

Therapeutic Drug Monitoring der Immunsuppressiva

Katharina M. Rentsch¹, Nathalie Grignaschi², Gert Printzen³, André Scholer²

im Namen der Arbeitsgruppe «Medikamente» der Schweizerischen Gesellschaft für Klinische Chemie

Summary

Therapeutic drug monitoring (TDM) of immunosuppressant drugs is of particular importance in transplantation medicine. Rejection of the transplanted organ and many of the side effects may be due to decreased or elevated concentrations of the immunosuppressant drugs, respectively. Usually a blood sample is taken immediately before the application of the next dose (through level) in steady state. For cyclosporine A the determination of the peak level exactly 2 hours after application of the drug becomes more and more important (C2 level).

There are two different analytical techniques, which are used for TDM in transplantation medicine, immunological methods and HPLC mainly with mass spectrometric detection. Mass spectrometry enables a very specific quantification of the parent drug, which can not be achieved with any of the immunoassays. The participation in an external quality control scheme is mandatory for each laboratory performing analyses of immunosuppressant drugs.

suppressiver Wirkstoffe eine wichtige Triebfeder dieser Fortschritte dar.

Da neue Wege bei der Transplantation von Organen, Geweben, Knochenmark (KM) und anderen Körperteilen vorläufig noch nicht für die Transplantationsroutine erschlossen sind, wird für eine erfolgreiche Organtransplantation beim Menschen der Einsatz immunsuppressiv wirkender Substanzen – zur Prophylaxe einer akuten oder chronischen Abstossung – von grosser Wichtigkeit, wenn nicht von entscheidender Bedeutung, bleiben. Erst durch das Beschreiten neuer Wege, die in der Forschung intensiv bearbeitet werden, wird es möglich sein, den Einsatz dieser Immunsuppressiva zu reduzieren oder ganz auf sie zu verzichten; hierzu zählen z.B. allogene Knochenmarkstransplantation, Züchtung von Organen über Stammzellbehandlung usw. Die Intention ist, eine vollständige Histokompatibilität zu erreichen und Produkte zu erhalten, die nicht die mindeste Abstossung verursachen und somit den Einsatz von Immunsuppressiva erübrigen.

Historisch gesehen konnten überhaupt erst mit dem Einsatz der Immunsuppressiva der neueren Generation, wie Ciclosporin A, erfolgreiche Transplantationen von Organen und des Knochenmarks durchgeführt werden, da die neuen Substanzen eine Unterdrückung der Abstossungsreaktion über längere Zeit (bis Jahrzehnte)

erlauben. Unterschieden werden kann zwischen spezifischer und unspezifischer Immunsuppression: Die unspezifische stoppt oder schwächt die Aktivitäten des Immunsystems unabhängig vom Antigen, während die spezifische nur jene Lymphozytenklone inaktiviert, die eine Spezifität gegen das Spenderantigen besitzen.

Heutzutage werden die in Abbildung 1 aufgeführten Substanzen zur immunsuppressiven Langzeittherapie nach Transplantationen eingesetzt. Der Einsatz dieser Immunsuppressiva verläuft jedoch nicht so problemlos wie gewünscht. Immunsupprimierende Medikamente weisen einen sehr engen therapeutischen Bereich und sowohl hohe intra- und interindividuelle pharmakokinetische als auch pharmakodynamische Variabilität auf. Bei zu hoher Dosierung treten starke, unerwünschte Nebenwirkungen auf (siehe Tabelle 2), die für den Transplantatempfänger einschneidende Folgen haben können, und bei zu niedriger Dosierung droht die Transplantat-abstossung. In praxi bedeutet dies eine permanente Dosisanpassung nach Veränderung der Pharmakokinetik und/oder -dynamik. Hier spielt das «Therapeutic Drug Monitoring» (TDM), also die korrekte Überwachung dieser Arzneimittel auf der Basis von Medikamentenspiegelmessungen im Blut oder Plasma des individuellen Patienten, eine eminente Rolle.

In der Transplantationsmedizin wurden in den letzten Jahrzehnten – insbesondere jedoch in den letzten Jahren – beeindruckende Fortschritte erzielt. Einerseits hat sich nicht nur die Kenntnis und Verfeinerung der verschiedenen Transplantationsarten enorm verbessert, sondern auch die Akzeptanz dieser medizinischen Disziplin. Andererseits stellte und stellt die Einführung und Weiterentwicklung immu-

Tabelle 1.
Transplantationsübersicht der Schweiz für 2003 und 2004
(Quelle: www.swisstransplant.ch).

	Transplantationen		Funktionsrate nach		
	Schweiz	weltweit	1 Jahr	5 Jahren	
	2003	2004			
Herztransplantation	34	29	54 000	ca. 85%	ca. 65%
Knochenmarkstransplantation		331	21 474 (Europa)		
Lebertransplantation	94	84	74 000	ca. 80%	ca. 65%
Lungentransplantation	31	36	10 000	ca. 73%	ca. 60%
Nierentransplantation	299	256	470 000	ca. 85%	ca. 65%
Pankreastransplantation	14	11	10 000	ca. 85%	ca. 65%

¹ UniversitätsSpital Zürich;

² Universitätsspital Basel;

³ Inselspital Bern

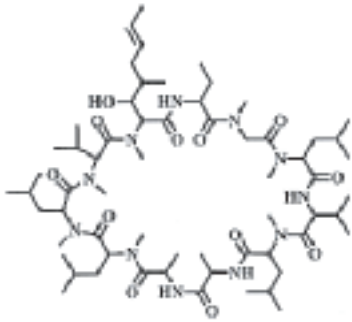
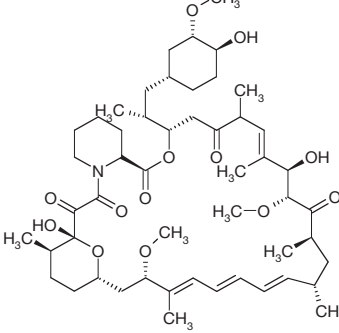
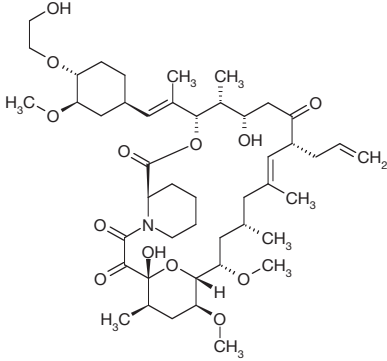
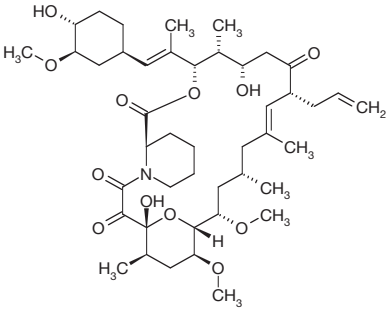
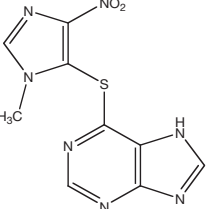
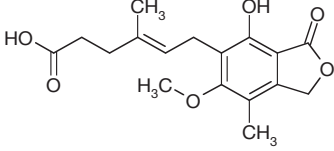
Ciclosporin A $C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$ MG 1202.61	Tacrolimus (FK506) $C_{44}H_{69}NO_{12} \cdot H_2O$ MG 822.05
	
Everolimus $C_{53}H_{83}NO_{14}$ MG 958.25	Sirolimus (Rapamycin) $C_{51}H_{79}NO_{13}$ MG 914.2
	
Azathioprin $C_9H_7N_7O_2S$ MG 277.3	
Mycophenolsäure $C_{23}H_{31}NO_7$ MG 320.34	

Abbildung 1.
Arzneimittel zur immunsuppressiven Langzeittherapie.

Während einer medikamentösen Dauertherapie erfolgt die Blutentnahme im Rahmen des TDM üblicherweise im Steady state. Kurz vor der Verabreichung der nächsten Dosis wird die minimale, kurz nach Verabreichung (je nach Pharmakon ca. 30–120 Min.) die maximale Arzneimittelkonzentration ermittelt. Beim Ciclosporin A z.B. erfolgt unmittelbar vor dessen nächster Applikation die Bestimmung des Talspiegels (trough level) oder – nach

2 Stunden – die Bestimmung des C2-Spiegels, der zunehmend als wichtiger erachtet wird, da er den Zustand der Immunsuppression besser widerspiegeln soll. Zu beachten sind die unterschiedlichen therapeutischen Bereiche in Abhängigkeit vom Dosierungsschema.

Die klar definierten Ziele einer «Therapeutic Drug Monitoring»-(TDM)-gesteuerten individualisierten immunsuppressiven Therapie bestehen in der

Reduktion der akuten und chronischen Abstossungsreaktionen, der Reduktion der Antirejektionstherapien sowie der Reduktion von Toxizität, opportunistischer Infektionen und Malignität durch Vermeidung von «Über-Immunsuppression».

Therapeutic Drug Monitoring (TDM)

Die für ein TDM zur Verfügung stehenden Analysemethoden können grob in zwei Gruppen eingeteilt werden: einerseits in die der immunologischen und andererseits in die der chromatographischen Methoden.

TDM mit immunologischen Analysetechniken

Bisher erfolgte die Konzentrationsbestimmung der wichtigsten immunsuppressiven Medikamente Ciclosporin A und Tacrolimus fast ausschliesslich mittels immunologischer Analysetechniken; dies vor allem wegen der guten Verfügbarkeit und Routinetauglichkeit dieser Analytik.

Nach den Empfehlungen der Consensus Conference on Ciclosporin Monitoring in Organ Transplantation (Ther Drug Monit 1995;17:642–54) sollten beim TDM jedoch analytische Methoden eingesetzt werden, die spezifisch für die jeweiligen Muttersubstanzen sind. Analoges gilt auch für die anderen Immunsuppressiva. Diese Spezifität ist jedoch bei keinem der kommerziell erhältlichen immunologischen Tests in toto gegeben. Variable Kreuzreaktivität mit inaktiven oder aktiven Metaboliten der Muttersubstanzen verunmöglichen ein «korrektes Analyseergebnis» mit diesen Analysemethoden. Diese Kreuzreaktivitäten variieren zum Teil stark zwischen Kits von verschiedenen Herstellern und zwischen verschiedenen Analysesystemen.

Deshalb werden zunehmend häufiger HPLC-Methoden eingesetzt, vor allem mit massenspektrometrischer bzw. tandem-massenspektrometrischer Detektion. Diese Analysemethoden erlauben die spezifische Detektion und Quantifizierung der aktiven Muttersubstanz und gegebenenfalls die separate Quantifizierung der Metaboliten. Durch die Interaktion der Metaboliten liefern alle Immunoassays im Vergleich zur LC-MS/MS-Technik im Durchschnitt falsch höhere Werte.

Tabelle 2.
Pharmakologische Eigenschaften der Immunsuppressiva und Hinweise zur Analytik.

Substanz/ Medikament	Indikation/ Einsatzgebiet	Immunsuppressive Wirkung	t _{1/2} und Elimination	Pharmakokinetik	Interaktionen	Häufigste Nebenwirkungen	Analytik
Ciclosporin A / CsA / Sandimmun®, Sandimmun Neoral® Zyklisches Undecapeptid des Bodenpilzes Tolypocladium inflatum	Zur Prophylaxe und Therapie von Abstoßungsreaktionen nach Organtransplan- tation, aber auch bei Autoimmunkrankheiten	Potenter Inhibitor der T-Zellaktivierung und -Proliferation. Wirkt durch Bindung an Immuno- philine und Hemmung/ Blockade von Calcineurin und damit der Trans- kription von Interleukin-2, IL-4, IFN-gamma und TNF-alpha. Die Wirkung ist besonders stark in CD4-Lymphozyten (T-Helferzellen).	t _{1/2} : 5–18 Stunden Elimination: 94% hepatisch 6% renal	Enger therapeutischer Bereich und variable Bioverfügbarkeit (weniger bei Sandimmun Neoral®) CYP-3A4-Substrat	Wechselwirkungen bei Komedikation mit Arzneimitteln, die ebenfalls über CYP 3A4 verstoff- wechselt werden	Überdosierung kann zu schwerer Nephro- und Neurotoxizität sowie hepatischer Dysfunktion mit Anstieg der Trans- aminasen und leichter Bilirubinämie führen.	Üblich ist die Bestim- mung des Talspiegels (trough level) aus hämolyisiertem EDTA- Vollblut. Zunehmend werden die CsA- Spitzenspiegel C2 (Blutentnahme exakt 2 Stunden nach Gabe des Medikamentes) bestimmt, da sie besser mit der immunsuppressiven Wirkung korrelieren. Jeder Immunoassay hat eine andere (z. T. massive) Kreuz- reaktivität mit den zahlreichen Meta- boliten des CsA.
Tacrolimus / FK 506 / Prograf® Macrolidlacton des Pilzes Streptomyces tsukubaensis	Zur Prophylaxe und Therapie von Abstoßungs- reaktionen nach Organtransplantation	Als Calcineurin-Inhibitor sind Wirkung und Wirkmechanismus dem Ciclosporin ähnlich. Ist nur an «FK Binding Protein-12» (FKBP12) gebunden aktiv.	t _{1/2} : 12–15 Stunden Elimination: 99% hepatisch 1% renal	Resorption im Dün- darm unvollständig und abhängig von Darmmotilität und Nahrungszusammen- setzung CYP-3A4-Substrat	Wechselwirkungen bei Komedikation mit Arzneimitteln, die ebenfalls über CYP 3A4 verstoff- wechselt werden	Im Vordergrund stehen zentralnervöse Störungen (Tremor, Depression, Schwindel) und Nephrotoxizität.	Bestimmung des Talspiegels aus hämolyisiertem EDTA- Vollblut. Die Meta- boliten M3 und M5 haben eine messbare Kreuzreaktivität mit den auf dem Markt erhältlichen Immuno- assays.
Sirolimus (Rapamycin) / Rapamune® Makrolid- antibiotikum des Pilzes Streptomyces hygroscopicus	Zur Prophylaxe und Therapie von Abstoßungsreaktionen nach Organtrans- plantation	Ist nur an «FK Binding Protein-12» (FKBP12) gebunden aktiv. Der Rapa-FKBP12-Kom- plex bindet an die TOR- Kinase («target of rapa- mycin»). Die Bindung an TOR führt zur Blockierung der durch IL-2 ausgelösten intra- zellulären Signaltrans- duktion. Dies führt zu einer Hemmung der Lympho- zytenaktivierung.	t _{1/2} : 46–78 Stunden Elimination: >90% hepatisch <3% renal	CYP-3A4-Substrat und -Induktor	Wechselwirkungen bei Komedikation mit Arzneimitteln, die ebenfalls über CYP 3A4 verstoff- wechselt werden	Hyperlipidämie, Leukopenie, Anämie und Thrombozytopenie	Bestimmung des Tal- spiegels aus hämoly- isiertem EDTA-Vollblut. Die Analysen werden idealerweise mittels LC-MS/(MS) durch- geführt (keine Kreuz- reaktivität mit Meta- boliten), seit kurzem ist auch ein Immuno- assay im Handel.
Everolimus / RAD001 / Certican® Wird als Stoff- wechselprodukt aus Streptomyces- hygroscopicus- Kulturen gewonnen und anschliessend chemisch modifiziert.	Zur Prophylaxe und Therapie von Ab- stoßungsreaktionen nach Organtrans- plantation, immer in Kombination mit Ciclosporin	Ist nur an «FK Binding Protein-12» (FKBP12) gebunden aktiv. Führt zu einer Aktivierung der anti- genaktivierten T-Zell-Pro- liferation und damit der klonalen Ausbreitung, welche durch T-Zell- spezifische Interleukine bewirkt wird.	t _{1/2} : 16–35 Stunden Elimination: >90% hepatisch <3% renal	Unterschiedet sich vom natürlichen «Sirolimus» nur in einer Seitenkette des Cyclohexanringes, was ausreicht, um die Kinetik nach oraler Applikation zu ver- bessern. CYP-3A4-Substrat	Wechselwirkungen bei Komedikation mit Arzneimitteln, die ebenfalls über CYP 3A4 verstoff- wechselt werden	Hyperlipidämie, Leukopenie, Thrombo- zytopenie, Hypertonie	Bestimmung des Tal- spiegels aus hämoly- isiertem EDTA-Vollblut. Die Analysen werden idealerweise mittels LC-MS/(MS) durch- geführt (keine Kreuz- reaktivität mit Meta- boliten), seit kurzem ist auch ein Immuno- assay im Handel.
Azathioprin / Imurek® Purinanalogon und eines der ältesten Immun- suppressiva	Zur Prophylaxe und Therapie von Ab- stoßungsreaktionen nach Organtrans- plantation, aber auch bei Patienten mit chronisch entzünd- lichen Darmerkrank- ungen und bei Autoimmunkrank- heiten.	Nach der Metabolisierung zu 6-Mercaptopurin und intrazellulärer Phosphory- lierung zu den aktiven 6-Thioguaninnukleotiden (6-TGN), Wirkung als Purinantagonist. Meta- bolischer Steady-state bei der Therapie tritt erst nach 4–6 Monaten ein.	6-TGN: t _{1/2} : ca. 120 Stunden Elimination: überwiegend hepatisch, nur 1–2% unver- ändert über die Nieren	Die Bioverfügbarkeit liegt nach oraler Appli- kation bei ca. 50%. Bei der Verstoffwechse- lung spielt die Thiopurin- S-Methyltransferase (TPMT) eine zentrale Rolle. Eine reduzierte oder fehlende TPMT-Aktivität führt zu schwersten Nebenwirkungen.	Erhöhte Wirkung und Toxizität von Azathioprin durch Sulfasalazin und Allopurinol.	Übelkeit, Pankreatitis, Leukopenie, Thrombo- zytopenie, Panzytopenie (dosisabhängig), toxische Hepatitis	Bestimmung in mit DTT stabilisiertem Heparin-Vollblut. Als Analysemethode wird die HPLC mit UV- Detektion eingesetzt. Die Aktivität der TPMT in den Erythrozyten kann aus EDTA- Vollblut bestimmt werden, ebenso der TPMT-Genotyp.

Substanz/ Medikament	Indikation/ Einsatzgebiet	Immunsuppressive Wirkung	t _{1/2} und Elimination	Pharmakokinetik	Interaktionen	Häufigste Nebenwirkungen	Analytik
Mycophenolat Mofetil (MMF) / CellCept® synthetisches Präparat Mycophenolsäure (MPA) / Myfortic®, MMF ist der Morpholinoethylester des MPA, welches die pharmakodynamisch wirksame Substanz darstellt.	Zur Prophylaxe und Therapie von Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantation. Immer in Kombination mit Ciclosporin, Tacrolimus, Sirolimus oder Everolimus	MMF ist eine Pro-Drug, weil es nach oraler Gabe zu MPA hydrolysiert wird. MPA wirkt als nicht-kompetitiver, reversibler Inhibitor der Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase (IMPDH), ein Schlüsselenzym im De-novo-Weg der Guanosin-Nucleotidsynthese. Diese ist essentiell für die Proliferation von T- und B-Lymphozyten und führt deshalb zu einer selektiven Proliferationshemmung.	t _{1/2} : 17 Stunden Elimination: 93% renal 5,5% hepatisch	MPA wird in der Leber hauptsächlich zum phenolischen MPA-glucuronid umgewandelt, welches keine Wirkung besitzt. Aufgrund des enterohepatischen Kreislaufs ist ca. 6–8 Stunden nach der Verabreichung von MPA ein zweiter MPA-Peak zu erwarten.	Nur wenige andere Medikamente beeinflussen die Konzentration von MPA; Wechselwirkungen wurden u.a. beschrieben mit CsA, Cholestyramin, Metronidazol, Acyclovir und einigen Antazida (Reduktion der Plasmakonzentration von MPA).	Gastrointestinale Beschwerden (Übelkeit, Diarrhoe) und Panzytopenie	Bestimmung im EDTA-Plasma. Sowohl HPLC-Methoden als auch Immunoassays stehen für die Bestimmung des MPA-Spiegels im Plasma zur Verfügung. Der EMIT-Assay weist eine Kreuzreaktivität mit den Acyl-glucuronierten aktiven Metaboliten des MPAs auf. MMF und M2 haben eine messbare Kreuzreaktivität im Immunoassay von EMIT.

TDM mittels LC-MS/MS

Wird im Kontext mit Organtransplantationen vielfach der Terminus «High-Tech-Medizin» benutzt, so ist das Pendant für das TDM von Immunsuppressiva die LC-MS/MS-Technik als der anerkannte «Goldstandard». Sie ist als Analyseverfahren spezifisch für die Muttersubstanz.

Neben verlässlicheren Analysewerten ist es mit dieser Technik zudem auch möglich, mehrere der immunsupprimierenden Medikamente (z.B. Ciclosporin A, Tacrolimus, Sirolimus, Everolimus) in einem einzigen chromatographischen Lauf parallel zu analysieren.

Die pharmakologischen Eigenschaften der verschiedenen Immunsuppressiva sowie Hinweise zu Analytik finden sich in Tabelle 2 dargestellt.

Externe Qualitätskontrolle

Die externe Qualitätskontrolle für alle

klinisch eingesetzten Immunsuppressiva wird von der Firma Analytical Services International (Dr. D. Holt) in London, Grossbritannien, angeboten (www.bioanalytics.co.uk). Der Ringversuch für das Ciclosporin wird in der Schweiz auch durch das CSCQ in Genf versandt. Die Teilnahme an den Ringversuchen sollte für jedes Labor, das Analysen von Immunsuppressiva durchführt, obligatorisch sein.

Zusätzliche Empfehlungen für die Bestimmung des Ciclosporin A

Es sollen nur noch die neueren immunologischen Verfahren mit geringem Metaboliteneinfluss eingesetzt werden:

- Ciclosporin CEDIA Plus Microgenics
- Ciclosporin AxSYM ABBOTT
- Ciclosporin A DADE Behring EMIT
- Ciclosporin A Flex DADE Behring (Dimension Geräte)
- Die TDx-CsA-monoklonal-Methode soll nicht mehr eingesetzt werden.

Referenzwerte sollen nicht auf den Berichten angegeben werden. Im Labor sollten Richtwerte existieren, auf die bei Anfragen zurückgegriffen werden kann.

Anmerkung: Die LCMS/LC-MS/MS-Technik ist der anerkannte «Goldstandard» für das TDM immunsuppressiver Medikamente und als einziges Verfahren wirklich spezifisch für die Muttersubstanz. Diese Spezifität wird bei keinem der kommerziell erhältlichen Immunoassays erreicht.

PD Dr. sc. nat. Katharina M. Rentsch
Institut für Klinische Chemie
UniversitätsSpital Zürich
Rämistrasse 100
CH-8091 Zürich
rentsch@ikc.unizh.ch

Literatur

bei den Autoren erhältlich.

Empfehlungen der Arbeitsgruppe Medikamente der Schweizerischen Gesellschaft für Klinische Chemie

	Ciclosporin A	Tacrolimus	Sirolimus	Everolimus	Mycophenolat
Spezifität des Tests	Muttersubstanz	Muttersubstanz	Muttersubstanz	Muttersubstanz	Muttersubstanz + aktive Metaboliten
Messbereiche	C0: 10–500 µg/l C2: 500–2000 µg/l	0,5–50 µg/l	0,5–100 µg/l	0,5–40 µg/l	1,0–30 µg/l
Referenzmethode	HPLC, LC MS ⁿ	LC MS ⁿ	LC MS ⁿ	LC MS ⁿ	HPLC
Impräzision	10% <50 µg/l 5% >50 µg/l	15% <3 µg/l 10% >3 µg/l	15% <3 µg/l 10% >3 µg/l	15% <3 µg/l 10% >3 µg/l	15% <3 µg/l 10% >3 µg/l
Probenmaterial	EDTA-Vollblut	EDTA-Vollblut	EDTA-Vollblut	EDTA-Vollblut	EDTA-Plasma
QC extern	1× monatlich, obligatorisch				
Befundung	keine Referenzwerte, Angabe der Methode				
Vorsichtsmassnahmen	Versand per A-Post				