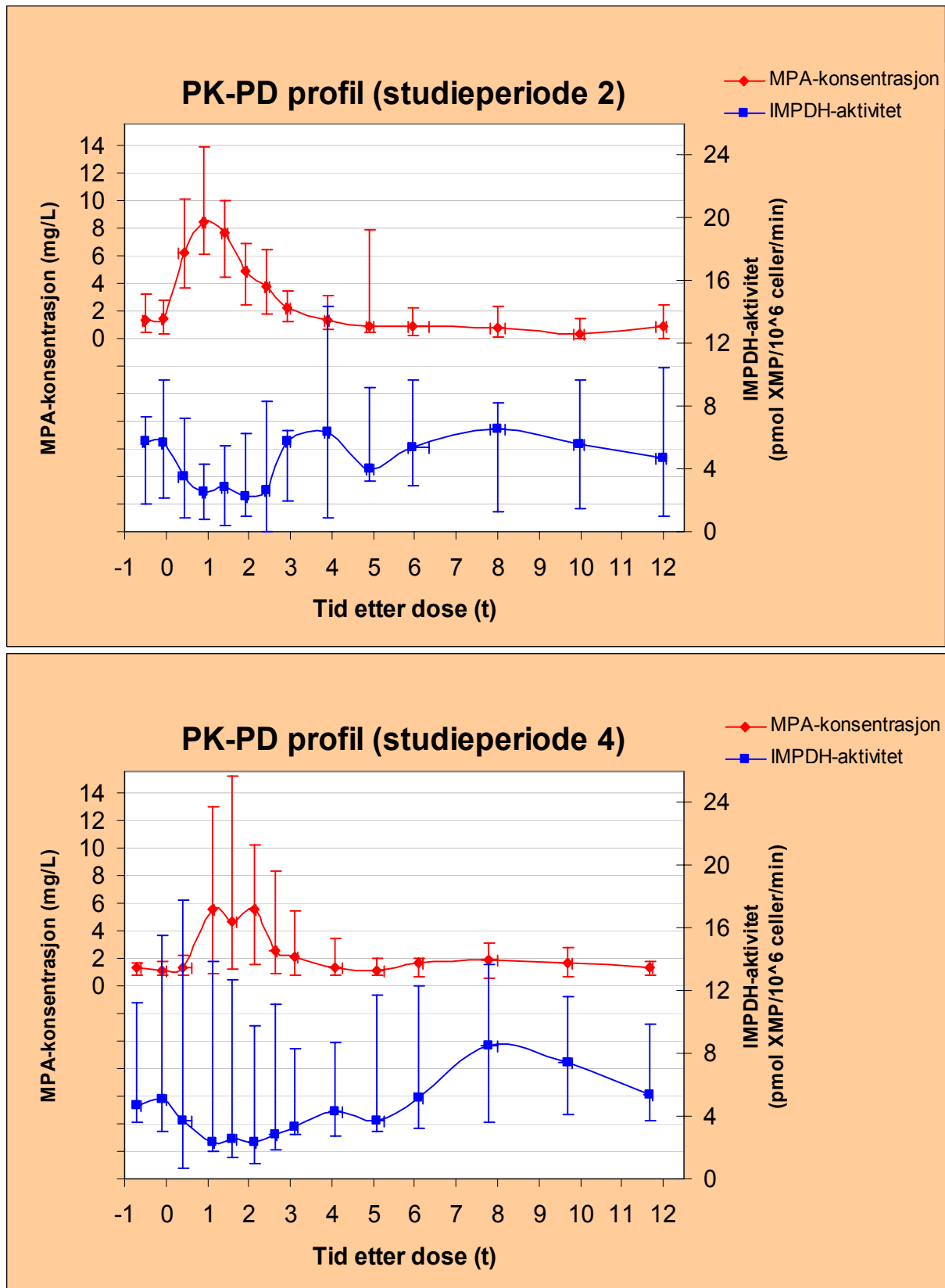
4.2 Farmakodynamikkforhold hos levertransplanterte

For at sammenlikningen mellom studieperiodene skulle bli så like som mulig, ble data fra pasient 1, studieperiode 2 ikke tatt med i beregningene. Det vil si at resultater fra begge periodene ble sammenliknet mellom de samme pasientene (pasient 2 - 5).

IMPDH-aktiviteten i CD4+ celler hos levertransplanterte pasienter ble satt i sammenheng med plasmakonsentrasjonen av MPA for å beskrive farmakodynamiske forhold hos pasientene i tidlig fase etter transplantasjon. Figur 8 viser median PK-PD profilene som beskriver studieperiode 2 og studieperiode 4. Stolpene i figuren viser variabiliteten i IMPDHa. Variabiliteten ser ut til å være større mellom pasientene i studieperiode 4 i forhold til studieperiode 2. Enkeltprofilene som ligger til grunn for mediankurvene kan observeres i appendiks F.

Aktiviteten til IMPDH var under sterk påvirkning av mykofenolatkonsentrasjonen, og et inverst forhold mellom IMPDHa og MPA-konsentrasjonen ble observert. Det inverse forholdet mellom mykofenolatkonsentrasjon og IMPDHa var spesielt tydelig frem til 4 timer etter doseinntak. Fra fjerde time etter administrering ble det observert en liten nedgang i aktivitet i forkant av en "overshoot" av aktiviteten. Økningen i IMPDHa trosset den lille økningen i MPA-plasmakonsentrasjon som skyldes enterohepatisk resirkulering. Enkeltprofilene viser at i 5 av 8 tilfeller øker aktiviteten til høyere nivå enn den var før doseinntaket (appendiks G).

Tabell 4 viser de viktigste farmakodynamiske data som har kommet frem i løpet av studien. Arealet under aktivitetskurven (AUC_{IMPDHa}) ble beregnet ved hjelp av trapesmetoden. Inhiberingsgraden til MPA er den % -vise reduksjonen i IMPDHa i forhold til basalaktiviteten.



Figur 8: Median MPA konsentrasjonsverdier versus median tidspunkter etter administrasjon av 1 g MMF hos levertransplanterte pasienter i studieperiode 2 og -4. Stolpene indikerer maksimum- og minimumsverdier som ble observert

Fast dosering på 1 g MMF to ganger daglig gav kraftig inhibering av IMPDH-aktiviteten i forhold til basalaktiviteten i begge studieperiodene hos studiesubjektene. Det ble observert en nedgang i inhiberingsgraden hos 3 av 4 pasienter. Maksimal inhibering oppstod etter median 1,2 timer og 1,6 timer for henholdsvis studieperiode 2 og -4.

Medianverdiene fra studieperiode 2 til studieperiode 4 endret seg ikke i stor grad. Unntaket er AUC_{IMPDHa} som sank med tiden, og følges av en nedgang i aktivitetsforholdet mellom $\text{IMPDHa}_{\text{max}}$ og $\text{IMPDHa}_{\text{min}}$. Det var stor interindividuell variasjon i AUC_{IMPDHa} i begge studieperiodene. I studieperiode 2 var variasjonen mellom pasientene 5,2-foldig en 3,0-foldig variasjon i den siste studieperioden.

Tabell 4: IMPDH enzymaktivitet i CD4+ celler hos levertransplanterte pasienter (1 g MMF b.i.d.) ved to ulike tidsperioder etter transplantasjon

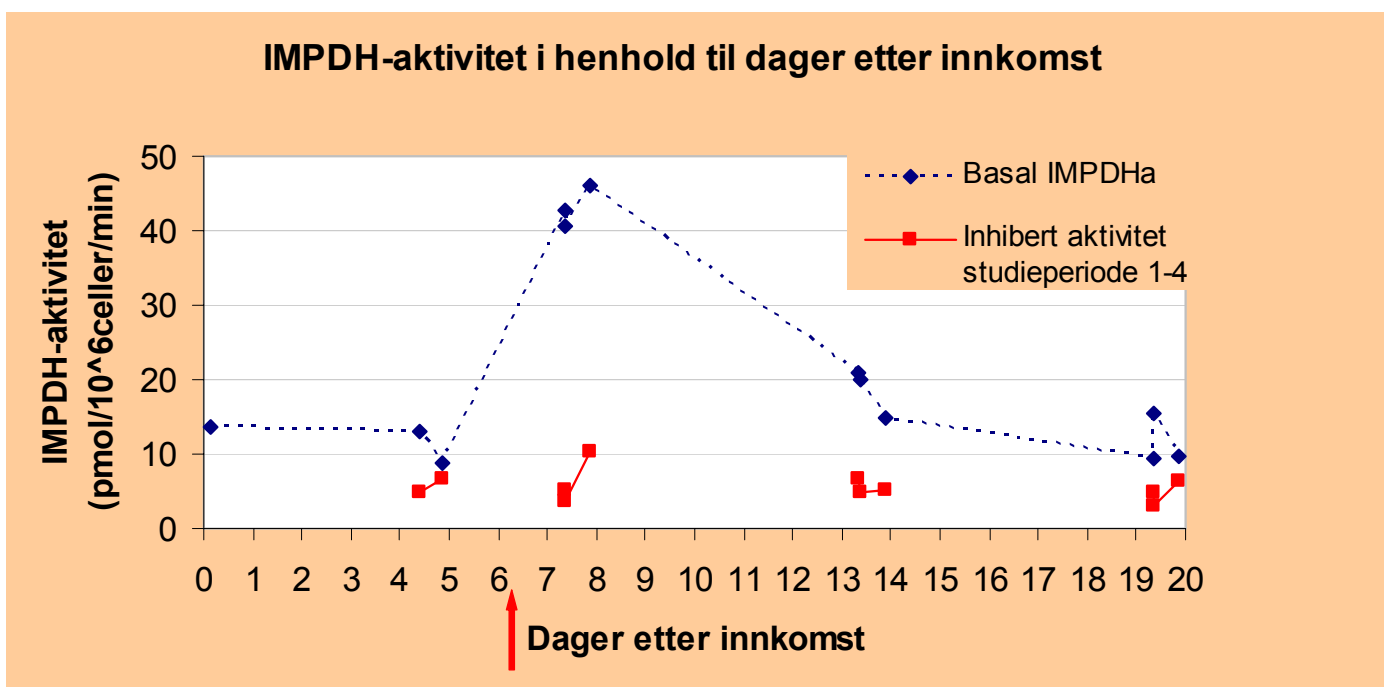
		Studieperiode 2 (n = 4)	Studieperiode 4 (n = 4)
IMPDH-aktivitet, basal (ved t_0)	pmol/ 10^6 celler/min	25,5 (11,2-40,8)	15,6 (9,6-29,7)
IMPDHa_{max}	pmol/ 10^6 celler/min	10,0 (3,2-15,9)	9,4 (5,6-17,8)
IMPDHa_{min}	pmol/ 10^6 celler/min	2,2 (0,0-4,5)	2,1 (0,7-8,3)
	%-vis reduksjon i forhold til basalaktivitet ¹⁾	92,5 (80,3-100,0)	86,2 (72,1-92,6)
	%-vis reduksjon i forhold til maksimumsaktivitet	82,2 (72,0-100,0)	64,9 (53,4-94,3)
tid ved IMPDHa_{min}	Timer	1,2 (0,3-2,4)	1,6 (0,6-3,2)
AUC_{IMPDHa}	pmol*h/ 10^6 celler/min	74,9 (19,4-133,3)	55,8 (45,7-137,9)

n = antall pasienter i hver studieperiode

¹⁾For å måle den virkelige nedgangen i aktivitet etter eksponering for MPA, ble IMPDHa i cellene ved tilstedeværelse av MPA relatert til den aktiviteten vi ser når MPA ikke er tilstede (se avsnitt 3.2.2. under: Isolering av CD4+ T-lymfocytter til bestemmelse av IMPDH-aktivitet). Nedgangen er oppgitt i prosentvis reduksjon ved $\text{IMPDHa}_{\text{min}}$ i forhold til basalaktivitet målt rett før inntak av ny dose i studieperioden.

Hos to av pasientene (pasient 2 og -4) ble det målt maksimumbasalaktivitet på henholdsvis 41 og 37 pmol/10⁶celler/min. Disse verdiene var høyere enn verdiene målt hos de to andre pasientene, 16 (pasient 3) og 11 pmol/10⁶celler/min (pasient 5).

Figur 9 viser basalaktivitet av IMPDH i forhold til aktiviteten under påvirkning av MPA i CD4+ celler hos en av pasientene fordelt på de forskjellige studieperiodene. Det ble observert en dramatisk økning i basalaktiviteten fra studieperiode 1 til -2. Inhibert aktivitet i CD4+ celler var stabil over tid.



Figur 9: Basalaktivitet av IMPDH (blå kurve) i forhold til aktivitet i CD4+ celler under påvirkning av MPA (rød kurve) hos pasient 2 i forhold til dager etter innkomst¹⁾. Rød pil indikerer oppstart av reaksjonsbehandling

¹⁾ Pasienten ble transplantert senere i løpet av innkomstdagen

5. Diskusjon

Denne studien er den første med parallell undersøkelse av MPA og IMPDH hos levertransplanterte pasienter i tidlig fase etter transplantasjon.

Store variasjoner i farmakokinetiske og – dynamiske variabler ble funnet, hvilket gir grunnlag for monitorering. Studien viser videre en sterk sammenheng mellom MPA-konsentrasjon og IMPDH-aktivitet, hvilket kan åpne for farmakodynamisk monitorering.

5.1 Farmakokinetikkforhold hos levertransplanterte

Et av de mest slående resultatene var hvor forskjellige konsentrasjon-tid profilene for pasientene er ved visuell analysing av figur 6. Dette til tross for at alle de inkluderte pasientene led av samme grunnsykdom og mottok lik dose MMF. Forskjellene kan observeres både individuelt hos hver pasient og mellom pasientene. Dersom man ser på absorpsjonsfasen i konsentrasjon-tid profilene (figur 6), ser vi at noen av profilene viser en skarp og tidlig C_{max} som samsvarer med rask deesterifisering av MMF til MPA, samt absorpsjon av sistnevnte. Pasient 3 i forhold til pasient 5 i studieperiode 3 kan sees på som et eksempel på at noen av pasientene har lang lagtid før maksimal plasmakonsentrasjon oppstår i forhold til andre. Profilene viser også andre typer topper, blant annet splittede absorpsjonstopper. Det kan se ut som om det skjer et slags avbrudd i absorpsjonen av legemiddelet før den tar seg opp igjen. Topper som antakeligvis skyldes resirkulering av mykofenolsyre, er forskjellige både kvantitativt og i tidsforløp.

Ved å se på farmakokinetikken til to legemidler som er gitt til samme tid, kan man få verdifull informasjon om absorpsjonsforholdene rundt legemidlene. En sammenlikning er gjort mellom utvalgte konsentrasjon-tid profiler for MPA og takrolimus (appendiks F). Det er lite beskrevet i litteraturen om takrolimus gjennomgår enterohepatisk resirkulering, men den er i hvert fall mindre

markant enn den man ofte ser for MPA. Det er derfor ved sammenlikning mulig å si mer spesifikt hvilke topper som sannsynligvis skyldes resirkulering og hvilke som skyldes endrede absorpsjonsforhold (se profil til pasient 1 i forhold til pasient 2, studieperiode 2). Dersom man ser på sammenlikningen av MPA og takrolimus for pasient 4, ble det observert en solid sekundær topp. Det er mulig at denne toppen er en kombinasjon av enterohepatisk resirkulering, og forsinket opptak av substans. Årsaken kan for eksempel være kraftig forsinket magetømming. Som vi kan se av figuren følger takrolimuskonsentrasjonen stort sett MPA-konsentrasjonen, og man kan se en tendens til at endringene i absorpsjonsforholdene ikke er spesifikke for MPA.

Biotilgjengeligheten til mykofenolat hos levertransplanterte pasienter er rapportert å være kraftig nedsatt i en studie gjort av Jain et al (15). Til pasientene inkludert i Monomix ble det ikke gitt MPA intravenøst. Derfor er heller ikke biotilgjengeligheten beregnet. C_{\max} , t_{\max} og AUC_{0-12} er imidlertid variabler som kan reflektere absorpsjonsforholdene. C_{\max} og AUC_{0-12} vil være høyere ved god biotilgjengelighet enn ved dårlig dersom lik dose blir gitt. Tabell 4 viser en sammenlikning av C_{\max} og AUC_{0-12} funnet i flere studier som er gjort på transplantasjonspopulasjoner i omtrent samme tidsperiode etter transplantasjon. Dersom vi ser på gjennomsnittet til C_{\max} hos Jain et al i forhold til de resultatene som er oppnådd hos Pisupati et al (17) og i Monomix ($n = 5$), tilsier de at biotilgjengeligheten kan være forskjellig mellom pasientpopulasjoner, også innenfor levertransplantasjon. Resultatene rundt plasmakonsentrasjonen understøttes av en sammenlikning av AUC_{0-12} verdiene som er høyere hos Pisupati et al og i Monomix enn hos Jain et al. Samtidig viser Brunet et al (6 dager etter transplantasjon) (27) til medianverdier som er mer sammenliknbare med Jain et al, enn Pisupati et al og Monomix. Sammenlikningene viser at resultatene spriker.

En både positiv og negativ side ved resultatene som er oppnådd i denne oppgaven er at alle de fem første pasientene som ble inkludert i Monomix hadde PSC som grunnsykdom. Grunnen er at PSC er den hyppigste årsaken

til levertransplantasjon i Norden i dag (67). Den positive siden av saken er at man får en mer homogen pasientpopulasjon å beskrive. Den negative siden er at demografien for andre studier mest sannsynlig vil være mer heterogen, og man må derfor være meget varsom når man sammenlikner resultatene fra disse studiene med egne funn. Det benyttes også ulike immunsuppressive protokoller i de forskjellige studiene som kan bidra til å gjøre gale slutninger ut fra sammenlikning.

Tabell 5: Sammenlikning av et utvalg studier gjort på transplantasjonspopulasjoner som står på et MMF-basert regime (1 g MMF b.i.d. hvis ikke annet er angitt)

	Studie	Antall pasienter	Dager etter tx	C _{max} (mg/L)		AUC (mg*t/L)	
				Gjennomsnitt	Median	Gjennomsnitt	Median
Levertransplanterte	Jain et al. (15)	11	2-7	4,46±2,8	4,34	12,8±4,2	13,35
	Brunet et al. ¹⁾ (27)	13	6	-	4,60	-	17,40
	Brunet et al. ¹⁾ (27)	13	10	-	7,40	-	16,30
	Pisupati et al. ²⁾ (17)	10	≤7	9,1±7,2	-	50,8±42,1	-
	Pisupati et al. ²⁾ (17)	10	7-14	11,6±6,7	-	60,3±38,5	-
	Monomix	5	5-10	9,8±2,3	8,6	25,6±13,1	17,85
Nyretransplanterte	Kuypers et al. (68)	33	7		10,3		43,8
	Zucker et al. (51)	18	Stabile	10,6±3,0	-	50,2±16,5	-
	Brunet et al. ³⁾ (69)	10	Stabile	12,0±5,7	10,95	49,8±24,8	46,43

¹⁾Steroidfritt regime, men fikk daclizumab 6 timer etter reperfusjon samt på dag 7 postoperativt

²⁾Pasientene mottok 0,5-1g MMF b.i.d.

³⁾Pasientene mottok ciklosporin i stedet for takrolimus

Et overraskende funn som ble gjort ved analysering av resultatene fra Monomix var at median C_{max} hadde en synkende trend utover i forløpet (Appendiks E). Den synkende trenden ble fulgt av en økning i den interindividuelle variasjonen for C_{max} og t_{max} . Pasientens tilheling etter abdominal kirurgi i tillegg til forbedret allmentilstand vil i teorien gi bedret absorpsjon fra tarmen fordi både tarmens funksjon og motilitet bedres (27). En annen faktor ved normalisering av tarmfunksjon er at intestinal enzymaktivitet også vil ta seg opp (70). Et av enzymene i så måte er intestinal UGT1A9, som konjugerer MPA til MPAG. Inaktiveringen vil gjøre at mindre MPA vil være tilgjengelig for absorpsjon, og dermed ha potensial til å senke C_{max} . De to faktorene vil konkurrere om å ha størst innflytelse, og det er sannsynlig at ratio mellom dem vil være forskjellig fra individ til individ, og innen hvert individ variere med tiden. Interindividuell variasjon for t_{max} influeres sterkt av en outlier for pasient 4 i den siste studieperioden (figur 7). I konsentrasjon-tid profilen til samme pasient kan man se at enterohepatisk resirkulering av MPA når høyere plasmakonsentrasjoner enn primærtoppen, og dermed forskyver t_{max} . Dersom man ser bort fra denne verdien vil den interindividuelle variasjonen ved studieperiode 4 være klart lavest (1,8 – i forhold til 6,7-foldig).

Uridindifosfat glukuronosyltransferasene er også involverte i konvertering av MPA til MPAG i leveren, og er dermed essensielle for enterohepatisk resirkulering. I følge SPC til CellCept® vil en topp som viser enterohepatisk resirkulering oppstå 6-12 timer etter doseadministrering (47). I noen av konsentrasjon-tid profilene (figur 6) oppstår det sekundærtopper også før de seks timene etter dose har passert. Det kan settes spørsmålstegn ved om disse konsentrasjonsendringene kommer for fort til å skyldes enterohepatisk resirkulering, eller om de skyldes endringer i absorpsjonsforløpet. Hos enkelte av pasientene var en økning i plasmakonsentrasjonen etter seks timer ved noen av studieperiodene tilnærmet eller fullstendig fraværende. Den variable enterohepatiske resirkuleringen kan ha flere forklaringer. Enterohepatisk resirkulasjon av MPA foregår hovedsakelig ved hepatisk

glukuronidering og utskillelse gjennom galle før reabsorpsjon. Det kan være individuelle forskjeller i hvor fort den nye leverens funksjoner med tanke på utskillelse av galle er optimale og stabile. En annen forklaring er at det kan være individuelle forskjeller i hvor fort transplantatets evne til å metabolisere (Cl_{int}) optimaliseres hos den enkelte resipient, men det gjenstår å vise at denne forskjellen er statistisk signifikant (17). En egenskap hos noen av de metaboliserende enzymene som kan bidra til den interindividuelle variabiliteten er genetisk polymorfisme. Det er vist at UGT polymorfisme kan endre farmakokinetikken til MPA, ved å gi en dose MMF til friske frivillige (71). Genotypen til et individ vil påvirke den totale eksponering for MPA (AUC_{0-12}) både med hensyn til konvertering av MPA til MPAG i tarm og hepatisk glukuronidering forut for galleutskillelse. Samtidig induseres sannsynligvis UGT av steroider (50), og de høye initiale dosene glukokortikoider samt eventuell rejeksjonsbehandling vil ha potensiale til å påvirke farmakokinetikken til MPA. Det er rapportert at enterohepatisk resirkulering av MPA kan stå for 30-40 % av total AUC (12,19,20). Det er derfor meget sannsynlig at endringer i resirkuleringsmekanismen samt genetiske faktorer kan stå for mye av den interindividuelle variasjonen i AUC_{0-12} som er beskrevet i denne oppgaven.

En høyere grad av resirkulering ble observert i den siste studieperioden i forhold til de foregående for pasientene som ble inkludert i Monomix (appendiks E). Dette kan indikere at levertransplanterte pasienter med PSC som grunnsykdom har lav grad av enterohepatisk resirkulering i tidlig fase etter transplantasjon. Det er uvisst om patogenesen rundt grunnsykdommen vil påvirke kinetikkforhold rundt MPA, men en hypotese er at gallegangene som ligger utenfor leveren fremdeles er preget av betennelsestilstanden. I så fall vil ikke gallefunksjonen være optimal direkte etter transplantasjon hos denne pasientgruppen.

Oral clearance (Cl/F) av legemiddel avhenger i stor grad av ovennevnte hepatiske metabolisme av MPA. Parameteren vil derfor bli påvirket i like stor grad av endringene som tidligere er beskrevet for AUC_{0-12} (jfr lik dose MMF).

Clearance av MPA avhenger mye av proteinbindingsgraden på grunn av at det er et såkalt low-clearance legemiddel. Mykofenolats frie fraksjon (f_u) vil endre seg med tid etter transplantasjon, sannsynligvis fordi albumin- og bilirubinnivåene normaliseres. Det er også en signifikant korrelasjon mellom f_u og oral clearance (17). I Monomix ble det funnet et tilfelle som kan beskrive den frie fraksjonens betydning for Cl/F . Fra dagen for blodprøvetaking til neste dag, studieperiode 2 for pasient 4, økte bilirubinkonsentrasjonen fra 26- til 44 $\mu\text{mol/L}$. Deretter holdt konsentrasjonen seg høy frem til siste studieperiode. I de samme periodene økte Cl/F . Endringene er oppsummert i tabell 4. Høy bilirubin påvirker proteinbindingen på grunn av fortregning av MPA fra albumins bindingssteder. Dersom den frie fraksjonen øker, kompenseres dette av at metabolisme og eliminasjon også øker. Som en konsekvens vil den totale eksponeringen av MPA for individet bli nedsatt. Fenomenet kan være klinisk relevant dersom eksponeringen blir for lav. Tilfeller som dette som er eksemplifisert med pasient 4 bidrar til både intra- og interindividuell variasjon. I og med at det er Cl/F som er beregnet, forutsetter påstandene at biotilgjengelighet (F) ikke endrer seg nevneverdig hos den enkelte.

Tabell 6: Endringer i bilirubin, Cl/F og AUC over studieperiodene for pasient 4

	Studieperiode			
	1	2	3	4
Bilirubin, $\mu\text{mol/L}$	20	26-44	67	34
Cl/F , L/t	30,4	46,0	49,4	50,3
AUC, $\text{mg}^*\text{t/L}$	24,3	16,1	15,0	14,7

Til tross for variabiliteten i konsentrasjon-tid profilene vist i figur 6, ser det ut til at den totale eksponeringen for MPA (AUC_{0-12}) endrer seg i liten grad med tiden innenfor hver pasient. Observasjonene kan tyde på at det er kinetiske variasjoner fra pasient til pasient som er viktigst med tanke på eksponering av legemiddel.

Det er en stor fysiologisk påkjenning å gjennomgå transplantasjon. Ved transplantasjon av lever, som er et viktig metaboliserende og eliminerende organ, vil pasienten forflytte seg fra en patologisk tilstand assosiert med det sviktende organet til en forhåpentligvis normal tilstand. Hvor lang tid kroppen bruker på å normalisere funksjonene med tanke på ADME av et legemiddel er individuell og uviss. Trolig vil de største endringene skje i tidlig postoperativ fase, og en hypotese er at de største intra- og interindividuelle variasjonene vil finne sted i denne perioden. Andre faktorer som bestemmer et individs eksponering for MPA er nyrefunksjon, albuminkonsentrasjon og typen kalsineurinhemmer som brukes. Tidligere har flere studier vist at MPA utviser en kompleks farmakokinetikk hvor man kan se store intra- og interindividuelle forskjeller hos transplantasjonspopulasjoner (17,26-30). Gjennom variasjonene som er vist, samt opplysningene om forløpet fra figur 6, er dette også bekreftet i den farmakokinetiske delen av denne studien. De ovennevnte faktorene kan være deler av den sammensatte forklaringen på de inter- og intraindividuelle forskjellene som ble observert for levertransplanterte pasienter tidlig etter inngrepet.

5.2 Farmakodynamikkforhold hos levertransplanterte

Median PK-PD profilene for studieperiode 2 og -4 som er vist i figur 8, samt sammenlikning av t_{max} og tiden ved $IMPDH_{a_{min}}$, viser at nedgangen i $IMPDH_{a_{min}}$ var tett assosiert tidsmessig med den inverse økningen i konsentrasjon av MPA. Assosiasjonen kan forklares med at det oppstår reversible aggregat av IMPDH ved eksponering for immunsuppressive doser av MMF i humane celler (in vitro) (72), og at MPA sannsynligvis transporteres raskt mellom cellene og plasma. Aggregatdannelsen reverseres raskt ved fravær av MPA. PK-PD profilene viser at etter hvert som konsentrasjonen til MPA avtar, øker enzymaktiviteten til nivåer som ofte er høyere enn det som ble sett før doseinntak. Økningen i aktivitet trosset den svake oppgangen i plasmakonsentrasjon til MPA som fulgte enterohepatisk resirkulering hos noen av pasientene. Lave konsentrasjoner av MPA som ikke lenger klarer å

inhibere IMPDH hos alle cellene kan være årsaken til "aktivitetsovershooten". Dermed vil IMPDHa strekke seg mot den underliggende basalaktiviteten. Hvor høy basalaktiviteten er, samt graden av reeksponering for MPA gjennom resirkulering, kan være bestemmende for tyngden av "overshooten". En annen forklaring, eller en kombinasjon av disse, kan være at det finnes en negativ tilbakekoblingsmekanisme som gjør at når enzymaktiviteten går ned, gjør cellene mottiltak som gjenoppretter aktiviteten.

Inhiberingsgraden til MPA holdt seg høy i de to studerte periodene. Median inhiberingsgrad gikk noe ned fra studieperiode 2 til -4, men dette skyldes nedgangen i basalaktivitet begrunnet med at man så en liten nedgang i $IMPDH_{a_{min}}$ mellom periodene. Maksimum plasmakonsentrasjoner for MPA på både 8,6 mg/L og 6,3 mg/L for de to studieperiodene klarer å inhibere IMPDHa i stor grad (median på henholdsvis 93 % og 86 %). Upubliserte data fra avdeling for medisinsk biokjemi på Rikshospitalet har vist at inhibering på median 85 % av IMPDHa hos friske frivillige ($n = 5$) ble oppnådd ved en plasmakonsentrasjon på 6 mg/L. Inhiberingsgraden økte ikke ved høyere C_{max} . Denne typen resultater kan peke i retning av at MMF hos enkelte pasienter er dosert høyere enn nødvendig i den tidlige fasen etter transplantasjon (jfr C_{max} figur 6). Om dette er tilfelle er det mulig at bivirkninger relatert til MPA kunne vært unngått ved dosereduksjon hos disse pasientene, men korrelasjonen mellom C_{max} og bivirkninger har vist seg å være varierende. Et problem ved å oppnå C_{max} på "kun" 6 mg/L, eller lavere, er at C_{max} antakeligvis vil påvirke total eksponering for MPA med dagens MMF-formulering i tidlig fase etter transplantasjon. Det kan være at det viktige ved inhibering av IMPDH-aktivitet er tidsrommet man har en viss hemming av enzymaktiviteten.

Median basalaktivitet sank fra studieperiode 2 til den siste studieperioden. Rett etter en transplantasjon er immunforsvaret i stor grad aktivert. Aktivering vil avta med tiden dersom ikke reaksjonsepisoder oppstår. De høye initiale dosene av glukokortikoider vil kunne endre basalaktiviteten i retning av det som ble observert (43). Kombinasjonen av immunforsvarets

naturlige reaksjon ved transplantasjon og høye initiale doser av glukokortikoider/rejeksjonsbehandling kan derfor være årsaken til den høye basalaktiviteten som ble observert i studieperiode 2.

Det var stor variasjon i IMPDHa-profilene til de levertransplanterte pasientene (appendiks G), og variabiliteten i fenotypen kan skyldes flere faktorer. Blant annet vil individets eksponering for MPA variere fra pasient til pasient (se avsnitt 5.1). Dermed vil enzymaktiviteten til IMPDH variere som følge av det inverse forholdet. Noen ganger ble det observert individuelle fluktuasjoner i IMPDH-aktivitetsnivået som ikke ble gjenspeilet av inverse fluktuasjoner i MPA-konsentrasjonen. Det kan skyldes at metoder og analyseinstrument er mer følsomme ovenfor endringer i IMPDHa enn i konsentrasjon av MPA. Det er også sannsynlig at ekspresjon av *IMPDH* og aktiviteten til enzymet påvirkes av andre faktorer som ikke MPA-konsentrasjon påvirkes av. Genotypen til den enkelte pasient kan spille en rolle for de individuelle fluktuasjonene, og man kan også tenke seg at det er en viss døgnvariasjon i aktivitetsnivået.

Pasient 2 i studien hadde et rejeksjonstilfelle rundt dag 6 etter innkomst (figur 9). Basalaktiviteten til IMPDH i CD4+ celler viste en dramatisk økning fra studieperiode 1 til -2 hos pasienten. Immunaktivering er en sentral del av rejeksjonsmekanismen (se avsnitt 1.1). Aktiveringen av lymfocytter er tidligere vist å øke ekspresjonen og nivåene av *IMPDH*/IMPDH I og II (44,45). Dette kan være utslagsgivende for den økte aktiviteten som observeres. Analysen for IMPDHa skiller ikke mellom IMPDH I og -II. Økningen i basalaktivitet kan dermed ikke relateres direkte til genuttrykket på grunn av at reguleringen av isoenzymene er forskjellig. Likevel vil denne økningen kunne si noe om den totale virkningen av genreguleringen. På dagen før prøveinnsamling (studieperiode 2), samt tre påfølgende dager, fikk pasienten glukokortikoid (Solu-medrol®) som en del av rejeksjonsbehandlingen. Glukokortikoidene virker intracellulært, og utøver sin effekt ved å regulere spesifikke geners aktivitet. Blant genene inngår inflammatoriske- og antiinflammatoriske gener. Det kan se ut som om glukokortikoidene øker

ekspresjonen slik at basal IMPDHa stiger ytterligere (43). Påstanden styrkes av at det ble sett klart høyest verdier av basalaktiviteten hos de to pasientene i studien som fikk rejeksjonsbehandling (pasient 2 og 4). Etter at rejeksjonen ble reversert, kan man se at basalaktiviteten synker ned mot nivåene som ble målt før rejeksjonen. Det mest interessante med observasjonene er at mykofenolats inhibering av IMPDH holder seg på et overraskende stabilt nivå. Det kan se ut som om aktiviteten i CD4+ celler hvor MPA er til stede i større grad er uaffisert av den dramatiske økningen i basalaktiviteten. Resultatene kan tyde på at MPA er i overskudd ved doser av MMF på 1 g b.i.d., og dermed vil holde inhiberingsgraden på et høyt nivå nærmest uavhengig av økt ekspresjon og påfølgende økt proteinaktivitet. Det ligger en viss usikkerhet i antakelsene som er gjort, dette på grunn av at det går noen dager mellom hver aktivitetsmåling. Derfor er det vanskelig å si hvordan aktiviteten var ved de mest kritiske tidspunktene rett før og etter rejeksjonen, med påfølgende behandling.

Mykofenolats mulige effekt på ekspresjon av *IMPDH* er vanskelig å undersøke, blant annet på grunn av koadministrering av glukokortikoider og andre legemidler. Man kan allikevel se en trend som tilsier at MPA eksponering over tid induserer IMPDH-ekspresjon. (43)

5.3 Monitorering

Gjennom studien ble det registrert rejeksjonstilfeller hos to av fem pasienter. AUC_{IMPDHa} beskriver den totale virkningen MPA har på målenzymet. Den interindividuelle variasjonen hos de levertransplanterte pasientene var stor i begge periodene den ble målt. Dette samsvarer med den store interindividuelle variasjonen som ble sett for AUC_{MPA} . Variasjon innen det kliniske utfallet kombinert med stor inter- og intraindividuell variasjon innen farmakokinetikk- og farmakodynamikkforhold, tilsier at doseringen av MPA til levertransplanterte pasienter bør individualiseres. At individualisering av dosen er nødvendig kan bekreftes ved å se på mediankurvene som er vist i

figur 8. Figuren viser oss at å øke eller minke dosen MMF hos alle pasientene innenfor en populasjon er mot sin hensikt. Ved å gjøre dette vil man flytte kurvene opp og ned langs konsentrasjonsaksen, men variabiliteten på individnivå vil i teorien være den samme. Det er grunn til å tro at eksponeringen for MPA, og dermed også utviklingen til IMPDHa, er avhengig av individuelle faktorer (tabell 3). Derfor kan man mest sannsynlig redusere dosen hos enkelte pasienter for å unngå bivirkninger og de skadelige effekter langtids oversuppresjon av immunsystemet har. Hos andre pasienter kan man øke dosen for å minimere rejeksjonsepisoder og alvorlighetsgrad samt bruk av andre immunsuppressiva.

Flere studier beskriver at det vil være fordelaktig med monitorering av MPA (17,28,29,43,48,61,73,74), men foreløpig er det bare en prospektiv studie som har rapportert nytten av monitorering (61). Hvilket monitoreringsprinsipp som er det beste har imidlertid vært kontroversielt, men det er slått fast at troughmonitorering ikke predikerer rejeksjon i motsetning til AUC_{0-12} -monitorering.

Monitorering vil redusere innvirkningen av interindividuell variasjon på utfallet av en transplantasjon. Dessverre vil stor intraindividuell variasjon komplisere monitoreringen ved at endringer over tid er vanskelig å kontrollere. I slike tilfeller må man monitorere ofte. Hos de levertransplanterte pasientene i denne studien var det kun en liten intraindividuell variasjon for AUC_{0-12} . Den store interindividuelle variasjonen innenfor samme variabel, gjør imidlertid at det kunne vært gunstig å monitere. Som beskrevet i avsnitt 1.4. er det forhold rundt monitorering av total AUC som ikke gjør dette gjennomførbart i klinisk praksis.

For at monitorering i størst mulig grad skal bedre det kliniske utfallet, bør man monitorere på variabler som ligger nærme virkningsmekanismen til legemiddelet. Som det er vist i oppgaven er det et inverst konsentrasjonsrespons forhold mellom MPA og IMPDHa i CD4+ celler hos de aktuelle pasientene. CD4+ celler omfatter blant annet T-lymfocytter, og er valgt ut på

grunn av deres sentrale rolle i immunresponsen. Cellene vil derfor være gode prognostiske markører med tanke på transplantasjoner. Samtidig ser IMPDHa ut til å bli påvirket av flere faktorer enn bare MPA-konsentrasjon, hvilket styrker tanken bak farmakodynamisk monitorering. Glander et al har også rapportert at det er betydelig mindre intraindividuell variasjon i IMPDH-aktivitet enn i den kinetiske parameteren AUC_{MPA} hos stabile nyretransplanterte pasienter (75). Dette ble ikke bekreftet hos levertransplanterte pasienter i denne oppgaven, men materialet er for lite til å konkludere med det motsatte.

For å undersøke inhiberingseffekten til MPA på målenzymet ble den underliggende aktiviteten målt og relatert til aktiviteten ved tilstedeværelse av MPA (jfr avsnitt 3.2.2.). Det viste seg at doser på 1 g MMF (b.i.d.) gir en kraftig maksimal inhibering av IMPDHa (tabell 4). Tidligere er det påvist kraftig inhibering i fullblod hos stabile nyretransplanterte pasienter (40). I den studien ble inhiberingsgraden beregnet i forhold til IMPDHa ved t_0 . Hvilke celler som egner seg best som prognostiske markører er ikke avklart, men ved å bruke CD4+ celler i stedet for fullblod vil vi gi et mer spesifikt svar med hensyn til subgruppen. *IMPDH I* og *II* er forskjellig i fullblod i forhold til CD4+ celler (43), og aktiviteten i fullblod vil derfor ikke være direkte overførbar til aktiviteten i CD4+ celler. Dersom det totale bildet av reaksjon bestemmes av IMPDHa i flere celler enn CD4+ celler, kan det være mer riktig å se på aktiviteten i fullblod. Med tanke på hvordan man skal beregne inhiberingsgraden ville det beste vært å relatere denne til basalaktiviteten ved tidspunktet for maksimal inhibering i tilfelle basalaktiviteten varierer innen doseintervallet.

Man kan gå ut i fra to teorier når man ser på hva som er målet ved farmakodynamisk monitoreringen. Det kan tenkes at hvert individ har en purinmetabolisme som er tilpasset individets behov, og dermed også en IMPDH-aktivitet som er individuelt tilpasset. For å gi immunsuppresjon til en slik populasjon vil målet være å slå ned aktiviteten med en bestemt prosentandel av basalaktiviteten per individ. Eventuelt kan man gå ut i fra at

en forhøyet aktivitet er et tegn på morbiditet. Da vil målet være å slå ned aktiviteten til en bestemt absoluttverdi. Om målet på aktivitet skal være $\text{IMPDH}_{\text{amin}}$, et tidspunkt som korrelerer godt med $\text{AUC}_{\text{IMPDH}_a}$ eller en annen variabel må undersøkes gjennom nærmere studier på levertransplanterte pasienter.

TDM koster ekstra, og krever god kontakt mellom klinisk avdeling og laboratorium. Studier kreves som ser på kostnadseffektiviteten rundt monitorering av MPA. Monitorering er ikke rutine hos de fleste sykehus i dag, og det kliniske transplantasjonsmiljøet venter på dokumentasjon for bedret klinisk utfall for å gå i gang med monitorering som rutine. (57)

5.4 Metoder

Et problem som oppstod underveis i studien var at inkluderte pasienter av kliniske grunner ikke fullførte alle studieperiodene. Dette var jeg klar over kunne skje i forkant, men det førte til problemer ved analysering av resultatene. Pasient 1 var kun med i studieperiode 1 og 2, og pasient 5 var med i studieperiode 2, 3 og 4. Det betyr at sammenlikning av variabler mellom de forskjellige studieperiodene vil kunne få et skjevt utfall. De sikreste tallene ville man sannsynligvis ha fått ved å sammenlikne studieperiode 2 til 4 mellom pasient 2-5. For den kinetiske beskrivelsen ble det besluttet å benytte alle data, og gjøre oppmerksom på antall pasienter som var med i hver studieperiode ved presentasjon av resultater.

Alle metodene som ble brukt i denne oppgaven var etablerte metoder på laboratoriet. Metodene er tidligere publisert, og diskusjonen rundt metodene står i artiklene det er referert til i teksten. Dette avsnittet vil bare ta for seg de mest åpenbare feilkildene.

Prøveopparbeidelsen til analyse ble i hovedsak gjort av en bioingeniør, en stipendiat samt forfatter av oppgaven. Den mest åpenbare feilkilden vil være forskjeller i arbeidsteknikker mellom disse personene. Forskjellige resultater

på bakgrunn av dette ble forebygget med svært detaljerte metodebeskrivelser, og sannsynligvis er metodene robuste nok til å tåle slike forskjeller.

5.4.1 Bestemmelse av IMPDH-aktivitet

Kjernetelling

Med høye doser immunsuppressive legemidler vil antallet CD4+ celler som blir isolert kunne synke til lave nivåer. Dette kan for eksempel skje ved rejeksjonsbehandling med høye doser glukokortikoider. Glukokortikoidbehandling har den effekten at den selekterer ut cellepopulasjoner. T-lymfocytene påvirkes av glukokortikoider, blant annet ved at proliferasjon inhiberes gjennom blokade av vekstfaktoren IL-2 og hemming av lymfoide organer slik at antall lymfocytter i sirkulasjonen reduseres (46).

I studien fikk pasient 2 (studieperiode 2) og pasient 4 (studieperiode 3 og 4) rejeksjonsbehandling. Dersom vi ser på celletallene til pasient 4 i studieperiode 4, ser vi at de i stor grad er påvirket av rejeksjonsbehandlingen. Gjennomsnittsansallet isolerte celler ved for eksempel 8 timer postdose hos samme pasienten er mer enn 23 ganger høyere i periode 1 i forhold til periode 4. PK-PD forholdet ved periode 4 (appendiks G) viser en IMPDH-aktivitet som ikke lar seg påvirke mye av enterohepatisk resirkulasjon, eventuelt kombinert med absorpsjon, som gir sekundært økte plasmakonsentrasjoner av MPA. Tidligere i oppgaven er det vist tett sammenheng mellom IMPDH-aktivitet og mykofenolatkonsentrasjon, men det er også observert at sammenhengen er mindre tydelig i siste del av intervallet. Det er mulig at sammenhengen svekkes av lave celletall. Cellene som ennå er i blodet etter rejeksjonsbehandling, og dermed er tilgjengelige for isolering, kan ha andre egenskaper enn de som normalt dominerer i sirkulasjonen. Dersom egenskapene går på grader av aktivering, eller andre momenter som spiller inn på IMPDH-aktivitet, vil dette påvirke

analyseresultatene våre ved at IMPDH-aktiviteten er høyere per celle enn hva tilfellet er uten rejeksjonsbehandling.

Aktivitetsbestemmelse

Ved bestemmelse av IMPDH-aktivitet ble det tilsatt NAD^+ i overskudd. Høye konsentrasjoner av NAD^+ er vist å kunne inhibere IMPDH og dermed påvirke analysesvarene ved at man får produsert mindre xantin. (76)

Dersom prøvene fikk stå i romtemperatur før injeksjon til HPLC, ville xantinproduksjonen fortsette. Det var derfor viktig at alle prøvene ble behandlet likt, slik at den enzymatiske prosessen fikk forløpe like lenge for hver prøve.

Figur 5 viser likningen disse to usikkerhetsmomentene eventuelt vil interagere med.

6. Konklusjon

I studien som bygger opp under denne oppgaven har det blitt demonstrert store kvalitative forskjeller i konsentrasjonsforløpet til MPA hos levertransplanterte pasienter i tidlig fase etter transplantasjon. Variasjoner innenfor farmakokinetiske variabler er vist både individuelt for hver pasient og mellom de forskjellige pasientene. Basert på disse resultatene, og resultater hentet fra andre studier, er det grunn til å tro at mye av den inter- og intraindividuelle variasjonen som er observert skyldes endringer i resirkuleringsmekanismen og genetiske faktorer. En del av dette kan forklares med at leveren er et essensielt organ for den enterohepatiske resirkuleringen av MPA.

Aktiviteten til IMPDH var under sterk innflytelse av MPA-konsentrasjon, særlig de første 4 timene av doseintervallene. Farmakologiske analyser har vist at inhiberingsgraden til MPA var høy ved to ulike perioder etter inngrepet. Det har også fremkommet data som kan tyde på at 1 g MMF administrert to ganger daglig til enkelte av de levertransplanterte pasientene gir unødvendig høye plasmakonsentrasjoner. PK-PD profiler avslørte et inverst forhold mellom IMPDH-aktivitet og konsentrasjonen av mykofenolat, selv kort tid etter transplantasjon. Den sterke tidsmessige assosiasjonen åpner for farmakodynamisk monitorering av MPA ved enzymaktivitetsmålinger.

Resultatene som er vist kan danne grunnlag for en intervensjonsstudie hvor mykofenolat blir dosert i henhold til IMPDH-aktivitetsmålinger.

Kildeliste

Litteraturliste

1. Thorsby, E. Transplantation medicine in Norway through 50 years. *Tidsskr Nor Laegeforen* 2006; 126: 3305-3310.
2. Hydle, A. Ny lever til kreftsyke. På hospitalet (2008);
3. Anonymous. Protokoll Levertransplantasjon.(2006); Rikshospitalet Universitetsykehus.
4. Bogen, B., Munthe, A. *Immunologi*, 1.edn. Universitetsforlaget, Oslo, 2000.
5. Vartdal, F., Thorsby, E. [Immunologic reactions in transplantation]. *Tidsskr Nor Laegeforen* 1999; 119: 3167-3170.
6. Bergan, S., Albrechtsen, D., Bentdal, O. [Immunosuppressive agents in organ transplantation]. *Tidsskr Nor Laegeforen* 1999; 119: 3615-3620.
7. Vinokurova, N.G., Ivanushkina, N.E., Kochkina, G.A., Arinbasarov, M.U., Ozerskaia, S.M. [Production of mycophenolic acid by fungi of the genus *Penicillium* link]. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 2005; 41: 95-98.
8. Mitsui, A., Suzuki, S. Immunosuppressive effect of mycophenolic acid. *J Antibiot (Tokyo)* 1969; 22: 358-363.
9. Halloran, P., Mathew, T., Tomlanovich, S., Groth, C., Hooftman, L., Barker, C. Mycophenolate mofetil in renal allograft recipients: a pooled efficacy analysis of three randomized, double-blind, clinical studies in prevention of rejection. The International Mycophenolate Mofetil Renal Transplant Study Groups. *Transplantation* 1997; 63: 39-47.
10. Sollinger, H.W. A few memories from the beginning.. *Transplantation* 2005; 80: S178-S180.
11. Creput, C., Blandin, F., Deroure, B., Roche, B., Saliba, F., Charpentier, B., Samuel, D., Durrbach, A. Long-term effects of calcineurin inhibitor conversion to mycophenolate

-
- mofetil on renal function after liver transplantation. *Liver Transpl* 2007; 13: 1004-1010.
12. Bullingham, R., Monroe, S., Nicholls, A., Hale, M. Pharmacokinetics and bioavailability of mycophenolate mofetil in healthy subjects after single-dose oral and intravenous administration. *J Clin Pharmacol* 1996; 36: 315-324.
 13. Armstrong, V.W., Tenderich, G., Shipkova, M., Parsa, A., Koerfer, R., Schroder, H., Oellerich, M. Pharmacokinetics and bioavailability of mycophenolic acid after intravenous administration and oral administration of mycophenolate mofetil to heart transplant recipients. *Ther Drug Monit* 2005; 27: 315-321.
 14. Pescovitz, M.D., Conti, D., Dunn, J., Gonwa, T., Halloran, P., Sollinger, H., Tomlanovich, S., Weinstein, S., Inokuchi, S., Kiberd, B., Kittur, D., Merion, R.M., Norman, D., Shoker, A., Wilburn, R., Nicholls, A.J., Arterburn, S., Dumont, E. Intravenous mycophenolate mofetil: safety, tolerability, and pharmacokinetics. *Clin Transplant* 2000; 14: 179-188.
 15. Jain, A., Venkataramanan, R., Kwong, T., Mohanka, R., Orloff, M., Abt, P., Kashyap, R., Tsoulfas, G., Mack, C., Williamson, M., Batzold, P., Bozorgzadeh, A. Pharmacokinetics of mycophenolic acid in liver transplant patients after intravenous and oral administration of mycophenolate mofetil. *Liver Transpl* 2007; 13: 791-796.
 16. Nowak, I., Shaw, L.M. Mycophenolic acid binding to human serum albumin: characterization and relation to pharmacodynamics. *Clin Chem* 1995; 41: 1011-1017.
 17. Pisupati, J., Jain, A., Burckart, G., Hamad, I., Zuckerman, S., Fung, J., Venkataramanan, R. Intraindividual and interindividual variations in the pharmacokinetics of mycophenolic acid in liver transplant patients. *J Clin Pharmacol* 2005; 45: 34-41.
 18. Shaw, L.M., Korecka, M., Venkataramanan, R., Goldberg, L., Bloom, R., Brayman, K.L. Mycophenolic acid pharmacodynamics and pharmacokinetics provide a basis for rational monitoring strategies. *Am J Transplant* 2003; 3: 534-542.
 19. Staatz, C.E., Tett, S.E. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolate in solid organ transplant recipients. *Clin Pharmacokinet* 2007; 46: 13-58.
 20. Bullingham, R.E., Nicholls, A.J., Kamm, B.R. Clinical pharmacokinetics of mycophenolate mofetil. *Clin Pharmacokinet* 1998; 34: 429-455.

-
21. Picard, N., Cresteil, T., Premaud, A., Marquet, P. Characterization of a phase 1 metabolite of mycophenolic acid produced by CYP3A4/5. *Ther Drug Monit* 2004; 26: 600-608.
 22. Shipkova, M., Armstrong, V.W., Wieland, E., Niedmann, P.D., Schutz, E., Brenner-Weiss, G., Voihsel, M., Braun, F., Oellerich, M. Identification of glucoside and carboxyl-linked glucuronide conjugates of mycophenolic acid in plasma of transplant recipients treated with mycophenolate mofetil. *Br J Pharmacol* 1999; 126: 1075-1082.
 23. Naesens, M., Kuypers, D.R., Verbeke, K., Vanrenterghem, Y. Multidrug resistance protein 2 genetic polymorphisms influence mycophenolic acid exposure in renal allograft recipients. *Transplantation* 2006; 82: 1074-1084.
 24. Keppler, D., Konig, J. Hepatic secretion of conjugated drugs and endogenous substances. *Semin Liver Dis* 2000; 20: 265-272.
 25. Roberts, M.S., Magnusson, B.M., Burczynski, F.J., Weiss, M. Enterohepatic circulation: physiological, pharmacokinetic and clinical implications. *Clin Pharmacokinet* 2002; 41: 751-790.
 26. Arns, W., Cibrik, D.M., Walker, R.G., Mourad, G., Budde, K., Mueller, E.A., Vincenti, F. Therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid in solid organ transplant patients treated with mycophenolate mofetil: review of the literature. *Transplantation* 2006; 82: 1004-1012.
 27. Brunet, M., Cirera, I., Martorell, J., Vidal, E., Millan, O., Jimenez, O., Rojo, I., Londono, M.C., Rimola, A. Sequential determination of pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolic acid in liver transplant patients treated with mycophenolate mofetil. *Transplantation* 2006; 81: 541-546.
 28. Jain, A., Venkataramanan, R., Hamad, I.S., Zuckerman, S., Zhang, S., Lever, J., Warty, V.S., Fung, J.J. Pharmacokinetics of mycophenolic acid after mycophenolate mofetil administration in liver transplant patients treated with tacrolimus. *J Clin Pharmacol* 2001; 41: 268-276.
 29. Shaw, L.M., Holt, D.W., Oellerich, M., Meiser, B., van, G.T. Current issues in therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid: report of a roundtable discussion. *Ther Drug Monit* 2001; 23: 305-315.
 30. Shum, B., Duffull, S.B., Taylor, P.J., Tett, S.E. Population pharmacokinetic analysis of mycophenolic acid in renal transplant recipients following oral administration of mycophenolate mofetil. *Br J Clin Pharmacol* 2003; 56: 188-197.

-
31. Allison, A.C., Eugui, E.M. Mechanisms of action of mycophenolate mofetil in preventing acute and chronic allograft rejection. *Transplantation* 2005; 80: S181-S190.
 32. Hedstrom, L., Wang, C.C. Mycophenolic acid and thiazole adenine dinucleotide inhibition of *Tritrichomonas foetus* inosine 5'-monophosphate dehydrogenase: implications on enzyme mechanism. *Biochemistry* 1990; 29: 849-854.
 33. Sintchak, M.D., Fleming, M.A., Futer, O., Raybuck, S.A., Chambers, S.P., Caron, P.R., Murcko, M.A., Wilson, K.P. Structure and mechanism of inosine monophosphate dehydrogenase in complex with the immunosuppressant mycophenolic acid. *Cell* 1996; 85: 921-930.
 34. Hager, P.W., Collart, F.R., Huberman, E., Mitchell, B.S. Recombinant human inosine monophosphate dehydrogenase type I and type II proteins. Purification and characterization of inhibitor binding. *Biochem Pharmacol* 1995; 49: 1323-1329.
 35. Laliberte, J., Yee, A., Xiong, Y., Mitchell, B.S. Effects of guanine nucleotide depletion on cell cycle progression in human T lymphocytes. *Blood* 1998; 91: 2896-2904.
 36. Carr, S.F., Papp, E., Wu, J.C., Natsumeda, Y. Characterization of human type I and type II IMP dehydrogenases. *J Biol Chem* 1993; 268: 27286-27290.
 37. Dayton, J.S., Lindsten, T., Thompson, C.B., Mitchell, B.S. Effects of human T lymphocyte activation on inosine monophosphate dehydrogenase expression. *J Immunol* 1994; 152: 984-991.
 38. Jain, J., Almquist, S.J., Ford, P.J., Shlyakhter, D., Wang, Y., Nimmesgern, E., Germann, U.A. Regulation of inosine monophosphate dehydrogenase type I and type II isoforms in human lymphocytes. *Biochem Pharmacol* 2004; 67: 767-776.
 39. Stryer, L. *Biochemistry*, 3.edn. W.H.Freeman and Company, New York, 1988.
 40. Vethe, N.T., Mandla, R., Line, P.D., Midtvedt, K., Hartmann, A., Bergan, S. Inosine monophosphate dehydrogenase activity in renal allograft recipients during mycophenolate treatment. *Scand J Clin Lab Invest* 2006; 66: 31-44.
 41. Gu, J.J., Kaiser-Rogers, K., Rao, K., Mitchell, B.S. Assignment of the human type I IMP dehydrogenase gene (IMPDH1) to chromosome 7q31.3-q32). *Genomics* 1994; 24: 179-181.
 42. Glesne, D., Collart, F., Varkony, T., Drabkin, H., Huberman, E. Chromosomal localization and structure of the human type II IMP dehydrogenase gene (IMPDH2). *Genomics* 1993; 16: 274-277.

-
43. Bremer, S., Mandla, R., Vethe, N.T., Rasmussen, I., Rootwelt, H., Line, P.D., Midtvedt, K., Bergan, S. Expression of IMPDH1 and IMPDH2 After Transplantation and Initiation of Immunosuppression. *Transplantation* 2008; 85: 55-61.
 44. Zimmermann, A.G., Gu, J.J., Laliberte, J., Mitchell, B.S. Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase: regulation of expression and role in cellular proliferation and T lymphocyte activation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1998; 61: 181-209.
 45. Zimmermann, A.G., Wright, K.L., Ting, J.P., Mitchell, B.S. Regulation of inosine-5'-monophosphate dehydrogenase type II gene expression in human T cells. Role for a novel 5' palindromic octamer sequence. *J Biol Chem* 1997; 272: 22913-22923.
 46. Migita, K., Eguchi, K., Kawabe, Y., Nakamura, T., Shirabe, S., Tsukada, T., Ichinose, Y., Nakamura, H., Nagataki, S. Apoptosis induction in human peripheral blood T lymphocytes by high-dose steroid therapy. *Transplantation* 1997; 63: 583-587.
 47. Roche registration Limited. SPC Cellcept. www.legemiddelverket.no (2007);
 48. van Gelder, T., Le, M.Y., Shaw, L.M., Oellerich, M., DeNofrio, D., Holt, C., Holt, D.W., Kaplan, B., Kuypers, D., Meiser, B., Toenshoff, B., Mamelok, R.D. Therapeutic drug monitoring of mycophenolate mofetil in transplantation. *Ther Drug Monit* 2006; 28: 145-154.
 49. Mourad, M., Malaise, J., Chaib, E.D., De, M.M., Konig, J., Schepers, R., Squifflet, J.P., Wallemacq, P. Correlation of mycophenolic acid pharmacokinetic parameters with side effects in kidney transplant patients treated with mycophenolate mofetil. *Clin Chem* 2001; 47: 88-94.
 50. Cattaneo, D., Perico, N., Gaspari, F., Gotti, E., Remuzzi, G. Glucocorticoids interfere with mycophenolate mofetil bioavailability in kidney transplantation. *Kidney Int* 2002; 62: 1060-1067.
 51. Zucker, K., Rosen, A., Tsaroucha, A., de, F.L., Roth, D., Ciancio, G., Esquenazi, V., Burke, G., Tzakis, A., Miller, J. Unexpected augmentation of mycophenolic acid pharmacokinetics in renal transplant patients receiving tacrolimus and mycophenolate mofetil in combination therapy, and analogous in vitro findings. *Transpl Immunol* 1997; 5: 225-232.
 52. Hesselink, D.A., van Hest, R.M., Mathot, R.A., Bonthuis, F., Weimar, W., de Bruin, R.W., van, G.T. Cyclosporine interacts with mycophenolic acid by inhibiting the multidrug resistance-associated protein 2. *Am J Transplant* 2005; 5: 987-994.

-
53. Mandla, R., Midtvedt, K., Line, P.D., Hartmann, A., Bergan, S. Mycophenolic acid clinical pharmacokinetics influenced by a cyclosporine C2 based immunosuppressive regimen in renal allograft recipients. *Transpl Int* 2006; 19: 44-53.
 54. Anonymous. Norsk Elektronisk Legehåndbok - Cytomegalovirus. <http://www.legehandboka.no/> (2007); Norsk Helseinformatikk AS.
 55. F.Hoffmann-La Roche AG. SPC Cymevene. www.legemiddelverket.no (2004);
 56. Astellas Pharma a/s. SPC Prograf. www.legemiddelverket.no (2007);
 57. Kaplan, B. Mycophenolic acid trough level monitoring in solid organ transplant recipients treated with mycophenolate mofetil: association with clinical outcome. *Curr Med Res Opin* 2006; 22: 2355-2364.
 58. Barbari, A., Stephan, A., Masri, M.A., Kamel, G., Karam, A., Mourad, N., Kilani, H., El, G.B. Mycophenolic acid plasma trough level: correlation with clinical outcome. *Exp Clin Transplant* 2005; 3: 355-360.
 59. Borrows, R., Chusney, G., Loucaidou, M., James, A., Lee, J., Tromp, J.V., Owen, J., Cairns, T., Griffith, M., Hakim, N., McLean, A., Palmer, A., Papalois, V., Taube, D. Mycophenolic acid 12-h trough level monitoring in renal transplantation: association with acute rejection and toxicity. *Am J Transplant* 2006; 6: 121-128.
 60. van Gelder, T., Hilbrands, L.B., Vanrenterghem, Y., Weimar, W., de Fijter, J.W., Squifflet, J.P., Hene, R.J., Verpooten, G.A., Navarro, M.T., Hale, M.D., Nicholls, A.J. A randomized double-blind, multicenter plasma concentration controlled study of the safety and efficacy of oral mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection after kidney transplantation. *Transplantation* 1999; 68: 261-266.
 61. Le, M.Y., Buchler, M., Thierry, A., Caillard, S., Villemain, F., Lavaud, S., Etienne, I., Westeel, P.F., de Ligny, B.H., Rostaing, L., Thervet, E., Szelag, J.C., Rerolle, J.P., Rousseau, A., Touchard, G., Marquet, P. Individualized mycophenolate mofetil dosing based on drug exposure significantly improves patient outcomes after renal transplantation. *Am J Transplant* 2007; 7: 2496-2503.
 62. Bergan, S. ANx farmakologiske analyser. [http://www.anx.no/content/view/48/87/#Ved leverTx](http://www.anx.no/content/view/48/87/#Ved_leverTx) (2008);
 63. Anonymous. Immunsuppresjonsprotokoller ved LeverTx. <http://www.anx.no/content/category/6/22/50/> (2008);

-
64. Svensson, J.O., Brattstrom, C., Sawe, J. A simple HPLC method for simultaneous determination of mycophenolic acid and mycophenolic acid glucuronide in plasma. *Ther Drug Monit* 1999; 21: 322-324.
 65. Vethe, N.T., Bergan, S. Determination of inosine monophosphate dehydrogenase activity in human CD4+ cells isolated from whole blood during mycophenolic acid therapy. *Ther Drug Monit* 2006; 28: 608-613.
 66. Albrecht, W., Storck, M., Pfetsch, E., Martin, W., Abendroth, D. Development and application of a high-performance liquid chromatography-based assay for determination of the activity of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase in whole blood and isolated mononuclear cells. *Ther Drug Monit* 2000; 22: 283-294.
 67. Wiencke, K. Primær scleroserende cholangitt. http://www.rikshospitalet.no/portal/page/portal/no/forsiden/sykdom/diagnoser?p_doc_id=40489 (2007); Marit Eriksen.
 68. Kuypers, D.R., Vanrenterghem, Y., Squifflet, J.P., Mourad, M., Abramowicz, D., Oellerich, M., Armstrong, V., Shipkova, M., Daems, J. Twelve-month evaluation of the clinical pharmacokinetics of total and free mycophenolic acid and its glucuronide metabolites in renal allograft recipients on low dose tacrolimus in combination with mycophenolate mofetil. *Ther Drug Monit* 2003; 25: 609-622.
 69. Brunet, M., Martorell, J., Oppenheimer, F., Vilardell, J., Millan, O., Carrillo, M., Rojo, I., Corbella, J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolic acid in stable renal transplant recipients treated with low doses of mycophenolate mofetil. *Transpl Int* 2000; 13 Suppl 1: S301-S305.
 70. Kuypers, D.R., Naesens, M., Vermeire, S., Vanrenterghem, Y. The impact of uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A9 (UGT1A9) gene promoter region single-nucleotide polymorphisms T-275A and C-2152T on early mycophenolic acid dose-interval exposure in de novo renal allograft recipients. *Clin Pharmacol Ther* 2005; 78: 351-361.
 71. Levesque, E., Delage, R., oit-Biancamano, M.O., Caron, P., Bernard, O., Couture, F., Guillemette, C. The impact of UGT1A8, UGT1A9, and UGT2B7 genetic polymorphisms on the pharmacokinetic profile of mycophenolic acid after a single oral dose in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 2007; 81: 392-400.
 72. Ji, Y., Gu, J., Makhov, A.M., Griffith, J.D., Mitchell, B.S. Regulation of the interaction of inosine monophosphate dehydrogenase with mycophenolic acid by GTP. *J Biol Chem* 2005.
 73. Tredger, J.M., Brown, N.W. Mycophenolate: better value through monitoring? *Transplantation* 2006; 81: 507-508.

74. van Gelder, T., Shaw, L.M. The rationale for and limitations of therapeutic drug monitoring for mycophenolate mofetil in transplantation. *Transplantation* 2005; 80: S244-S253.
75. Glander, P., Hambach, P., Braun, K.P., Fritsche, L., Giessing, M., Mai, I., Einecke, G., Waiser, J., Neumayer, H.H., Budde, K. Pre-transplant inosine monophosphate dehydrogenase activity is associated with clinical outcome after renal transplantation. *Am J Transplant* 2004; 4: 2045-2051.
76. Guillen Schlippe, Y.V., Hedstrom, L. Is Arg418 the catalytic base required for the hydrolysis step of the IMP dehydrogenase reaction? *Biochemistry* 2005; 44: 11700-11707.

Appendiks A

Reagenser og utstyr

Tabell AI: Reagenser

REAGENS	PRODUSENT
Acetic acid 100 % (CH ₃ COOH)	Prolabo 54, Fontenay s/Bois, Frankrike
Acetonitril (HPLC Grade)	Rathburn Chemicals Ltd, Walkerburn, Skottland
Allopurinol (4-Hydroxyprazolo[3,4-d]pyrimidine)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO
Cetrimide (a mixture of alkyltrimethylammonium bromides)	Hopkin & Williams Ltd, Essex, England
Dynabeads® M-450 CD4	Dynal Biotech, Oslo, Norge
EDTA acid, dinatrium salt	Prolabo 12, Paris, Frankrike
Formaldehyde solution (37%)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO
Inosine 5'-monophosphate	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO
Kaliumhydroksid Plätzchen (KOH)	E. Merck, Darmstadt, Tyskland
Methanol (HPLC Grade)	Rathburn Chemicals Ltd, Walkerburn, Skottland
β-Nicotinamide adenine dinucleotide (β-NAD)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO
Octaplas	Blodbanken, Ullevål, Oslo
Orthophosphoric acid min. 85 % (H ₃ PO ₄)	Prolabo 54, Fontenay s/Bois, Frankrike
Perchloric acid min. 70 % (HClO ₄)	Prolabo 54, Fontenay s/Bois, Frankrike
Phosphate buffered saline (PBS)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO
Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride Buffer Substance pH 8,0	Sigma-Aldrich, Steinheim, Sveits
Vann, destillert, ionebyttet vann	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO
Xanthine (2,6-Dihydroxypurine)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO
Xanthosine-5'-monophosphate Disodium salt	Sigma-Aldrich, Steinheim, Sveits

Tabell AII: Utstyr

UTSTYR	PRODUSENT
BD Vacutainer™ Z, 5 mL, (uten tilsetning)	BD Vacutainer Systems, Plymouth, England
BD Vacutainer™ EDTA K3E 15 %	BD Vacutainer Systems, Plymouth, England
Coulter® Z1 Particle count & size analyzer	Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA
Grant OLS 200 (vannbad med termostat)	Grant Instruments, Cambridge, England
Kubota 8700 (sentrifuge med termostat)	Kubota Corporation, Tokyo, Japan
Magnetic Particle Concentrator	Dynal Biotech, Oslo, Norge
Megafuge 1.0 (sentrifuge uten termostat)	Heraeus Instruments, Osterode, Tyskland
MF™ Membrane Filters 0,45µm, HA	Millipore, Irland
Micro tubes 1,5 mL, PP, sterile	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Tyskland
Nunc CryoTube™ Vials 4,5 ml	Nalge Nunc International, Danmark
PAXgene™ Blood RNA Tube	PreAnalytiX, Hombrechtikon, Sveits
PHM 92 Lab pH meter, Buffer Solution pH 1,68 og 4,01	Radiometer Analytical A/S, København, Danmark
Ultrafree®- CL Centrifugal Filter Units 0,1 µm	Millipore, Billerica, MA

Annet utstyr: Standard laborietstyr

Appendiks B

Utdrag fra Immunsuppressiv protokoll ved levertransplantasjon

Hentet fra www.anx.no (63)

Standard induksjons- og vedlikeholdsbehandling VOKSNE

PRINT

Nye data viser at opptil 20% av leverpasienter som behandles med duobehandling (steroider og kalsinevrinhemmere), utvikler nyresvikt over tid. Trippelbehandling med steroider, lavdose kalsinevrinhemmer og mykofenolatmofetil antas å redusere nyrekomplikasjonene. Mange av pasientene har tendens til hepatorenalt syndrom og mange får nyrepåvirkning postoperativt slik at de fleste pasienter i dag i praksis får trippelbehandling. Rikshospitalet har derfor innført som rutine trippelbehandling med steroider, takrolimus (Prograf) og mykofenolatmofetil (Cellcept).

Se egen protokoll for barn.

Alternativt for voksne og barn brukes trippelbehandling med steroider, ciklosporin og mykofenolat, se egen protokoll.

Vennligst les forbehold om protokoll og korrekt gjengivelse, nederst på siden ([les her](#)).

LeverTx - voksne - standard						
Dag	Døgndose steroider Prednisolon p.o. Solu-Medrol i.v.	Dosering Takrolimus (Prograf)	Konsentrasjon [Takrolimus]	Dosering Mykofenolat (Cellcept)	Konsentrasjon Mykofenolat [MPA]	
Under operasjon	40 mg iv ved start 500 mg iv før reperf 40 mg postop					
1	80 mg	start 0,05 mg/kg x2 p.o. videre justering etter kons.	5-15 µg/L	1g x2	3-5 mg/L (tentativt)	
2	80 mg					
3	70 mg					
4	60 mg					
5	50 mg					
6	40 mg					
7	30 mg					
8-30	20 mg					
31-60	15 mg					5-10 µg/L
61-90	10 mg					5-10 µg/L
91-180	7,5 mg	5-10 µg/L				
181-360	5 mg	5-8 µg/L				
>360	→ 0 (nedtrapp) **		3-8 µg/L	1g x1		
** Ikke videre steroid-nedtrapping ved autoimmun-lidelse						

NB: Viktige forbehold, fra innledningen til Rikshospitalets protokoll:

"Det er nedlagt et stort arbeid for å kontrollere medikamentdoser, etc.

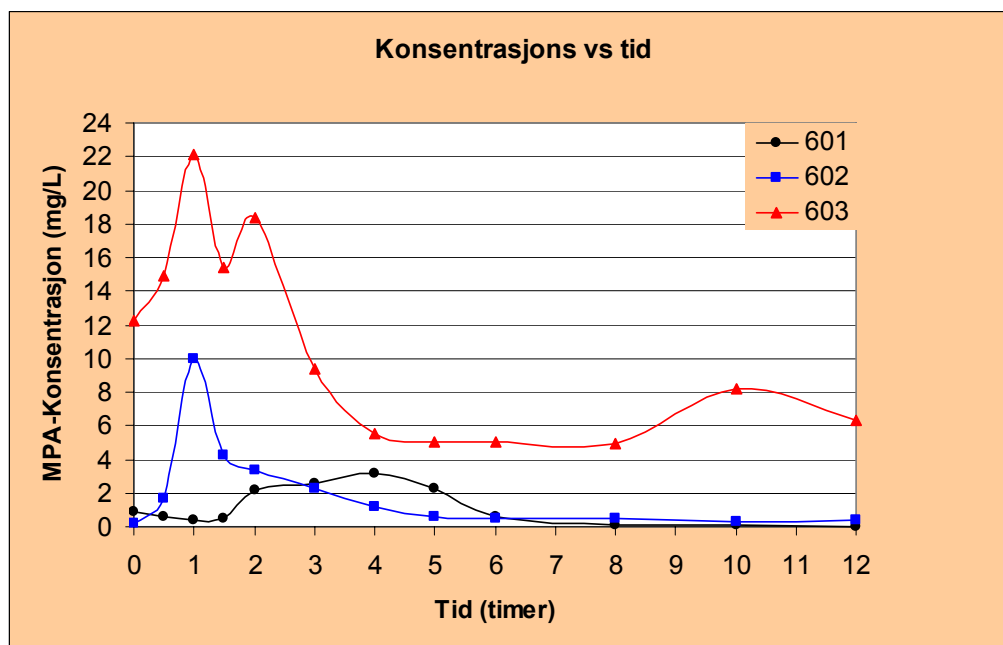
Protokollen fritar imidlertid ikke den enkelte for å kontrollere slike opplysninger og sørge for at indikasjon, dose og administrasjonsmåte er i samsvar med de oppdaterte anbefalinger og retningslinjer som finnes i felleskatalog, legemiddelhåndbøker, etc."

[fra innledning til protokollen, w/ Overlege Aksel Foss, Kirurgisk klinikk, Rikshospitalet]

Appendiks C

Pilotstudie

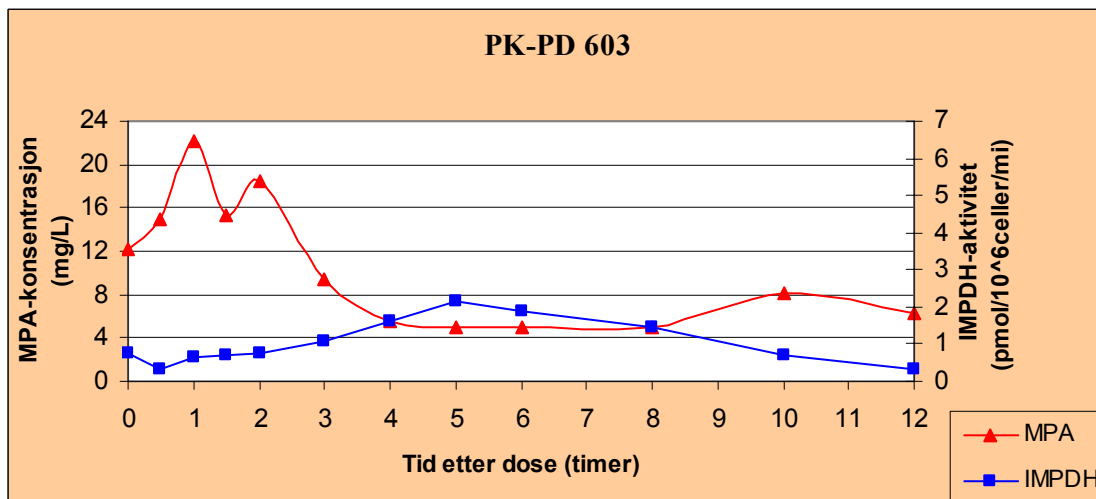
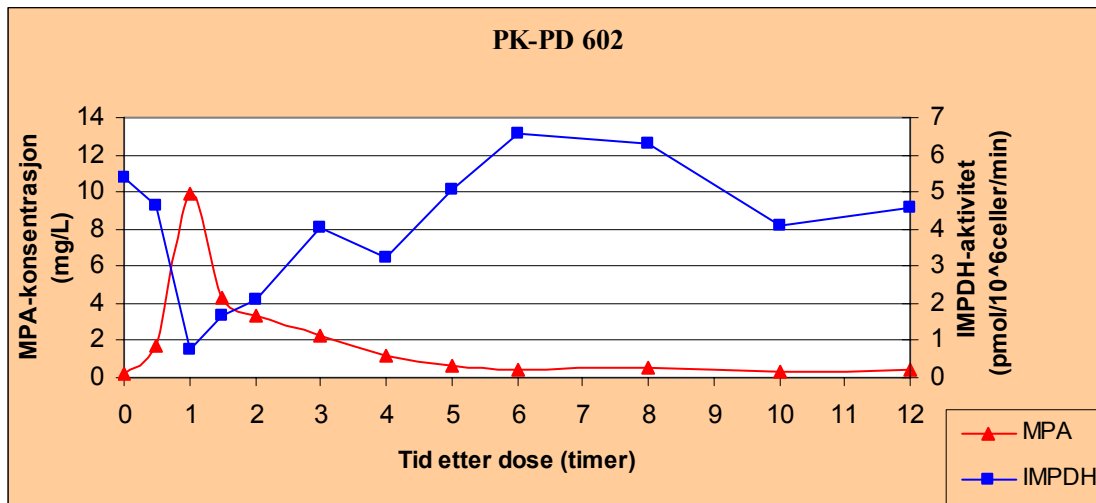
Det ble utført konsentrasjonsmålinger innen et doseintervall for hver av 3 pasienter, henholdsvis pasient 601, -602 og -603 (se figur CI).



Figur CI, Konsentrasjon-tid kurver for pasienter inkludert i pilot-studie

For pasient 602 og 603 ble det også gjort målinger av IMPDH aktiviteten (se figur CII). Hos pasient 603 var konsentrasjonene av MPA så høye at IMPDH tilnærmet var slått helt ut. Pasient 602 sin IMPDH profil var mer regelmessig, og viser en tettere korrelasjon med MPA konsentrasjonsprofilen.

Pasientene som ble inkludert til pilotundersøkelsen var i forskjellige tidsperioder etter transplantasjon, og profilene er derfor ikke direkte sammenliknbare. Profilene illustrerer tydelig at det er essensielt med korte intervaller mellom prøvene, spesielt i første del av intervallet.



Figur CII, PK-PD sammenheng for pasient 602 og 603 inkludert i pilot-studie

Appendiks D

Prøveplan

Monomix - Blodprøver: tidspunkt					
Prøveglass	Tidspkt	MMF-dose	Steroid-dose	Takro-dose	Blodvolum:
+C +D ¹⁾ +Pax ²⁾	Pre-Tx ³⁾				10,5
C +D +E ⁴⁾	Innkomsprøve				14,5
		<i>reg.tidspkt</i>	<i>reg.tidspkt</i>	<i>reg.tidspkt</i>	
	ca -12:00	Forrige dose			
A+B +C +D ¹⁾	-01:00				18
A+B +C +D ¹⁾	-00:10	Troughprøve			18
	00:00	Doseinntak			
A+B	00:30	Prøve			10
A+B	01:00	"			10
A+B	01:30	"			10
A+B +D ¹⁾	02:00	"			14
A+B	02:30	"			10
A+B	03:00	"			10
A+B	04:00	"			10
A+B	05:00	"			10
A+B +D ¹⁾	06:00	"			14
A+B	08:00	"			10
A+B	10:00	"			10
A+B +C +D ¹⁾ +Pax ²⁾	12:00	"			20,5
Total blodvolum per studieperiode					174,5

Doseintervall

¹⁾ Prøveglass D ble brukt i den øvrige delen av

hovedstudien til å se på ekspresjon i CD4+-celler

²⁾ Paxgene-rør ble brukt i den øvrige delen av

hovedstudien til å se på ekspresjon i fullblod

³⁾ Ble kun tatt dersom pasient ble innlagt i god tid før tx

⁴⁾ Prøveglass E ble brukt i den øvrige delen av

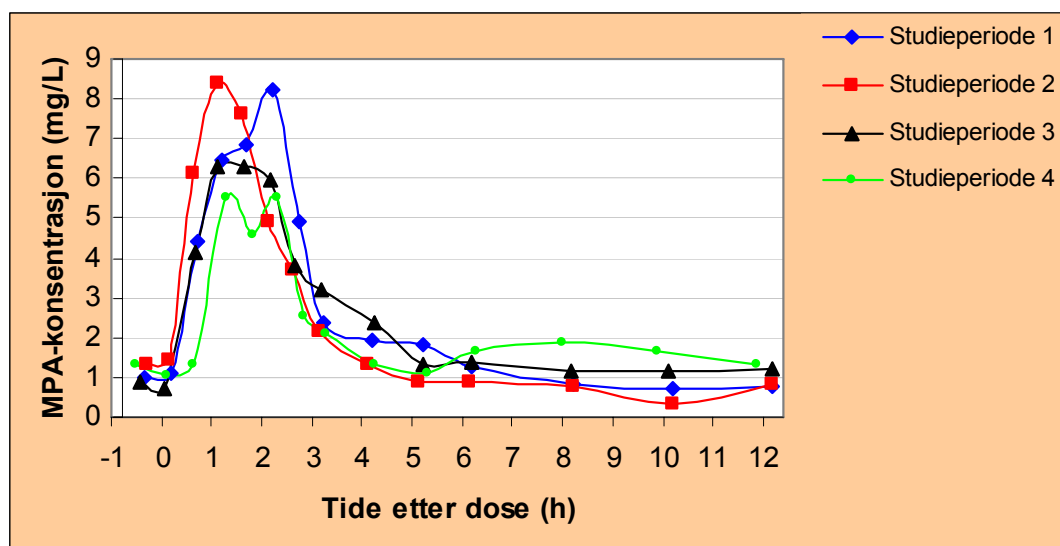
hovedstudien til genotyping

Monomix - Blodprøver: rør, volum og analyser

Prøveglass	Volum	Bearbeides	Slutt	Analyser for
Prøveglass A	2	Sentrifugeres	Plasma	MPA
EDTA-fullblod	2	Sentrifugeres	Fullblodcelle-	IMPDHa
	2	=fullblod	Fullblod	Takrolimus
Prøveglass B	4	Dynalbeads	CD4+ celler	IMPDHa
Prøveglass C	4	Dynalbeads	CD4+ celler	IMPDHa

Appendiks E

Median konsentrasjon-tid kurver

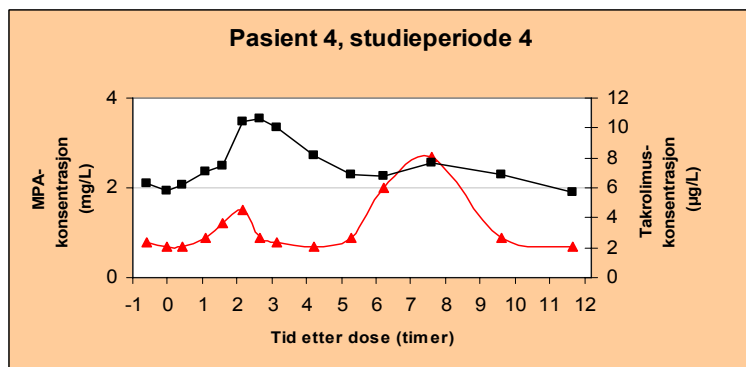
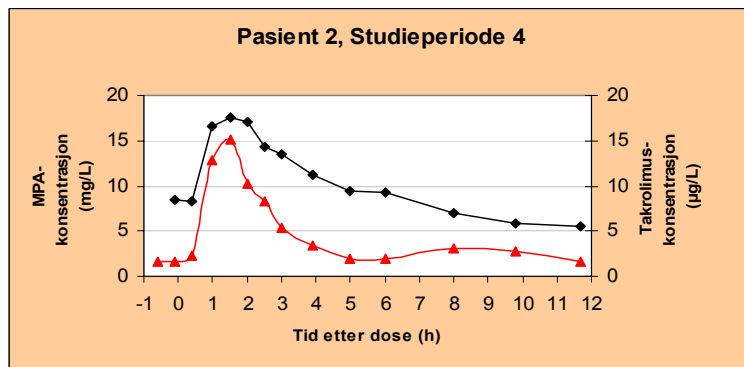
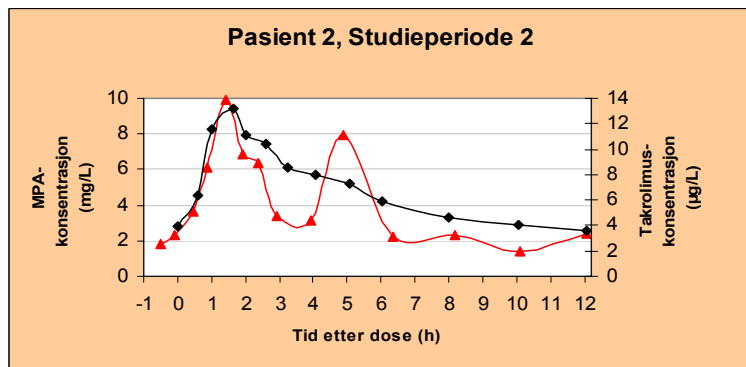
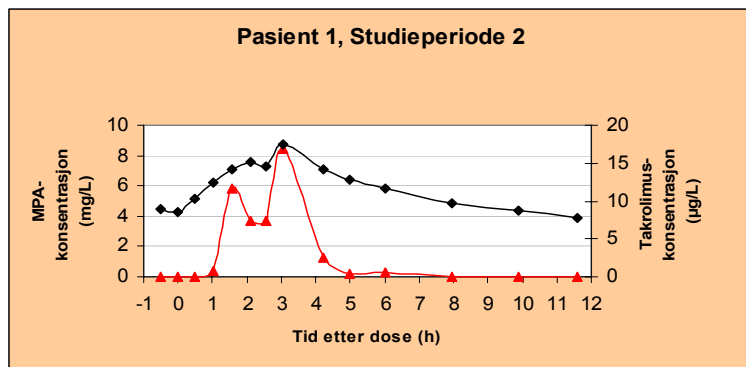


Figur E1: Median konsentrasjon-tid profiler for de fire studieperiodene. Minimum- og maksimumsverdier er ikke vist

Det ble observert en nedgang i C_{\max} med tiden. Det ble også observert en tendens til økende grad av enterohepatisk resirkulering med tiden.

Appendiks F

Konsentrasjon-tid profiler for mykofenolat og takrolimus



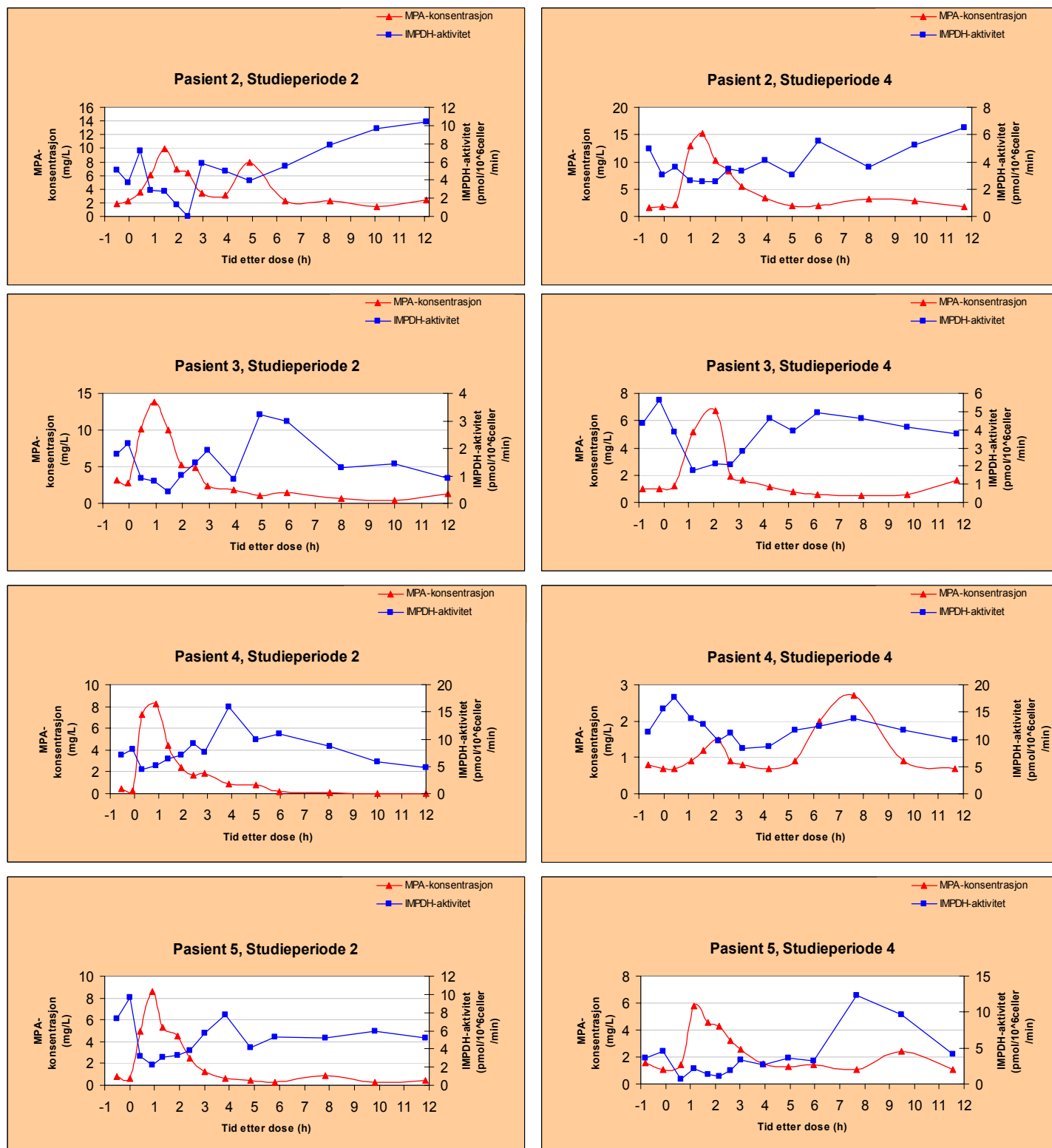
Figur FI: Konsentrasjon-tid profiler¹⁾ for utvalgte pasienter. Kurvene illustrerer MPA-konsentrasjon²⁾ (▲) og takrolimus-konsentrasjon³⁾ (■)

- 1) Verdiaksene i profilene er tilpasset hver enkelt pasient og studieperiode
- 2) Målt i plasma
- 3) Målt i fullblod

Det er lite beskrevet angående enterohepatisk resirkulering av takrolimus i litteraturen. Kurvene for pasient 2, studieperiode 4, viser konsentrasjonsendringer over tid slik de oppfører seg ved normale forhold.

Appendiks G

PK-PD profiler studieperiode 2 og -4



Figur G1: PK-PD profiler for pasient 2-5, studieperioder 2 og 4. MPA-konsentrasjonen illustreres med firkant (■), og IMPDHa med trekant (▲). X- og Y-aksene til profilene er tilpasset den enkelte pasient og studieperiode