

Katedra i Klinika Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej  
Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

lek. Paweł Poznański

Rozprawa doktorska

**Analiza mechanizmów skuteczności leczenia immunosupresyjnego u biorców  
przeszczepu nerki z wykorzystaniem parametrów farmakogenomicznych  
i farmakokinetycznych metabolizmu leków, a także oceny  
działań niepożądanych i jakości życia**

Promotor: dr hab. n. med. Dorota Kamińska

## **1 Streszczenie**

### **Wstęp**

Leczenie przeszczepianiem narządów stało się możliwe dzięki farmakologicznemu przełamaniu bariery immunologicznej. Podtrzymująca terapia immunosupresyjna polega na podawaniu kombinacji (najczęściej trzech) leków immunosupresyjnych o różnych punktach uchwytu, które mają działać jako profilaktyka procesu odrzucania przeszczepionej nerki. Dawkowanie leków, ustalane wyłącznie na podstawie masy ciała i okresu po przeszczepieniu, może prowadzić do niedostatecznej immunosupresji ze zwiększonym ryzykiem odrzucania lub nadmiernej immunosupresji ze zwiększonym ryzykiem infekcji, nowotworów, czy wystąpienia objawów toksyczności leków. Farmakoterapia monitorowana stężeniami leków w organizmie, nazywana też terapeutycznym monitorowaniem leków (*therapeutic drug monitoring*, TDM), polega na takim modyfikowaniu dawkowania leków, aby oznaczone stężenia mieściły się w wyznaczonym zakresie przedziału terapeutycznego.

### **Cele**

Celem przeprowadzonego badania była ocena możliwości skutecznego monitorowania farmakokinetycznego kwasu mykofenolowego i takrolimusu oraz analiza wpływu ocenianych parametrów farmakokinetycznych na losy przeszczepu oraz występowanie działań niepożądanych stosowanych leków. W badaniu zaplanowano również ocenę przydatności

analizy farmakogenomicznej, rutynowych badań laboratoryjnych, a także polifarmakoterapii oraz interakcji międzylekowych, w kontekście skuteczności leczenia immunosupresyjnego i występowania jego działań niepożądanych.

## **Material i metodologia**

Do badania zostało włączonych 130 biorców przeszczepu nerki (86 mężczyzn i 44 kobiety, w wieku  $52,3 \pm 12,5$  lat, średnio  $6,2 \pm 5,0$  lat po transplantacji). Leczenie immunosupresyjne było oparte o takrolimus, mykofenolan mofetilu oraz glikokortykosteroidy w dawce 5 mg w przeliczeniu na prednizon.

Oznaczenia stężeń kwasu mykofenolowego wykonane zostały metodą immunoenzymatyczną (EMIT) w trzech punktach czasowych: przed oraz po 30 i 120 minutach od przyjęcia dawki leku. Na ich podstawie wyznaczono stężenie maksymalne oraz oszacowano pole pod krzywą zależności stężenia leku we krwi od czasu. Oznaczenia stężenia minimalnego takrolimusu w próbkach krwi pełnej wykonywano przy pomocy metody powinowactwa (ACMIA).

Polimorfizmy genów związanych z metabolizmem leków immunosupresyjnych: *ABCB1* 3435C>T, *CYP3A4* -392A>G (promotor; \*1, \*1B) i *CYP3A5* 6986A>G (intron3; \*1, \*3) oznaczano za pomocą metody polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP).

W badaniu uwzględniono ponadto standardowe oznaczenia laboratoryjne, a także wykładniki systemowej odpowiedzi zapalnej, wyznaczane na podstawie automatycznego rozmazu krwi obwodowej (NLR, MLR, PLR, dNLR).

Potencjalne interakcje międzylekowe (*potential drug-drug interactions*, pDDI) oceniono za pomocą aplikacji mobilnej Lexicomp®. Przeprowadzono również badanie ankietowe z użyciem autorskiego kwestionariusza oceniającego jakość życia i występowanie działań niepożądanych stosowanych leków.

## **Wyniki**

Wykazano zależności pomiędzy polem pod krzywą a stężeniami kwasu mykofenolowego ocenianymi we wszystkich trzech punktach czasowych. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w zakresie parametrów farmakokinetycznych w zależności od stosowanego preparatu mykofenolanu mofetilu.

Zaobserwowano istotnie niższe wartości filtracji kłębuszkowej w grupie osób osiągających subterapeutyczne stężenia takrolimusu. Na podstawie analizy ROC wyznaczono punkty odcięcia dla współczynników C/D, tj. stężenia minimalnego w przeliczeniu na dawkę

dobową i dawkę na kilogram masy ciała, które wskazują na zwiększone ryzyko uzyskania subterapeutycznego stężenia takrolimusu. Dodatkowo wykazano, że współczynnik C/D poniżej 1,67 (ng/mL)/mg wiąże się z osiągnięciem subterapeutycznych stężeń leku oraz gorszą funkcją nerki przeszczepionej.

U pacjentów z uszkodzeniem wątroby obserwowano istotnie niższe stężenia kwasu mykofenolowego we krwi oznaczane po podaniu dawki leku. Nie wykazano istotnych statystycznie zależności pomiędzy oznaczonymi parametrami farmakokinetycznymi takrolimusu a występowaniem cech uszkodzenia wątroby.

Nie wykazano istotnego statystycznie wpływu przyjmowanych inhibitorów CYP3A4 na parametry farmakokinetyczne kwasu mykofenolowego. Natomiast przyjmowanie inhibitorów pompy protonowej wpływało na istotne obniżenie stężenia kwasu mykofenolowego we wszystkich oznaczonych punktach czasowych. Wykazano istotną zależność pomiędzy osiągnięciem wyższych stężeń takrolimusu we krwi a stosowaniem dihydropirydynowych antagonistów kanałów wapniowych, przy braku różnic w dawce dobowej leku immunosupresyjnego.

Obecność alleli *CYP3A4\*1B* i/lub *CYP3A5\*1* była związana z obniżonymi parametrami C/D takrolimusu, ale nie wpływała na farmakokinetykę kwasu mykofenolowego. Nie stwierdzono istotnego statystycznie związku pomiędzy obserwowanym genotypem *ABCB1* a parametrami farmakokinetycznymi kwasu mykofenolowego i takrolimusu.

W przeprowadzonym badaniu ankietowym stwierdzono istotną statystycznie poprawę deklarowanego dobrostanu po przeszczepieniu w stosunku do okresu przedtransplantacyjnego. Dolegliwościami najczęściej zgłaszanymi przez biorców były: zwiększenie masy ciała, zwiększone ciśnienie tętnicze krwi, bóle kostno-stawowe oraz skurcze mięśniowe. Objawy niepożądane nie miały z związku z parametrami farmakokinetycznymi kwasu mykofenolowego, natomiast wykazano słabe ujemne korelacje pomiędzy współczynnikiem C/D dla takrolimusu a występowaniem objawów z układu nerwowego i skórnych. Żaden z ocenianych polimorfizmów genowych nie był związany z częstszym występowaniem działań niepożądanych.

## **Wnioski**

- 1) Zakres stężeń minimalnych kwasu mykofenolowego od 1,5 do 2,7  $\mu\text{g/mL}$  odpowiada zalecanej ekspozycji ocenianej na podstawie AUC, co pozwala oceniać ją w oparciu o pojedynczy pomiar stężenia leku, natomiast współczynnik C/D dla takrolimusu

poniżej 1,67 (ng/mL)/mg wiąże się z osiągnięciem subterapeutycznych stężeń leku oraz gorszą funkcją nerki przeszczepionej.

- 2) Diagnostyka genetyczna w zakresie polimorfizmów *CYP3A4* oraz *CYP3A5* nie znajduje uzasadnienia ze względu na homogenność populacji polskiej w zakresie tych polimorfizmów, a występowanie poszczególnych wariantów w zakresie polimorfizmu *ABCB1* 3435C>T nie wpływa na parametry farmakokinetyczne kwasu mykofenolowego oraz takrolimusu.
- 3) W przypadku występowania cech uszkodzenia wątroby monitorowanie stężenia minimalnego może nie odzwierciedlać ekspozycji na kwas mykofenolowy i należy stosować AUC wyliczany ze wzorów LSS.
- 4) Należy monitorować zlecaną farmakoterapię u pacjentów pod kątem występowania interakcji, gdyż rutynowo stosowane leki (w tym OTC) wpływają na parametry farmakokinetyczne stosowanego leczenia immunosupresyjnego, a tym samym na jego bezpieczeństwo i skuteczność.

## 2 Summary

### Introduction

Organ transplantation has become possible due to the pharmacological overcoming of the immune barrier. Maintenance immunosuppressive therapy consists of a combination of immunosuppressive agents (usually three) with different target molecules, which are expected to act as a prophylaxis of the rejection process of a transplanted kidney. Dosage of drugs, based solely on weight and time after transplantation, can lead to under-immunosuppression with increased risk of rejection, or over-immunosuppression with increased risk of infections, carcinogenesis, and toxicity. Pharmacotherapy monitored by drug concentrations, also known as therapeutic drug monitoring (TDM), allows to modify the doses of medications to achieve designated concentrations.

### Objectives

The aim of the study was to assess the possibility of effective monitoring of the pharmacokinetics of mycophenolic acid and tacrolimus and to analyze the impact of the assessed pharmacokinetic parameters on the fate of the transplant and the occurrence of adverse drug reactions. Moreover, the purpose of the study was to evaluate the usefulness

of pharmacogenomic analysis, routine laboratory tests, as well as polypharmacotherapy and drug interactions in the context of the effectiveness of immunosuppressive treatment and the occurrence of its side effects.

## **Material and methodology**

130 kidney transplant recipients were included in the study (86 men and 44 women, aged  $52.3 \pm 12.5$  years, mean  $6.2 \pm 5.0$  years after transplantation). Immunosuppressive treatment was based on tacrolimus, mycophenolate mofetil and glucocorticoids at a dose of 5 mg in terms of prednisone.

Mycophenolic acid concentrations were determined using the immunoenzymatic method (EMIT) at three time points: before, 30 and 120 minutes after taking the drug dose. On their basis, the maximum concentration was determined and the area under concentration-time curve was estimated. Tacrolimus trough levels in whole blood samples were determined using the affinity assay (ACMIA).

Gene polymorphisms related to the metabolism of immunosuppressive drugs: *ABCB1* 3435C>T, *CYP3A4* -392A>G (promoter; \*1, \*1B) and *CYP3A5* 6986A>G (intron3; \*1, \*3) were determined using the restriction fragment length polymorphism method (RFLP).

The study also included standard laboratory tests as well as markers of systemic inflammatory response, determined on the basis of an automatic peripheral blood smear (NLR, MLR, PLR, dNLR).

Potential drug-drug interactions (pDDI) were assessed using the Lexicomp® mobile application. A survey was also conducted using a proprietary questionnaire evaluating the quality of life and the occurrence of side effects of the drugs used.

## **Results**

The relationship between the area under the curve and the concentrations of mycophenolic acid assessed at all three time points was demonstrated.

No statistically significant differences in pharmacokinetic parameters were observed depending on the used mycophenolate mofetil preparation.

It was shown that the estimated glomerular filtration was significantly lower in the group of patients achieving subtherapeutic concentrations of tacrolimus. Based on the ROC analysis, cut-off points for the C/D ratios, i.e. the trough concentration per daily dose and dose per

kilogram of body weight, were determined, which indicate an increased risk of subtherapeutic tacrolimus concentration. In addition, it has been shown that the C/D ratio below 1.67 (ng/mL)/mg is associated with achieving subtherapeutic concentrations of the drug and with poorer function of the transplanted kidney.

Significantly lower post-dose blood levels of mycophenolic acid were observed in patients with hepatic impairment. There was no statistically significant relationship between the determined pharmacokinetic parameters of tacrolimus and the occurrence of signs of hepatic injury.

No statistically significant effect of CYP3A4 inhibitors on the pharmacokinetics of mycophenolic acid has been demonstrated. Contrary, taking proton pump inhibitors resulted in a significant decrease in the concentration of mycophenolic acid at all time points. There was a significant relationship between the achievement of higher blood concentrations of tacrolimus and the use of dihydropyridine calcium channel blockers, with no difference in the daily dose of the immunosuppressive drug.

The presence of the *CYP3A4\*1B* and/or *CYP3A5\*1* alleles was associated with decreased tacrolimus C/D ratio but did not affect the pharmacokinetics of mycophenolic acid. There was no statistically significant relationship between the observed *ABCB1* genotype and the pharmacokinetic parameters of mycophenolic acid and tacrolimus.

In the conducted survey, a statistically significant improvement in the declared well-being after transplantation in relation to the pre-transplantation period was observed. The complaints most frequently reported by recipients were: weight gain, increased blood pressure, osteoarticular pain and muscle cramps. Adverse events were not related to the pharmacokinetic parameters of mycophenolic acid, while weak negative correlations were found between the C/D ratio for tacrolimus and the occurrence of nervous system and skin symptoms. None of the gene polymorphisms assessed was associated with a higher incidence of adverse reactions.

## **Conclusions**

- 1) The range of mycophenolic acid trough concentrations from 1.5 to 2.7 µg/mL corresponds to the recommended exposure based on AUC, which allows it to be assessed based on a single drug concentration measurement, and the C/D ratio for tacrolimus below 1.67 (ng/mL)/mg is associated with achieving subtherapeutic drug concentrations and worse function of the transplanted kidney.

- 2) Determination of *CYP3A4* and *CYP3A5* polymorphisms is not justified due to the homogeneity of the Polish population in this terms, and the occurrence of individual variants of the *ABCB1* 3435C>T polymorphism does not affect the pharmacokinetic parameters of mycophenolic acid and tacrolimus.
- 3) In the presence of evidence of hepatic injury, trough concentration monitoring may not reflect mycophenolic acid exposure and AUC calculated from LSS formulas should be used instead.
- 4) The prescribed pharmacotherapy should be monitored in terms of the occurrence of interactions, as routinely used drugs (including OTC) affect the pharmacokinetic parameters of the immunosuppressive treatment, and thus its safety and effectiveness.