

CAT

Critically Appraised Topic

Titel: Therapeutische Drug Monitoring van immunosuppressiva anno 2007

AUTHOR: Lieve Van Hoovels
SUPERVISOR: Koen Desmet, Zahur Zaman
SEARCH/METHODOLOGY VERIFIED BY: Johan Frans
DATE: 13/03/2007
EXPIRY DATE: 13/3/2009

CLINICAL BOTTOM LINE

The main objective of this study was to review the literature relating to immunosuppressant drug measurement and to consider whether the assay methods widely used for patient dosage management of cyclosporine, tacrolimus, sirolimus, everolimus and mycophenolate achieve the set quality criteria.

CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO

Optimale immunosuppressieve therapie is essentieel voor het onderhouden van een leefbare allograft. De behandeling met de traditionele immunosuppressiva cyclosporine, tacrolimus, sirolimus en mycophenolaat mofetil wordt gekenmerkt door een nauwe therapeutische index en een aanzienlijke intra- en interindividuele variabiliteit. Therapeutische drugmonitoring (TDM) is gericht op het individualiseren van de dosis voor elke patiënt om aan deze variabiliteit tegemoet te komen. Immunosuppressiva worden gedurende een lange periode gegeven, meestal gedurende het hele leven van de transplant en/of het leven van de patiënt. Tijdens deze therapie spelen zowel de onmiddellijke neveneffecten van de immunosuppressiva de patiënt parten, zoals bv. hypertensie, lipidenstoornissen, nefrotoxiciteit, maar daarnaast verhoogt de chronische immunosuppressie op zich het risico op secundaire neveneffecten (bv. infectie, maligniteiten). Het vinden van de optimale balans tussen enerzijds adequate immunosuppressie ter preventie van transplantafstoting en anderzijds het vermijden van de extra (acute en chronische) risico's van overimmunosuppressie, is en blijft een hele uitdaging. Vanuit het perspectief van het laboratorium, wordt deze uitdaging vaak zelfs nog bemoeilijkt door de grote diversiteit aan commerciële assays die voor TDM beschikbaar zijn. Deze methoden hebben vaak zeer uiteenlopende performantiekarakteristieken, voornamelijk wat betreft de specificiteit voor het farmacologisch actieve bestanddeel (meestal het moedermolecule).

QUESTION(S)

- 1) Wat zijn de hedendaagse guidelines inzake de immunosuppressieve therapie na vaste orgaantransplantatie en welke klinische protocols worden er in UZLeuven door de transplantartsen gehanteerd?
- 2) Wat zijn de vereisten voor de monitoring per immunosuppressivum en hoe richt men een individuele, immunosuppressieve therapie op basis van de bekomen spiegels? Voldoen de huidige uitgevoerde analyses in het laboratorium van UZLeuven aan deze klinische vereisten?
- 3) Wat is de plaats van het immunosuppressivum everolimus in de klinische praktijk?

SEARCH TERMS

- 1) MeSH Database (PubMed): MeSH term: 'immunosuppression', 'transplantation', 'cyclosporine', 'tacrolimus', 'sirolimus', 'everolimus', 'mycophenolate mofetil', 'lung', 'heart', 'kidney', 'renal transplantation', 'cardiac transplantation', 'basiliximab'.
- 2) PubMed Clinical Queries (from 1966; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>): Systematic Reviews; Clinical Queries using Research Methodology Filters(diagnosis+specific,diagnosis+sensitive,prognosis+ specific)
- 3) Pubmed (Medline; from 1966), SUMSearch (<http://sumsearch.uthscsa.edu/>), National Guideline Clearinghouse (<http://www.ngc.org/>), Institute for Clinical Systems Improvement (<http://www.icsi.org/>), The National Institute for Clinical Excellence (<http://www.nice.org.uk/>), Cochrane (<http://www.update-software.com/cochrane>), Health Technology Assessment Database (<http://www.york.ac.uk/inst/crd/htahp.htm>)
- 4) National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS; <http://www.nccls.org/>), International Federation of Clinical Chemistry (IFCC; <http://www.ifcc.org/ifcc.asp>), Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA; <http://www.cms.hhs.gov/clia/>) The International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) guidelines at: <http://www.isHLT.org/publications/guidelines.asp>; The European Association of Urology guidelines at http://www.uroweb.org/files/uploaded_files/guidelines/renaltransplant.pdf; UK Guidelines for living donor kidney transplantation at <http://www.cambridge-transplant.org.uk/program/renal/lrdgui.pdf>; The U.S. Organ Procurement and Transplantation Network and the Scientific Registry of Transplant Recipients on <http://www.ustransplant.org>; The NIDDK Liver Transplantation Database at <https://www.niddkrepository.org/niddk/jsp/public/dataset.jsp#LTD>; European Medicines Agency (EMA; www.emea.europa.eu); United Network for Organ Sharing (UNOS) 2006 at <http://www.optn.org/data/annualReport.asp>; Immunosuppressive Drugs International Proficiency Testing Scheme at <http://www.bioanalytics.co.uk/>; The American Association of Clinical Chemistry at <http://www.aacc.org/AACC/members/nacb/LMPG/>
- 5) UpToDate Online version 15.1 (2007)
- 6) Diagnostisch kompas (College voor zorgverzekeringen, the Netherlands, online), Clinical Chemistry 4th edition (William J. Marshall; Mosby)

RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES**1) Guidelines and Recommendations (most recent topics on top)**

UZLEUVEN. Protocol Niertransplantatie, april 2006.

UZLEUVEN. Protocol Levertransplantatie, augustus 2006.

KASISKE B., COSIO F.G., BETO J. *ET AL.* Clinical practice guidelines for managing dyslipidemia in kidney transplant patients: a report from the managing dyslipidemias in Chronic Kidney Disease Work Group of the National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative. *Am J Transplant* 2004; **4**: 13-53.

MORRIS R.G., HOLT D.W., GRIESMACHER V.W., NAPOLI K.L., SHAW L.M. Analytical aspects of immunosuppressive drug monitoring on behalf of the IFCC/IATDMCT joint working group. *Ther Drug Monit* 2004; **26**: 227-230.

KÄLBE T., FULDA, BENOIT G., LUCAN M., NICITA G., SELLS R., BURGOS REVILLA F.J., WIESEL M. Guidelines on renal transplantation. European Association of Urology, February 2003. At http://www.uroweb.org/files/uploaded_files/guidelines/renaltransplant.pdf

HOLT D.W., ARMSTRONG V.W., GRIESMACHER A., MORRIS R.G., NAPOLI K.L., SHAW L.M. International federation of clinical chemistry/International association of therapeutic drug monitoring and clinical toxicology working group on immunosuppressive drug monitoring. *Ther Drug Monit* 2002; **24**: 59-67.

LEVY G., THERVET E., LAKE J., UCHIDA K. Patient management by Neoral C(2) monitoring: an international consensus statement. Consensus on Neoral C(2): Expert Review in Transplantation (CONCERT) group. *Transplantation* 2002; **73**: S12-S18.

MORRIS R.G., TETT S.E., RAY J.E., FULLINFAW R.O., COOKE R., *ET AL.* Cyclosporin monitoring in Australasia: 2002 update of consensus guidelines. *Ther Drug Monit* 2002; **24**: 677-688.

LEUVEN LUNG TRANSPLANT TEAM. Protokol Hart-longtransplantatie, oktober 2001.

UZLEUVEN. Protocol Harttransplantatie, juli 2001.

WARNER A., ANNESLEY T. Standards of laboratory practice: guidelines for therapeutic drug monitoring services. *The National Academy of Clinical Biochemistry*, 1999.

OELLERICH M., ARMSTRONG V.W., SCHUTZ E., SHAW L.M. Therapeutic drug monitoring of cyclosporine and tacrolimus. Update on Lake Louise consensus conference on cyclosporin and tacrolimus. *Clin Biochem* 1998; **31**: 309-316.

KRAMER M.R., MCCARTHY P.M., MARSHALL S.E., ET AL. Rejection and infection in the transplanted lung. In: Smith J.A., McCarthy P.M., Sarris G.E., et al. (Eds.). *The Stanford Manual of Cardiopulmonary Transplantation*, Futura Publishing, Armonk, NY, 1996.

JUSKO W.J., THOMSON A.W., FUNG J.J., MCMASTER P., WONG S.H., ZYLBERKATZ E. ET AL. Consensus document: therapeutic monitoring of tacrolimus (FK506). *Ther Drug Monit* 1995; **17**: 606-614.

OELLERICH M., ARMSTRONG V.W., KAHAN B., SHAW L., HOLT D.W., YATSCOFF R., ET AL. Lake Louise Consensus Conference on cyclosporin monitoring in organ transplantation: report of the consensus panel. *Ther Drug Monit* 1995; **17**: 642-654.

MORRIS R.G., TETT S.E., RAY J.E. Cyclosporin A monitoring in Australia: consensus recommendations. *Ther Drug Monit* 1994; **16**: 570-576.

KAHAN B.D., SHAW L.M., HOLT D., GREVEL J., JOHNSTON A. Consensus document: Hawk's Cay meeting on therapeutic drug monitoring of cyclosporine. *Clin Chem* 1990; **36**: 1510-1516.

CYCLOSPORINE TASK FORCE. Critical issues in cyclosporine monitoring: report of the task force on cyclosporine monitoring. *Clinical Chemistry* 1987; **33**: 1269-1288.

2) Systematic Reviews and Meta-analyses

HADDAD E.M., MCALISTER V.C., RENOUF E., MALTHANER E., KJAER M.S., GLUUD L.L. Cyclosporin versus tacrolimus for liver transplanted patients. *Cochrane Database Syst Rev* 2006; **4**: CD005161.

WEBSTER A.C., LEE V.W.S., CHAPMAN J.R., CRAIG J.C. Target of rapamycin inhibitors (sirolimus and everolimus) for primary immunosuppression of kidney transplant recipients: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Transplantation* 2006; **81**: 1234-1248.

KAUFFMAN H.M., CHERICKH W.S., CHENG Y., HANTO D.W., KAHAN B.D. Maintenance immunosuppression with target-of-rapamycin inhibitors is associated with a reduced incidence of de novo malignancies. *Transplantation* 2005; **80**: 883-889.

WEBSTER A.C., WOODROFFE R.C., TAYLOR R.S., CHAPMAN J.R., CRAIG J.C. Tacrolimus versus cyclosporin as primary immunosuppression for kidney transplant recipients: meta-analysis and meta-regression of randomised trial data. *BMJ* 2005; **331**: 810. Epub 2005 Sep 12.

HEISEL O., HEISEL R., BALSHAW R., KEOWN P. New onset diabetes mellitus in patients receiving calcineurin inhibitors: a systematic review and meta-analysis. *Am J Transplant* 2004; **4**: 583-595.

3) Reviews

ARNS W., CIBRIK D.M., WALKER R.G., MOURAD G., BUDDER 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.

EISEN H. Long-term cardiovascular risk in transplantation-insights from the use of everolimus in heart transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2006; **21**: iii9-iii13.

KOBASHIGAWA J.A., PATEL J.K. Immunosuppression for heart transplantation: where are we now? *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine* 2006; **3**: 203-212.

MEIER-KRIESCHE H.U., LI S., GRUENNER R.W., FUNG J.J., BUSTAMI R.T., BARR M.L., LEICHTMAN A.B. Immunosuppression: evolution in practice and trends, 1994-2004. *Am J Transplant* 2006; **6**: 1111-1131.

PASCUAL J., BOLETIS I.N., CAMPISTOL J.M. Everolimus (Certican®) in renal transplantation: a review of clinical trial data, current usage and future directions. *Transplant Rev* 2006; **20**: 1-18.

PASCUAL J. Everolimus in clinical practice-renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2006; **21**: iii8-iii23

TAYLOR D.O., EDWARDS L.B., BOUCEK M.M., TRULOCK E.P., WALTZ D.A., KECK B.M., HERTZ M.I. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-third official adult heart transplantation report-2006. *J Heart Lung Transplant* 2006; **25**: 869-879.

- TRULOCK E.P., EDWARDS L.B., TAYLOR D.O., BOUCEK M.M. KECK B.M. HERTZ M.I. Registry of the international society for heart and lung transplantation: twenty-third official adult lung and heart-lung transplantation report 2006. *J Heart Lung Transplant* 2006; **25**: 880-892.
- CIANCIO G., MILLER J., GONWA T.A. Review of Major Clinical Trials with Mycophenolate Mofetil in Renal Transplantation. *Transplantation* 2005; **80**: S191-S200.
- DUCAN M.D., WILKES D.S. Transplant-related immunosuppression. A review of immunosuppression and pulmonary infections. *Proc Am Thorac Soc* 2005; **2**: 449-455.
- FUNG J., KELLY D., KADRY Z., PATEL-TOM K., EGHTEHAD B. Immunosuppression in liver transplantation: beyond calcineurin inhibitors. *Liver Transplantation* 2005; **11**: 267-280.
- KUYPERS D.R.J. Immunosuppressive drug monitoring-what to use in clinical practice today to improve renal graft outcome. *Tranplant International* 2005; **18**: 140-150.
- MABASA V.H., ENSOM M.H.H. The role of therapeutic monitoring of everolimus in solid organ transplantation. *Ther Drug Monit* 2005; **27**: 666-676.
- MANZIA T.M., DE LIGUORI CARINO N., ORLANDO G., TOTI L., DE LUCA L., D'ANDRIA D., CARDILLO A., ANSELMO A., CASCIANI C.U., TISONI G. Use of mycophenolate mofetil in liver transplantation: a literature review. *Tranplant Proc* 2005; **37**: 2616-2617.
- MORRIS R.G. Immunosuppressant drug monitoring: is the laboratory meeting clinical expectations? *The Annals of Pharmacotherapy* 2005; **39**: 119-127.
- NEUMAYER H.H. Introducing Everolimus (Certican) in organ transplantation: an overview of preclinical and early clinical developments. *Transplantation* 2005; **79**: S72-S75.
- HALLORAN P.F. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* 2004; **351**: 2715-2729.
- HARDINGER K.L., KOCH M.J., BRENNAN D.C. Current and future immunosuppressive strategies in renal transplantation. *Pharmacotherapy* 2004 ; **24**: 1159-1176.
- KAHAN B.D. Therapeutic drug monitoring of cyclosporine: 20 years of progress. *Transplantation Proceedings* 2004; **36**: 378S-391S.
- KIRCHNER G.I., MEIER-WIEDENBACH I., MANNS M.P. Clinical pharmacokinetics of everolimus. *Clin Pharmacokinet* 2004; **43**: 83-95.
- LINDENFELD J. ET AL. Drug therapy in the heart transplant recipient. Part I: cardiac rejection and immunosuppressive drugs. *Circulation* 2004; **110**: 3734-3740.
- LINDENFELD J. ET AL. Drug therapy in the heart transplant recipient. Part II: immunosuppressive drugs. *Circulation* 2004; **110**: 3858-3865.
- WALLEMACQ P.E. Therapeutic monitoring of immunosuppressant drugs. Where are we? *Clin Chem Lab Med* 2004; **42**: 1204-1211.
- KAHAN B.D. Individuality: the barrier to optimal immunosuppression. *Nat Rev Immunol* 2003; **3**: 831-838.
- TROTTER J.F. Sirolimus in liver transplantation. *Transplant Proc* 2003; **35**: 193S-200S.
- ARMSTRONG V.W. Principles and practice of monitoring immunosuppressive drugs. *Journal of Laboratory Medicine* 2002; **26**: 27-36.
- KAHAN B.D., KEOWN P., LEVY G.A., JOHNSTON A. Therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs in clinical practice. *Clinical Therapeutics* 2002; **24**: 330-350.
- ARMSTRONG V.W., OELLERICH M. New developments in the immunosuppressive drug monitoring of cyclosporine, tacrolimus and azathioprine. *Clin Biochem* 2001; **34**: 9-16.
- DAVID O.J., JOHNSTON A. Limited sampling strategies for estimating cyclosporin area under the concentration-time curve: review of current algorithms. *Ther Drug Monit* 2001; **23**: 100-114.
- MACDONALD A., SCAROLA J., BURKE J.T., ZIMMERMAN J.J. Clinical pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring of sirolimus. *Clinical Therapeutics* 2000; **22**: B101-121.
- SHAW LM, KAPLAN B, BRAYMAN KL. Sirolimus: introduction and overview. *Clinical Therapeutics* 2000; **22**: B1-B13.
- BULLINGHAM R.E.S., NICHOLLS A.J., KAMM B.R. Clinical pharmacokinetics of mycophenolate mofetil. *Clinical Pharmacokinetics* 1998; **34**: 429-455.

SHAW L.M., ANNESLEY T.M., KAPLAN B., BRAYMAN K.L. Analytical requirements for immunosuppressive drugs in clinical trials. *Ther Drug Monit* 1995; **17**: 577-583.

4) *Original Articles*

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**: 507-508.

EVERSON G.T. Everolimus and mTOR inhibitors in liver transplantation: opening the 'Box'. *Liver Transplantation* 2006; **12**: 1571-1573.

HAMOUR I.M., MITTAL T.K., BELL A.D., BANNER N.R. Reversible sirolimus-associated pneumonitis after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2006; **25**: 867-868.

HIATT W.R., NISSEN S.E. New drug application 21-628, Certican (everolimus), for the proposed indication of prophylaxis of rejection in heart transplantation: report from the cardiovascular and renal drugs advisory committee, US Food and Drug Administration, November 16, 2005, Rockville MD. *Circulation* 2006; **113**: 394-39.

LEVY G., SCHMIDLI H., PUNCH J., TUTTLE-NEWHALL E., MAYER D., NEUHAUS P., SAMUEL D., NASHAN B., KLEMPNAUER J., LANGNAS A., CALMUS Y., ROGIERS X., ABECASSIS M., FREEMAN R., SLOOF M., ROBERTS J., FISCHER L. Safety, tolerability, and efficacy of everolimus in de novo liver transplant recipients: 12- and 36-month results. *Liver Transplantation* 2006; **12**: 1640-1648.

MCNEIL K., GLANVILLE A.R., WAHLERS T., KNOOP C., SPEICH R., MAMELOK R., MAURER J. IVES J., CORRIS P. Comparison of Mycophenolate Mofetil and Azathioprine for Prevention of Bronchiolitis Obliterans Syndrome in De Nove Lung Transplant Recipients. *Transplantation* 2006; **81**: 998-1003.

MEHRABI A., FONOUNI H., WENTE M., SADEGHI M., EISENBACH C., ENCKE J., SCHMIED B.M., LIBICHER M., ZEIER M., WEITZ J., BUCHLER M.W., SCHMIDT J. Wound complications following kidney and liver transplantation. *Clin Transplant* 2006; **20**: 97-110.

MORRIS R.G., SALM P., TAYLOR P.J., WICKS F.A., THEODOSSI A. Comparison of the reintroduced MEIA assay with HPLC-MS/MS for the determination of whole-blood sirolimus from transplant recipients. *Ther Drug Monit* 2006; **28**: 164-168.

PETRAKOPOULOU P., ANTHOPOULOU L., MUSCHOLL M., KLAUSS V., VON SCHEIDT W., UBERFUHR P., MEISER B.M., REICHART B., WEIS M. Coronary endothelial vasomotor function and vascular remodeling in heart transplant recipients randomized for tacrolimus or cyclosporine immunosuppression. *J Am Coll Cardiol* 2006; **47**: 1622-1629.

SALM P., WARNHOLTZ C., BOYD J., ARABSHAHI L., MARBACH P., TAYLOR P.J. Evaluation of a fluorescent polarization immunoassay for whole blood everolimus determination using samples from renal transplant recipients. *Clinical Biochemistry* 2006; **39**: 732-738.

SNELL G.I., VALENTINE V.G., VITULO P., GLANVILLE A.R., MCGIFFIN D.C., LOYD J.E., ROMAN A., ARIS R., SOLE A., HMISSI A., PIRRON U., RADB159 STUDY GROUP. Everolimus versus azathioprine in maintenance lung transplant recipients: an international, randomized, double-blind clinical trial. *Am J Transplant* 2006; **6**: 169-177.

CATTANEO D., ZENONI S., MURGIA S., MERLINI S., BALDELLI S., PERICO N., GOTTI E., COSIMO O., CRIPPA A., REMUZZI G. Comparison of different cyclosporine immunoassays to monitor C0 and C2 blood levels from kidney transplant recipients: not simply overestimation. *Clinica Chimica Acta* 2005; **355**: 153-164.

EISEN H.J., KOBASHIGAWA J., KEOGH A., BOURGE R., RENLUND D., MENTZER R., ALDERMAN E., VALANTIN H., DUREAU G., MANCINI D., MAMELOK R., GORDON R., WANG W., MEHRA M., CONSTANZO M.R., HUMMEL M., JOHNSON J. Three-year results of a randomized, double-blind, controlled trial of mycophenolate mofetil versus azathioprine in cardiac transplant recipients. *Heart Lung Transplant* 2005; **24**: 517-525.

EISEN H., STARLING R.C., KOBASHIGAWA J. Incidence of MACE and economic burden in de novo heart transplant patients: a 4-year comparison of everolimus and azathioprine. *Transplant Int* 2005; **18**: PO-111.

LORBER M., PONTICELLI C. WHELCHER J., MAYER H.W., KOVARICK J., LI Y., SCHMIDLI H. Exposure-response relationships for everolimus in kidney transplant recipients based on the exposure efficacy and safety modelling of 12-month data. *Clinical Transplant* 2005; **19**: 145-152.

MEIER-KRIESCHE H.U., SCHOLD J.D., SRINIVAS T.R., HOWARD R.J., FUJITA S., KAPLAN B. Sirolimus in combination with tacrolimus is associated with worse renal allograft survival compared to mycophenolate mofetil combined with tacrolimus. *Am J Transplant* 2005; **5**: 2273-2280.

- WESTLEY I.S., MORRIS R.G., TAYLOR P.J., SALM P., JAMES M.J. CEDIA® sirolimus assay compared with HPLC-MS/MS and HPLC-UV in transplant recipient specimens. *Ther Drug Monit* 2005; **27**: 309-314.
- WIESNER R.H., SHORR J.S., STEFFEN B.J., CHU A.H., GORDON R.D., LAKE J.R. Mycophenolate mofetil combination therapy improves long-term outcomes after liver transplantation in patients with and without hepatitis C. *Liver Transpl* 2005; **11**: 750-759.
- WOODWARD R.S., KUTINOVA A., SCHNITZLER M.A., BRENNAN D.C. Renal graft survival and calcineurin inhibitor. *Transplantation* 2005; **80**: 629-33.
- HOLMES M., CHILCOTT J., WALTERS S. *ET AL.* Economic evaluation of everolimus versus mycophenolate mofetil in combination with cyclosporine and prednisolone in de novo renal transplant recipients. *Transpl Int* 2004; **17**: 182-187.
- KEOGH A., RICHARDSON M., RUYGROK P., SPRATT P., GALBRAITH A., O'DRISCOLL G., MACDONALD P., ESMORE D., MULLER D., FADDY S. Sirolimus in de novo heart transplant recipients reduces acute rejection and prevents coronary artery disease at 2 years. *Circulation* 2004; **110**: 2694-2700.
- MEIER-KRIESCHE H.U., STEFFEN B.J., CHU A.H., LOVELAND J.J., GORDON R.D., MORRIS J.A., KAPLAN B. Sirolimus with neoral versus mycophenolate mofetil with neoral is associated with decreased renal allograft survival. *Am J Transplant* 2004; **4**: 2058-2066.
- NASHAN B., CURTIS J., PONTICELLI C., MOURAD G., JAFFE J. HAAS T.; 156 STUDY GROUP. Everolimus and reduced-exposure cyclosporine in de novo renal transplant recipients: a three year phase II, randomized, multicenter, open label study. *Transplantation* 2004; **78**: 1332-1340.
- REMUZZI G., LESTI M., GOTTI E., GANEVA M., DIMITROV B.D., ENE-IORDACHE B., GHERARDI G., DONATI D., SALVADORI M., SANDRINI S., VALENTE U., SEGOLONI G., MOURAD G., FEDERICO S., RIGOTTI P., SPARACINO V., BOSMANS J.L., PERICO N., RUGGENENTI P. Mycophenolate mofetil versus azathioprine for prevention of acute rejection in renal transplantation (MYSS): a randomised trial. *Lancet* 2004; **364**: 503-512.
- STARLING R.C., HARE J.M., HAUPTMAN P. *ET AL.* Therapeutic drug monitoring for everolimus in heart transplant recipients based on exposure-effect modeling. *Am J Transplant* 2004; **4**: 2126-2131.
- STREIT F., SHIPKOVA M., ARMSTRONG V.W., OELLERICH M. Validation of a rapid and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for free and total mycophenolic acid. *Clin Chem* 2004; **50**: 152-159.
- VITKO S. MARGREITER R., WEIMAR W. *ET AL.* Everolimus 12 month safety and efficacy versus mycophenolate mofetil in de novo renal transplant recipients. *Transplantation* 2004; **78**: 11532-11540.
- VLAHAKIS N.E., RICKMAN O.B., MORGENTHALER T. Sirolimus-associated diffuse alveolar hemorrhage. *Mayo Clin Proc.* 2004; **79**: 541-545.
- EISEN H.J., TUZCU E.M., DORENT R., KOBASHIGAWA J., MANCINI D., VALANTINE-VON KAEPLER H.A., STARLING R.C., SORENSEN K., HUMMEL M., LIND J.M., ABEYWICKRAMA K.H., BERNHARDT P. Everolimus for the prevention of allograft rejection and vasculopathy in cardiac-transplant recipients. *N Engl J Med* 2003; **349**: 847-858.
- FUNG J.J., MARCOS A. Rapamycin. Friend, foe or misunderstood? *Liver Transpl* 2003; **9**: 469-472.
- KING-BIGGS M.B., DUNITZ J.M., PARK S.J., SAVIK S.K. HERTZ M.I. Airway anastomotic dehiscence associated with use of sirolimus immediately after lung transplantation. *Transplantation* 2003; **75**: 1437-1443.
- KOVARIK J.M., EISEN H., DORENT R. *ET AL.* Everolimus in de novo cardiac transplantation: pharmacokinetics, therapeutic range, and influence on cyclosporine exposure. *J Heart Lung Transplant.* 2003; **22**: 1117-1125.
- THERVET E., PHEFFER P., SCOLARI M.P., *ET AL.* Clinical outcomes during the first three months posttransplant in renal allograft recipients managed by C2 monitoring of cyclosporine microemulsion. *Transplantation* 2003; **76**: 903-908.
- BRAUN F., PETERS B., SCHÜTZ E., LORF T., UNDRE N., OELLERICH M., RINGE B. Therapeutic drug monitoring of tacrolimus early after liver transplantation. *Transplantation Proceedings* 2002; **34**: 1538-1539.
- FLECHNER S.M., GOLDFARB D., MODLIN C., *ET AL.* Kidney transplantation without calcineurin-inhibitor drugs: a prospective, randomised trial of sirolimus versus cyclosporine. *Transplantation* 2002; **74**: 1070-1076.
- INTERNATIONAL NEORAL RENAL TRANSPLANTATION STUDY GROUP. Cyclosporine microemulsion (Neoral) absorption profiling and sparse-sample predictors during the first 3 months after renal transplantation. *American Journal of Transplantation* 2002; **2**: 148-156.
- KOVARIK J.M., KAPLAN B., TEDESCO S.H., *ET AL.* Exposure-response relationships for everolimus in de novo kidney transplantation: defining a therapeutic range. *Transplantation* 2002; **73**: 920-925.

- LEVY G.A., BURRA P., CAVALLARI A., ET AL. Improved clinical outcomes for liver transplant recipients using cyclosporine monitoring based on two-hour post dose levels (C2). *Transplantation* 2002; **73**: 953-959.
- PISITKUN T., EIAM-ONG S., CHUSIL S., PRADITPORNILPA K., PANSIN P., TUNGSANGA K. The roles of C4 and AUC₀₋₄ in monitoring of tacrolimus in stable kidney transplant patients. *Transplant Proc* 2002; **34**: 3173-3175.
- SALM P., TAYLOR P.J., LYNCH S.V., PILLANS P.I. Quantification and stability of everolimus (SDZ RAD) in human blood by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 2002; **772**: 183-290.
- UCHIDA K., TOMINAGA Y., HABA T., ET AL. Usefulness of monitoring of AUC₀₋₄ during the induction period of immunosuppressive therapy with tacrolimus after renal transplantation. *Transplant Proc* 2002; **34**: 1736-1737.
- UNDRE N.A., STEVENSON P.J. AND THE EUROPEAN TACROLIMUS HEART STUDY GROUP. Pharmacokinetics of tacrolimus in heart transplantation. *Transplantation Proceedings* 2002; **34**: 1836-1838.
- WEBER L.T., SHIPKOVA M., ARMSTRONG V.W., WAGNER N., SCHÜTZ E., MEHLS O., ZIMMERHACKL L.B., OELLERICH M., TÖNSHOFF B. Comparison of the Emit Immunoassay with HPLC for therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid in pediatric renal-transplant recipients on mycophenolate mofetil therapy. *Clinical Chemistry* 2002; **48**: 517-525.
- WIESNER R., KLINTMALM G., MCDIARMID S., THE RAPAMUNE LIVER TRANSPLANT STUDY GROUP. Sirolimus immunotherapy results in reduced rates of acute rejection in de novo orthotopic liver transplant recipients. *Am J Transplant* 2002; **2**: 464.
- CANADIAN NEORAL RENAL TRANSPLANTATION STUDY GROUP. Absorption profiling of cyclosporine microemulsion (Neoral) during the first 2 weeks after renal transplantation. *Transplantation* 2001; **72**: 1024-1032.
- HOSENPUD J.D., BENNETT L.E. Mycophenolate mofetil versus azathioprine in patients surviving the initial cardiac transplant hospitalization: an analysis of the Joint UNOS/ISHLT Thoracic Registry. *Transplantation* 2001; **72**: 1662-1665.
- KOVARIK J.M., KAHAN B.D., KAPLAN B. ET AL. Longitudinal assessment of everolimus in de novo renal transplant recipients over the first post-transplant year: pharmacokinetics, exposure-response relationships, and influence on cyclosporin. *Clin Pharmacol Ther* 2001; **69**: 48-56.
- MAGALI M., CHARPIAT B., JELLIFFE R., DUCERF C., FOURCADE N., BAULIEUX J. Failure of traditional trough levels to predict tacrolimus concentrations. *Therapeutic Drug Monitoring* 2001; **2**: 129-133.
- PALMER S.M., BAZ M.A., SANDERS L., MIRALLES A.P., LAWRENCE C.M., REA J.B., ZANDER D.S., EDWARDS L.J., STAPLES E.D., TAPSON V.F., DAVIS R.D. Results of a randomized, prospective, multicenter trial of mycophenolate mofetil versus azathioprine in the prevention of acute lung allograft rejection. *Transplantation* 2001; **71**: 1772-1776.
- TAYLOR D.O., BARR M.L., MEISER B.M., PHAM S.M., MENTZER R.M., GASS A.L. Suggested guidelines for the use of tacrolimus in cardiac transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2001; **20**: 734-738.
- GRANT D., KNETEMAN N., TCHERVENKOV J., ET AL. Peak CsA levels (C_{max}) correlate with freedom from liver graft rejection: results of a prospective, randomised comparison of Neoral and Sandimmune for liver transplantation (NOF-8). *Transplantation* 1999; **67**: 1133-1137.
- MAHALAI K., BELITSKY P., SKETRIS I., WEST K., PANEK R. Neoral monitoring by simplified sparse sampling area under the concentration-time curve. *Transplantation* 1999; **68**: 55.
- SHIPKOVA M., SCHUTZ E., ARMSTRONG V.W., NIEDMANN P.D., WIELAND E., OELLERICH M. Overestimation of mycophenolic acid by EMIT correlates with MPA metabolite. *Transplant Proc* 1999; **31**: 1135-1137.
- TAYLOR D.O., BARR M.L., RADOVANCEVIC B., RENLUND D.G., MENTZER R.M., SMART F.W., TOLMAN D.E., FRAZIER O.H., YOUNG J.B. VANVELDHUISEN P. A randomized, multicenter comparison of tacrolimus and cyclosporine immunosuppressive regimes in cardiac transplantation: decreased hyperlipidemia and hypertension with tacrolimus. *J Heart Lung Transplant* 1999; **18**: 336-345.
- ZUCKERMANN A., KLEPETKO W., BIRSAN T., TAGHAVI S., ARTEMIOU O., WISSER W., DEKAN G., WOLNER E. Comparison between mycophenolate mofetil- and azathioprine-based immunosuppressions in clinical lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1999; **18**: 432-440.
- KU Y.M., MIN D.I. An abbreviated area-under-the-curve monitoring for tacrolimus in patients with liver transplants. *Ther Drug Monit* 1998; **20**: 219-223.

- MENTZER R.M., JAHANIA M.S., LASLEY R.D., ET AL. Tacrolimus as a rescue immunosuppressant after heart and lung transplantation. *Transplantation* 1998; **65**: 109-113.
- REICHART B.R., MEISER B., VIGANO M., RINALDI M., MARTINELLI L., YACOB M., BANNER N.R., GANDJBAKHCH I., DORENT R., HETZER R., HUMMEL M. European multicenter tacrolimus (FK506) heart pilot study: one-year results-European tacrolimus multicenter heart study group. *J Heart Lung Transplant* 1998; **17**: 775-781.
- ROSS D.J., WATERS P.F., LEVINE M., KRAMER M., RUZEVICH S., KASS R.M. Mycophenolate mofetil versus azathioprine immunosuppressive regimens after lung transplantation: Preliminary experience. *J Heart Lung Transplant* 1998; **17**: 768-774.
- TREPANIER D.J., GALLANT H., LEGATT D.F., YATSCOFF R.W. Rapamycin: distribution, pharmacokinetics and therapeutic range investigations: an update. *Clinical Biochemistry* 1998; **31**: 345-351.
- STREIT F, CHRISTIANS U, SCHIEBEL HM, NAPOLI KL, ERNST L, LINCK A, KAHAN BD, SEWING KF. Sensitive and specific quantification of sirolimus (rapamycin) and its metabolites in blood of kidney graft recipients by HPLC/electrospray-mass spectrometry. *Clinical Chemistry* 1996; **42**: 1417-1425.
- THE TRICONTINENTAL MYCOPHENOLATE MOFETIL RENAL TRANSPLANTATION STUDY GROUP. A blinded, randomized clinical trial of mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in cadaveric renal transplantation 1996. *Transplantation* 1996; **61**: 1029-1037.
- BANDO K., PARADIS I.L., KOMATSU K., KONISHI H., MATSUSHIMA M., KEENA R.J., HARDESTY R.L., ARMITAGE J.M., GRIFFITH B.P. Analysis of time-dependent risks for infection, rejection and death after pulmonary transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995; **109**:49-57.
- KEENAN R.J., KONISHI H., KAWAI A., PARADIS L., NUNLEY R., IACONO T., HARDESTY L., WEYNANT J., GRIFFITH P. Clinical trial of tacrolimus versus cyclosporine in lung transplantation. *Ann Thorac Surg* 1995; **60**: 580-585.
- SOLLINGER H.W. Mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in primary cadaveric allograft recipients. US Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. *Transplantation* 1995; **60**: 225-232.
- THE EUROPEAN MYCOPHENOLATE MOFETIL CO-OPERATIVE STUDY GROUP. Placebo controlled study of mycophenolate mofetil combined with cyclosporine and corticosteroids to the prevention of acute rejection. *Lancet* 1995; **345**: 1321-1325.
- ENSLEY R.D., BRISTOW M.R., OLSEN S.L., TAYLOR D.O., HAMMOND E.H., O'CONNELL J.B., DUNN D., OSBURN L., JONES K.W., KAUFFMAN R.S. ET AL. The use of mycophenolate mofetil (RS-61443) in human heart transplant recipients. *Transplantation* 1993; **56**: 75-82.

5) Reference Works, Handbooks and Databases

MOYER T.P., SHAW L.M. Therapeutic drugs and their management. In: Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics, Fourth edition, 2006. Elsevier Inc. St. Louis.

6) Posters, "grey literature", presentations

- ENGELMAYER J., ENGELMAYER U., STREIT F. ET AL. Comparison of the Seradyn Innofluor Certican assay on TDxFLx system with LC/MS-MS [Abstract]. *Ther Drug Monit* 2005; **27**: 217.
- STROM T., BOYD J., ARABSHAHI L. ET AL. Cross-reactivity of the major everolimus hydroxy metabolites with the Innofluor Certican immunoassay for clinical TDM of everolimus [Abstract]. *Ther Drug Monit* 2005; **27**: 243.
- VALENTINE V.G., LOVER R.B., SNELL G.I., ET AL. Everolimus (RAD) shows superiority over azathioprine to inhibit the decline of pulmonary function in stable lung transplant recipients: 24-month results of a multicenter, randomized double-blind study. *Am J Transplant* 2004; **4**: abstract 403.
- OPPENHEIMER F., OYEN O., VILJOEN H., ET AL. 36- month results of an international study with everolimus for the prevention of allograft rejection in de novo kidney transplant recipients. Abstract presented at the American Transplant Congress, May 30-June 4, 2003, Washington DC, USA.

APPRAISAL

I. WAT ZIJ DE HEDENDAAGSE GUIDELINES INZAKE DE IMMUNOSUPPRESSIEVE THERAPIE NA VASTE ORGAANTRANSPLANTATIE EN WELKE KLINISCHE PROTOCOLS WORDEN ER IN UZLEUVEN DOOR DE TRANSPLANTARTSEN GEHANTEERD?

1. INDUCTIETHERAPIE

1.1 Guidelines

Het begrip 'inductietherapie' verwijst naar de immunosuppressieve behandeling tijdens de onmiddellijke posttransplantatie periode. Vaak worden er gedurende 5-7 dagen specifieke antilymfocyten agentia toegevoegd aan het traditioneel immunosuppressief regime. Een dergelijke inductietherapie beoogt enerzijds een verminderd risico op transplantafstoting in de vroege postoperatieve periode en anderzijds kunnen zo de nefrotoxische calcineurine inhibitoren (CI) later en aan lage dosis worden opgestart. Nadelen van de implementatie van een inductietherapie met antilymfocyten agentia zijn de verhoogde kans op transplantafstoting na het stoppen van de inductietherapie, een verhoogd risico op infectie, maligniteit of beide, en een verhoogde kost (Lindenfeld *et al.*, 2004).

De groep van antilymfocyten agentia bestaat uit de polyclonale (antithymocyte globuline of ATG) of monoclonale antilymfocyt antilichamen (OKT3) en de gehumaniseerde, monoclonale interleukine-2 receptor (IL-2R) antagonisten (daclizumab, basiliximab). Deze vereisen over het algemeen geen TDM aangezien het relatief veilige geneesmiddelen zijn, zonder groot risico op allergische reacties. Om deze reden wordt er in dit werk niet dieper ingegaan op de toepassing van deze geneesmiddelen na vaste orgaantransplantatie. Hier volgt een samenvatting van de literatuurgegevens inzake het gebruik van antilymfocyten agentia tijdens de inductietherapie na de verschillende vaste orgaantransplantaties:

- Ondanks de voordelen van associatie van antilymfocyten agentia bij de inductietherapie na longtransplantatie, is de klinische praktijk afhankelijk van het transplantatiecentrum (Trulock *et al.*, 2006; Brock *et al.*, 2001).
- Inductietherapie met associatie van antilymfocyten agentia, vnl. IL-2R of ATG lijkt voordelen te bieden na harttransplantatie, voornamelijk bij hoogrisico patiënten, maar efficaciteit en veiligheid moeten bevestigd worden door klinisch gerandomiseerde studies (Taylor *et al.*, 2006; Kobashigawa *et al.*, 2006).
- Agressieve inductietherapie met antilymfocyten antilichamen blijft gereserveerd tot hoogrisico patiënten. Het gebruik van polyclonale antilichamen zoals ATG blijft algemeen aanbevolen tot meer concrete data betreffende de veiligheid en efficaciteit van IL-2R antilichamen beschikbaar zijn (Meier-Kriesche *et al.*, 2006; Kälbe *et al.*, 2003).
- Agressieve inductietherapie met antilymfocyten antilichamen blijft, na levertransplantatie gereserveerd voor patiënten met nierinsufficiëntie. Het gebruik van ATG blijft algemeen aanbevolen tot meer concrete data betreffende de veiligheid en efficaciteit van IL-2R antilichamen beschikbaar zijn (Meier-Kriesche *et al.*, 2006; Fung *et al.*, 2005).

1.2 UZLeuven

- **Longtransplantatie:** Naast het gradueel opstarten van de onderhoudstherapie, worden tijdens de inductietherapie ATG aan de immunosuppressieve behandeling toegevoegd.
- **Harttransplantatie:** De 1^{ste} week posttransplantatie wordt overbrugd m.b.v. een inductiefase met antilymfocyten antilichamen. Het gebruik van een CI wordt hierdoor tot 72 uur posttransplantatie uitgesteld en daarna geleidelijk opgestart. Men gebruikt RATG gedurende 3 dagen in combinatie met steroiden.
- **Niertransplantatie:** De inductiefase met antilymfocyten antilichamen behoort niet tot het standaardregime, maar wordt wel toegepast bij hoog risico patiënten, zoals bij: 2^{de}, 3^{de}, n^{de}

transplantatie na verlies van vorige greffe door acute rejectie; voorgeschiedenis van HUS op CI; Afrikaanse/oosterse patiënten; patiënten jonger dan 35 jaar; levende donatie (protocol). Het gebruik van RATG wordt meer en meer vervangen door basimixilab, dat nu in het protocol voorgeschreven staat, beide in combinatie met methylprednisolone.

- **Levertransplantatie:** Inductiefase met antilymfocyten antistoffen behoort niet tot het standaardregime, maar wordt toegepast bij patiënten met hepatitis C of nierinsufficiëntie.

2. ONDERHOUDSTHERAPIE: CALCINEURINE INHIBITOREN

Het algemene protocol voor de immunosuppressieve onderhoudstherapie omvat het 3-drugregime, d.i. de combinatietherapie van een calcineurine inhibitor (CI), antiproliferatief immunosuppressivum en corticosteroiden.

2.1 Longtransplantatie

Er bestaan relatief weinig studies naar de optimale, lange termijns, immunosuppressieve therapie na longtransplantatie. Een prospectieve studie in 1995, toonde geen verschil aan in mortaliteit of acute transplantafstoting tussen de behandeling met CsA of Tac, maar de Tac-groep ontwikkelde minder bronchiolitis obliterans (BOS), de voornaamste complicatie gassocieerd met chronische rejectie na longtransplantatie (Keenan *et al.*, 1995). Een grotere retrospectieve studie toonde een betere 1 en 2-jaars overleving bij patiënten behandeld met Tac in vergelijking met CsA (Bando *et al.*, 1995).

Volgens de registratiedata van de ISHLT is het percentage voor rejectie behandelde patiënten, 1 jaar posttransplantatie, significant lager voor onderhoudsprotocols met Tac (behalve bij patiënten ouder dan 60 jaar) dan met CsA als CI (Trulock *et al.*, 2006) (**Bijlage I.1**). Tot meer definitieve data beschikbaar zijn, blijft CsA voor de meeste transplantcentra de eerste keuze CI voor de onderhoudstherapie na longtransplantatie (Kramer *et al.*, 1996).

BESLUIT I.1: Tot meer definitieve data beschikbaar zijn, blijft CsA voor de meeste transplantcentra de eerste keuze CI voor de onderhoudstherapie na longtransplantatie.

2.2 Harttransplantatie

Er werden verschillende multicenter studies uitgevoerd in Europa (Reichart *et al.*, 1998) en Verenigde Staten (Taylor *et al.*, 1999) naar het gebruik van Tac en CsA na harttransplantatie. Hoewel deze klinische trials een gelijkaardig effect aantonen van beide CI m.b.t. acute transplantafstoting en mortaliteit, zou Tac-behandeling significant minder hypercholesterolemie en hypertensie veroorzaken in vergelijking met de CsA-groep (Taylor *et al.*, 1999). Daarnaast zijn ook neveneffecten als hirsutisme en tandvleeshyperplasie minder beschreven bij Tac, hetgeen een betere therapietrouw en levenskwaliteit met zich meebrengt (Taylor *et al.*, 2001). De incidentie aan post transplant diabetes mellitus (PTDM) is daarentegen wel significant hoger bij patiënten onder Tac dan onder CsA (Heisel *et al.*, 2004). Een recente gerandomiseerde studie op 343 de novo harttransplant patiënten, vergeleek 3 immunosuppressieve protocols post harttransplantatie (Tac+SRL, Tac+MMF, CsA+MMF). Hieruit bleek dat Tac in combinatie met MMF geassocieerd is met een significante reductie in transplantafstoting en daarenboven de minste neveneffecten vertoont (Kobashigawa *et al.*, 2006). Tac lijkt, in vergelijking met CsA, minder aanleiding te geven tot trombusvorming, waardoor het een gunstige impact heeft op de ontwikkeling van vasculopathie, de belangrijkste oorzaak van chronische rejectie na harttransplantatie (Petrakopoulou *et al.*, 2006).

Eén jaar posttransplantatie worden, volgens de ISHLT 2006, over de verschillende transplantcentra Tac en CsA ongeveer evenveel gebruikt (46% en 48% respectievelijk) (**Bijlage I.2**). Patiënten die bij ontslag onder Tac-protocol staan, voornamelijk in combinatie met MMF, vertonen lagere rejectie percentages (Taylor *et al.*, 2006) (**Bijlage I.2**).

BESLUIT I.2: Tac is minstens evenwaardig aan CsA als CI in de onderhoudstherapie na harttransplantatie. De keuze van CI is afhankelijk van het transplantatiecentrum.

2.3 Niertransplantatie

Een meta-analyse in 2005 omvat 30 studies naar de relatieve efficaciteit van Tac en CsA na niertransplantatie. Een verminderd aantal acute rejections en een lager risico aan allograft verlies na 6 maanden wordt aangetoond met Tac (Webster *et al.*, 2005). Een recente analyse van de data van de United States Renal Data System (USRDS) van 1996-2000 toonde geen netto voordeel van Tac in de uiteindelijke transplantatie outcome, d.i. graft overleving (Woodward *et al.*, 2005).

Registratiedata van OPTN/SRTR in 2005 tonen dat 72% van de patiënten bij ontslag met Tac worden behandeld versus 21% met CsA (**Bijlage I.3**) (Meier-Kriesche *et al.*, 2006).

BESLUIT I.3: De optimale CI is nog onduidelijk voor niertransplantatie. In praktijk is er een algemene voorkeur voor Tac, maar verdere studie is vereist om de significante voordelen van Tac t.o.v. CsA aan te tonen.

2.4 Levertransplantatie

Recent werd een systematische review gepubliceerd in de Cochrane Database of Systematic Reviews naar de vergelijking van CsA versus Tac immunosuppressieve therapie bij primaire levertransplant patiënten (Haddad *et al.*, 2006). 16 gerandomiseerde studies werden geïnccludeerd. De auteurs konden concluderen dat Tac licht superieur was t.o.v. CsA ter verbetering van overleving (patiënt en graft) maar aanzienlijk beter ter voorkoming van acute rejections na levertransplantatie. Er werden geen verschillen vastgesteld wat betreft de neveneffecten (nierfalen, lymfoproliferatieve aandoeningen), met uitzondering voor het risico op PTDM hetgeen verhoogt onder Tac. Na levertransplantatie blijven meer transplantpatiënten onder Tac-therapie dan CsA. Tac lijkt dus voordeliger dan CsA en wordt beschouwd als voorkeurstherapie na levertransplantatie (Haddad *et al.*, 2006).

Volgens registratiedata van OPTN/SRTR staat 97% van de patiënten onder CI-therapie bij ontslag na levertransplantatie in 2003-2004 (**Bijlage I.4**), waarbij Tac verantwoordelijk is voor het voornaamste CI verbruik (89% van de patiënten) in vergelijking met CsA (8% van de patiënten) (Meier-Kreische *et al.*, 2006).

BESLUIT I.4: Tac wordt beschouwd als eerste keuze CI na levertransplantatie.

3. ONDERHOUDSTHERAPIE: ANTIPROLIFERATIEVE AGENTIA

De combinatietherapie van CI met AZA is geassocieerd met significante myelosuppressie, gastrointestinale nevenwerkingen en hepatotoxiciteit. MMF is selectievere antimetaboliët en lijkt minder myelotoxische en hepatotoxische neveneffecten te vertonen dan AZA. Een belangrijk voordeel is dat bij het gebruik van MMF in combinatie met Tac en steroïden, de dosis van Tac verlaagd kan worden hetgeen algemeen de renale functie verbeterd. MMF heeft AZA echter nog niet volledig vervangen in de vaste orgaantransplantatie t.g.v. de opmerkelijk hogere kostprijs.

3.1 Longtransplantatie

Hoewel verschillende observationele studies een verbeterde outcome rapporteren met MMF (Ross *et al.*, 1998; Zuckermann *et al.*, 1999), kunnen gerandomiseerde studies geen significant verschil aantonen tussen het gebruik van AZA en MMF (Palmer *et al.*, 2001; McNeil *et al.*, 2006). Behandeling met MMF lijkt over het algemeen wel beter verdragen te

worden dan deze met AZA (McNeil *et al.*, 2006), maar de behandeling met AZA is merkkelijk goedkoper dan deze met MMF.

Volgens de registratiedata van ISHLT wordt de combinatietherapie Tac+MMF het meest gebruikt (Trulock *et al.*, 2006).

BESLUIT I.5: In afwezigheid van neveneffecten blijft AZA de voorkeur als antimetabool bij de immunosuppressieve behandeling van longtransplantatiënten.

3.2 Harttransplantatie

De eerste humane klinische trials toonden aan dat het gebruik van MMF na harttransplantatie goed verdragen werd en even effectief was als AZA met minder myelosuppressie (Ensley *et al.*, 1993). Bevestiging van deze observaties werd geleverd door de registratiedata van 5.600 harttransplantatiënten, die allen behandeld werden met CsA in associatie met AZA of MMF. De 3-jaarsoverleving was significant hoger in de patiënten behandeld met MMF in vergelijking met AZA (91 versus 86%) (Hosenpud *et al.*, 2001). Een andere gerandomiseerde, dubbel blinde studie vertoonde gelijkaardige resultaten (Eisen *et al.*, 2005).

MMF is tevens geassocieerd met een lagere incidentie aan cardiale allograft vasculopathie dan AZA (Kobashigawa *et al.*, 2006).

Volgens de registratiedata van ISHLT 2006 is MMF het meest dominant gebruikt antiproliferatief immunosuppressivum (Taylor *et al.*, 2006) (**Bijlage I.2**). Ondanks dat MMF beter verdragen wordt en gunstige effecten vertoont in het gebruik post harttransplantatie, heeft het immunosuppressivum AZA nog niet volledig vervangen, en dit voornamelijk o.w.v. de kostprijs.

BESLUIT I.6: Aangezien MMF beter verdragen wordt en voordelige effecten vertoont, heeft het AZA bijna volledig vervangen in het protocol van immunosuppressieve therapie post harttransplantatie.

3.3 Niertransplantatie

Grote, multicenter, gerandomiseerde, prospectieve studies tonen een duidelijke verlaagde incidentie aan biopsie-bewezen acute rejectie bij behandeling met MMF na niertransplantatie (European trial, 1995; US Study, Sollinger, 1995; Tricontinental study, 1996). Hierdoor is AZA bijna volledig vervangen door MMF in de hedendaagse immunosuppressieve therapie na niertransplantatie. De resultaten van de US Study group moeten echter kritisch bekeken worden, aangezien lage dosissen AZA met hoge dosissen MMF vergeleken werden. Registratie data baseren zich daarenboven op informatie verkregen in een tijdperk waar de algemene resultaten inferieure outcomes geven dan deze die heden ten dage worden bekomen. Op basis van meer recente gegevens blijken AZA en MMF gelijkwaardig te zijn, wat betreft de frequentie aan acute transplantafstoting en lange termijns allograftoverleving. Neveneffecten blijken ook vergelijkbaar in beide groepen. Aangezien het geneesmiddel 15 keer duurder is dan AZA, zijn verdere studies vereist om de huidige plaats van MMF in het standaard immunosuppressief regime te verdedigen (Remuzzi *et al.*, 2004).

Uit verschillende gerandomiseerde studies blijkt de combinatietherapie van MMF met Tac het meest succesvol (Ciancio *et al.*, 2005). In de praktijk blijft het gebruik van MMF toenemen, met 81% van de patiënten die ontslagen worden onder MMF-therapie in vergelijking met amper 1,3% onder AZA (**Bijlage I.5**) (Meier-Kriesche *et al.*, 2006).

BESLUIT I.7: MMF heeft de laatste jaren AZA vervangen in het standaardregime na niertransplantatie, hoewel meer recente data een gelijkaardig effect aantonen van beide antiproliferatieve agentia. Verdere studie is vereist om de plaats van MMF in het standaardregime te verdedigen gezien de opmerkelijk hogere kostprijs.

3.4 Levertransplantatie

Een recente studie toonde dat de combinatietherapie van een CI met MPA de lange termijns uitkomsten na levertransplantatie verbetert, in vergelijking met CI monotherapie (Wiesner *et al.*, 2005). MMF is een selectievere antimetabool dan AZA, is minder myelotoxisch, heeft minder hepatotxische neveneffecten en is een meer effectief immunosuppressivum na levertransplantatie (Fung *et al.*, 2005; Manzia *et al.*, 2005).

Door de metabolisatie van MPA in de lever tot MPAG, werden grote variaties vastgesteld in de MPA-farmacokinetiek bij levertransplantpatiënten, gekoppeld aan een aanzienlijke incidentie aan gastrointestinale neveneffecten, waardoor TDM noodzakelijk lijkt bij deze patiënten (Brunet *et al.*, 2006). Het gebruik blijft gelimiteerd bij patiënten met een inherent hoog risico op infecties en bij bestaande leukopenie, trombocytopenie, of hypersplenisme.

Het gebruik van antimetabool therapie bij tijdstip van ontslag vinden we, volgens de OPTN/SRTR registratiedate terug bij 58% van alle levertransplantpatiënten (**Bijlage I.6**) (Meier-Kreische *et al.*, 2006) met een duidelijke voorkeur voor MMF.

BESLUIT I.8: Hoewel niet aangewezen voor alle levertransplantkandidaten, heeft MMF toch een rol als CI-sparend immunosuppressivum, vooral bij patiënten met renale dysfunctie.

4. ONDERHOUDSTHERAPIE: SIROLIMUS

Het algemeen profiel aan klinische neveneffecten van sirolimus (SRL) is verschillend aan dit van de CI. Het belangrijkste is dat het geneesmiddel minder nefrotoxisch is dan de traditionele CI, zodat de combinatie van SRL met CsA of Tac bij patiënten met chronische nierinsufficiëntie CI-geïnduceerde nefrotoxiciteit kan vermijden. Daarenboven geeft het immunosuppressivum geen aanleiding tot glucoseintolerantie of hypertensie. Naast zijn immunosuppressieve eigenschappen veroorzaakt SRL ook een verminderde proliferatie van mesechymale en endotheliale cellen. Dit lijkt na vaste orgaantransplantatie talrijke voordelen op te leveren. Na longtransplantatie lijkt door het gebruik van SRL de evolutie van BOS te vertragen of zelfs te verminderen (Hamour *et al.*, 2006). Door het gebruik van SRL in plaats van een CI in de post harttransplantatie immunosuppressieve therapie vermindert de ontwikkeling van allograft vasculopathie (Hamour *et al.*, 2006; Kobashigawa *et al.*, 2006; Keogh *et al.*, 2004).

De meest voorkomende neveneffecten van het gebruik van SRL zijn dyslipidemie en trombocytopenie, hetgeen noopt tot TDM van het immunosuppressivum. Relatief recent werden meerdere, ernstige neveneffecten van SRL gerapporteerd en dit binnen al de verschillende vaste orgaantransplantatie groepen: reversiebele alveolaire hemorragie (Vlahakis *et al.*, 2004), interstitiële pneumonitis (Hamour *et al.*, 2006), vertraagde wondheling (Kobashigawa *et al.*, 2006; Mehrabi *et al.*, 2006) en verhoogde incidentie aan lymfocoeles (Halloran *et al.*, 2004). De neveneffecten werden voornamelijk gerapporteerd bij hoge dosissen, maar kunnen ook voorkomen bij het gebruik van lagere dosissen (Hamour *et al.*, 2006). Het gebruik van het immunosuppressivum wordt heden ten dage afgeraden na long- en levertransplantaties door enerzijds de associatie met enkele fatale casussen met bronchiale anastomose opening t.g.v. een slechte wondheling (King-Biggs *et al.*, 2003) en anderzijds de duidelijke associatie met het voorkomen van hepatische arterie trombose (HAT), de

belangrijkste complicatie na levertransplantatie (Trotter, 2003; Wiesner *et al.*, 2002; Fung *et al.*, 2003).

Na niertransplantatie toonden 2 grote retrospectieve studies dat de lange termijns overleving inferieur is door immunosuppressieve behandeling met SRL: een eerste analyse van meer dan 23.000 allograft recipiënts toonde een significant hoger allograftverlies na 4 jaar behandeling met SRL in combinatie met CsA in vergelijking met MMF in combinatie met CsA ('hazard ratio' van 1,22) (Meier-Kriesche *et al.*, 2004); een tweede studie betreffende 44.915 niertransplantpatiënten rapporteerde een algemene 'hazard ratio' van allograftverlies van 1,47 voor de combinatie van sirolimus met Tac t.o.v. MMF met Tac (Meier-Kriesche *et al.*, 2005). Sinds 2006 raadt de firma Wyeth monotherapie met SRL onmiddellijk posttransplantatie af (cfr. bijsluiter Rapamune®). Dit besluit is gebaseerd op een interne, klinische studie bij nieuwe niertransplantpatiënten waarbij een hoger percentage acute rejectie werd gevonden bij deze patiënten, die na inductietherapie met basiliximab, behandeld werden met SRL, MMF en steroïden in vergelijking met CsA, MMF en steroïden (17,5% vs 2,5%). Het gebruik van SRL is in de meeste niertransplantatiecentra uitermate beperkt tot specifieke patiëntgroepen (bij CI-toxiciteit ondanks lage dosissen, maligniteiten, na behandeling voor PTLD).

BESLUIT I.9: SRL wordt heden ten dage afgeraden na long- en levertransplantatie. Niettegenstaande de potentiële voordelen van het gebruik van SRL ter preventie van cardiale allograft rejectie, verhinderen de frequente neveneffecten van SRL het algemeen gebruik in de post harttransplantatie immunosuppressieve therapie. Bij niertransplantatie is het gebruik van SRL uitermate beperkt tot specifieke patiëntengroepen.

5. ONDERHOUDSTHERAPIE UZLEUVEN

Een overzicht van de TDM-aanvragen per vaste orgaantransplantatie vindt u in **Bijlage I.7**.

5.1 Longtransplantatie (< Prof. Verleden)

De immunosuppressieve therapie post longtransplantatie is beschreven in het Protocol Hart-longtransplantatie (oktober 2001) opgesteld door het Leuven Lung Transplant Team.

De onderhoudstherapie wordt meestal reeds preoperatief opgestart. Over het algemeen bestaat deze uit het 3-drugregime. Wat CI betreft is er een voorkeur voor CsA aangezien Tac niet terugbetaald wordt voor longtransplantpatiënten. Na 3 tot 5 dagen posttransplantatie schakelt men over naar CsA p.o. (Neoral®). Dit met uitzondering voor de mucopatiënten: aangezien deze patiënten zeer moeilijk te regelen zijn met CsA p.o. wordt er overgeschakeld naar Tac. Andere redenen voor de overschakeling van CsA naar Tac zijn gastrointestinale stoornissen en 1 acute rejectie onder CsA. Uiteindelijk staat 75% van de patiënten bij ontslag onder Tac. Als anti-metabool vormt AZA de eerste keuze: voor MMF is er immers geen terugbetaling voorzien voor longtransplantpatiënten (tevens attest vereist) en het geneesmiddel opmerkelijk duurder is dan AZA. Bij herhaaldelijke acute en chronische rejectie wordt overgeschakeld naar MMF. Bij ontslag krijgt niemand MMF; na ongeveer 2 jaar posttransplantatie 25% van de patiënten.

5.2 Harttransplantatie

De immunosuppressieve therapie na harttransplantatie is beschreven in het 'Protocol Harttransplantatie' (juli 2001). Sinds december 1999 is men in UZLeuven overgegaan van de 3-drug onderhoudstherapie CsA+AZA+corticosteroïden naar Tac+MMF+corticosteroïden. De vroeger getransplanteerde patiënten werden niet systematisch naar het nieuwe schema geconverteerd zodat de meesten van hen nog CsA en AZA krijgen. Nieuwe patiënten krijgen

in principe het nieuwe schema, hoewel hiervan in individuele gevallen kan worden afgeweken.

5.3 Niertransplantatie

De onderhoudstherapie post niertransplantatie is beschreven in het 'Protocol Niertransplantatie' van UZLeuven (april 2006). Deze bestaat uit het 3-drug regime met als CI bij voorkeur Tac, antimetaboliet MMF samen met corticosteroïden. Ongeveer 75% van de *de novo* transplanten gebruiken Tac als CI, ongeveer 17% CsA en 5% SRL. Dit laatste wordt voornamelijk in studieverband gebruikt en bij patiënten in conversiefase.

5.4 Levertransplantatie

De onderhoudstherapie na levertransplantatie staat beschreven in het 'Protocol levertransplantatie' (augustus 2006). De onderhoudstherapie bestaat ook bij levertransplantatie uit het 3-drugregime. Vooreerst hebben we de corticosteroïdentherapie met methylprednisolone die gestart wordt aan 16 mg/dag en geleidelijk verder wordt afgebouwd tot uiteindelijk stop na 3 maanden posttransplant (uitz. auto-immuun hepatitis). Als CI wordt de voorkeur gegeven aan Tac, hoewel CsA ook nog in eerder zeldzame gevallen wordt gebruikt. Als antiproliferatief immunosuppressivum wordt algemeen de voorkeur gegeven aan MMF. AZA heeft nog een plaats bij levertransplantpatiënten, en voornamelijk bij deze waarbij MMF veel gastrointestinale neveneffecten veroorzaakt en er geen mogelijkheid bestaat voor de overgang naar monotherapie met CI t.g.v. nierinsufficiëntie.

II. WAT ZIJN DE VEREISTEN VOOR DE MONITORING PER IMMUNOSUPPRESSIVUM EN HOE RICHT MEN EEN INDIVIDUELE, IMMUNOSUPPRESSIEVE THERAPIE OP BASIS VAN DE BEKOMEN SPIEGELS? VOLDOEN DE HUIDIG UITGEVOERDE ANALYSES IN HET LABORATORIUM VAN UZLEUVEN AAN DEZE KLINISCHE VEREISTEN?

1. Analytische performantiekarakteristieken

1.1 Staalsoort en stabiliteit

CsA, Tac en SRL worden sterk gesekwestreerd door bloedcellen. Hierdoor bedraagt de volbloed/plasma verhouding 2 voor CsA en 11-29 voor Tac en 36 voor SRL. Deze verhouding wordt beïnvloed door de hematocriet, geneesmiddelconcentratie en temperatuur. Daarom wordt volbloed, bij voorkeur afgenomen op EDTA als anticoagulans, algemeen aanbevolen als matrix voor de dosage van CsA (Cyclosporine Task Force, 1987), Tac (Warner *et al.*, 1999) en SRL (MacDonald *et al.*, 2000). Heparine moet vermeden worden indien het staal wordt ingevroren t.g.v. de vorming van cryoprecipitaten die een concentratiegradiënt veroorzaken in het staal.

Na afname zijn de stalen voor CsA, Tac en SRL stabiel tot 14 dagen bij 4°C en tot 1 jaar ingevroren bij -40°C (Warner *et al.*, 1999; Trepanier *et al.*, 1998).

MPA komt voor 99,9% voor in het plasma, zodat deze matrix wordt aanbevolen voor de kwantitatieve bepaling van MPA. MPA is stabiel in plasma voor tenminste 4 uur bij kamertemperatuur en voor ongeveer 8 uur bij 4°C (Bullingham *et al.*, 1998). Het bewaren van een plasmastaal bij kamertemperatuur gedurende 24 uur of langer, kan aanleiding geven tot vals verhoogde concentraties aan totaal MPA, tengevolge van de hydrolyse van MPAG t.v.v. MPA door plasma glucuronidases of andere hydrolases (Streit *et al.*, 2004).

UZLeuven

EDTA-volbloedstalen worden afgenomen voor de TDM van immunosuppressiva. Deze worden gecentrifugeerd voor MPA, waarvan de bepaling op EDTA-plasma wordt uitgevoerd. Na staalontvangst worden de stalen in de koelkast bij 4°C bewaard tot analyse. De TAT ligt voor alle analyses binnen de stabiliteitstermijn.

Voor de extramurosstalen worden geen specifieke richtlijnen gegeven betreffende het staaltransport. Voor CsA, Tac en SRL vormt dit geen probleem, maar voor MPA dient specifiek vermeld te worden dat het staal best gekoeld getransporteerd en bewaard wordt tot verdere analyse.

BESLUIT II.1: de analyse gebeurt zoals volgens de voorgeschreven richtlijnen op EDTA-volbloedstalen voor CsA, Tac en SRL. Voor MPA wordt EDTA-plasma als matrix voorgeschreven en worden extra transportrichtlijnen toegevoegd.

1.2 Tijdstip staalname

A. Cyclosporine

CsA wordt meestal 2x per dag toegediend. TDM van CsA-dalwaarden (C_0), bepaald net voor de ochtenddosering, is een eenvoudige en wijdverspreide manier om de CsA dosis aan te passen (Oellerich *et al.*, 1995). Belangrijk hierbij is dat [CsA] in bloed een diurnale variatie vertoont, met significant lagere C_0 -waarden 's avonds dan 's morgens. De meeste transplantcentra hebben therapeutische doelwaarden ontwikkeld, gebaseerd op hun eigen ervaring en gebruikte bepalingsmethoden (**Tabel II.1**) (Armstrong, 2002).

Belangrijke intra- en interindividuele verschillen in absorptie, distributie, metabolisatie en eliminatie, bemoeilijken, enkel op basis van C_0 , de accurate voorspelling van de efficaciteit (voorkomen van rejectie) en nefrotoxiciteit van de immunosuppressieve therapie met CsA. Specifieke farmacokinetische profielen (**Bijlage II.2**) tonen immers een slechte correlatie

tussen de dalconcentraties (C_0) van CsA en de eigenlijke geneesmiddelblootstelling (Kahan *et al.*, 2004). Alternatieve indices voor de CsA bepaling en monitoring concentreren zich op de interindividuele variabiliteit tijdens de absorptiefase. Een eerste omvat een inschatting van de $AUC_{0\rightarrow 12}$ a.d.h.v. de concentratiebepaling op welbepaalde tijdsintervallen. Een dergelijke methode wordt algemeen beschouwd als de gouden standaard, maar omvat minstens 6-10 exact geplande staalnames, hetgeen niet alleen invasief is, maar ook ongemakkelijk en kostelijk en niet toepasbaar in de ambulante setting. Een ander alternatief is de bepaling van $AUC_{0\rightarrow 4}$ concentratieprofielen a.d.h.v. staalnames tijdens de eerste uren na CsA toediening. Deze methode vereist minder (2-4) staalnames en concentreert zich op de periode met de belangrijkste intra- en interpatiënt variabiliteit. Doelwaarden voor $AUC_{0\rightarrow 4}$ van 4400-5500 ng.h/L verminderen significant het risico op acute rejectie episodes en nefrotoxiciteit (Mahalati *et al.*, 1999). Tal van andere strategieën met beperkte staalnames werden specifiek ontwikkeld voor de TDM van CsA, maar geen enkele kan uiteindelijk als ‘beste’ naar voor worden geschoven (David *et al.*, 2001). Daarenboven zijn ze onlosmakelijk gekoppeld aan specifieke logistieke uitrusting en kosten, hetgeen een algemene internationale implementatie in de weg staat (Morris, 2005). Vooral om deze praktische redenen werd een één-tijdstip CsA-concentratie afgeleid uit Mahalati's $AUC_{0\rightarrow 4}$ data, hetgeen resulteerde in het nieuwe concept van C_2 -monitoring. Het grotendeel van de transplantpatiënten in onderhoudstherapie met Neoral[®], vertoont immers een piekconcentratie tussen 1 en 2 uur na toediening. Door het nemen van een bloedstaal (C_2) 2 uur na de CsA toediening, bekomt men virtueel bij alle patiënten de hoogste geneesmiddelconcentratie. Verschillende studies bij lever-, nier-, hart- en longtransplantpatiënten valideren het gebruik van de CsA C_2 -monitoring ter preventie van acute rejectie en in mindere mate voor het verminderen van CI-geïnduceerde nefrotoxiciteit (Grant *et al.*, 1999; Levy *et al.*, 2002; International Neoral Renal Transplantation Study Group, 2002; Thervet *et al.*, 2003). Desondanks blijft de $AUC_{0\rightarrow 4}$ de beste predictor van klinische efficaciteit en toxiciteit (Mahalati *et al.*, 1999; Canadian Neoral Renal Transplantation Study Group, 2001). Binnen deze periode is C_2 de beste één-tijdstip predictor van de $AUC_{0\rightarrow 4}$, terwijl C_0 slechts weinig met de $AUC_{0\rightarrow 4}$ correleert. Trage absorbeerders van CsA vereisen naast de staalname op het C_2 tijdstip, nog additionele staalnames (Levy *et al.*, 2002).

BESLUIT II.2: CsA $AUC_{0\rightarrow 4}$ vormt de beste predictor van klinische efficaciteit en toxiciteit van de immunosuppressieve therapie. Binnen deze periode is C_2 de beste één-tijdstip predictor van de $AUC_{0\rightarrow 4}$, terwijl C_0 slechts weinig met de $AUC_{0\rightarrow 4}$ correleert.

UZLeuven

De TDM van CsA is in UZLeuven gebaseerd op C_0 -waarden (**Tabel II.1**). Het aanpassen van de therapie gebeurt over het algemeen nooit op basis van 1 spiegel. De spiegels worden geïnterpreteerd in functie van de efficaciteit (tekens van rejectie) en tolerantie (nierfunctie). Het dagelijks monitoren van de CsA-spiegels in de vroege posttransplantatie periode laat een snelle interpretatie toe in functie van de kliniek van de patiënt.

TABEL II.1: Cyclosporine A monitoring UZLeuven

| | NIERTX | LONGTX | LEVERTX | HARTTX |
|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| FREQUENTIE | | | | |
| < 1 MAAND | Dagelijks | Dagelijks | Dagelijks | Dagelijks |
| 1-6 MAAND | 2x/week | 2x/week | 2x/week | 2x/week |
| STAAL | Volbloed; C_0 | Volbloed; C_0 | Volbloed; C_0 | Volbloed; C_0 |
| DOELWAARDEN | | | | |
| < 4 MAAND | 150-250 µg/L | 250-300 µg/L | 200-250 µg/L | 200-250 µg/L |
| > 4 MAAND | 100-200 µg/L | 150-250 µg/L | 100-200 µg/L | 80-200 µg/L |

BESLUIT II.3: De CsA TDM is gebaseerd op C₀-monitoring. CsA C₂-monitoring behoort niet tot de TDM praktijk in UZLeuven.

B. Tacrolimus

Aangezien een aantal klinische studies een goede correlatie hebben aangetoond tussen de Tac-C₀ en de werkelijke AUC voor de meeste vaste orgaantransplantaties (Braun *et al.*, 2002; Undre *et al.*, 2002), is de monitoring van Tac-dalwaarden heden ten dage nog steeds de meest gebruikte methode (Kahan *et al.*, 2002; Armstrong *et al.*, 2002).

De laatste jaren groeit echter de consensus dat Tac-C₀-waarden de totale geneesmiddelblootstelling, zoals gemeten door AUC_{0→12}, niet accuraat genoeg reflecteren en dit zowel voor nier- als andere vaste orgaantransplantaties (Kuypers, 2005). Een verkorte, 4-uurs concentratiecurve (AUC_{0→4}) van Tac lijkt theoretisch een aanvaardbaar compromis tussen wat klinisch mogelijk en praktisch haalbaar is (Pisitkun *et al.*, 2002; Uchida *et al.*, 2002; Ku *et al.*, 1998; Magali *et al.*, 2001). De praktische uitvoering van de verkorte AUC-meting wordt in de klinische praktijk echter terecht in vraag gesteld en beschouwd als omslachtig, onpraktisch en kostelijk (Kuypers, 2005). Prospectieve studies zijn vereist om voor een meer intensieve TDM-methode zoals de AUC_{0→4}, de kosten-effectiviteit, de klinische relevantie en de praktische haalbaarheid aan te tonen. De toegevoegde waarde van de exacte informatie inzake geneesmiddelblootstelling moet immers resulteren in duidelijke klinische voordelen voor de patiënt wat betreft graft overleving, neveneffecten en morbiditeit, voordat men de bijkomende kosten en werk kan staven (Kuypers, 2005).

BESLUIT II.4: Tac AUC_{0→4} vormt de beste predictor van klinische efficaciteit en toxiciteit van de immunosuppressieve therapie, maar wordt in de praktijk vaak beschouwd als omslachtig en kostelijk waardoor Tac C₀-monitoring heden ten dage nog het meest toegepast wordt.

UZLeuven

De TDM van Tac is in UZLeuven gebaseerd op C₀-waarden (**Tabel II.2**). Het aanpassen van de therapie gebeurt over het algemeen nooit op basis van 1 spiegel. De spiegels worden geïnterpreteerd in functie van de efficaciteit (tekens van rejectie) en tolerantie (nierfunctie). Het dagelijks monitoren van de Tac-spiegels in de vroege posttransplantatie periode laat een snelle interpretatie toe in functie van de kliniek van de patiënt.

TABEL II.2: Tacrolimus monitoring UZLeuven

| | NIERTX | LONGTX | LEVERTX | HARTTX |
|--------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| FREQUENTIE | | | | |
| < 1 MAAND | Dagelijks | Dagelijks | Dagelijks | Dagelijks |
| 1-6 MAAND | 2x/week | 2x/week | 2x/week | 2x/week |
| STAAL | Volbloed; C ₀ | Volbloed; C ₀ | Volbloed; C ₀ | Volbloed; C ₀ |
| DOELWAARDEN | | | | |
| < 4 MAAND | 12-15 µg/L | 10-15 µg/L | 8-10 µg/L | 10-15 µg/L |
| > 4 MAAND | 8-12 µg/L | 5-10 µg/L | 5-10 µg/L | ≈ 10 µg/L |

BESLUIT II.5: De Tac TDM is gebaseerd op C₀-monitoring. Tac AUC_{0→4}-monitoring behoort niet tot de TDM praktijk in UZLeuven.

C. MPA

De TDM van MPA is voornamelijk bestudeerd bij niertransplantatie; studies na lever-, hart- of longtransplantatie zijn schaars (Arns *et al.*, 2006).

MPA wordt, in tegenstelling tot de andere immunosuppressiva, meestal aan vaste dosis toegediend (2x1g per dag bij niertransplantpatiënten en 2x1,5g per dag bij hart- en levertransplantpatiënten, allen in combinatie met CI). Het nut van TDM van MMF therapie is controversieel en wordt ook niet altijd in routine uitgevoerd, voornamelijk o.w.v. het mild neveneffectenprofiel van MMF. De grote interindividuele variabiliteit inzake MPA-farmacokinetiek, de veranderingen van de farmacokinetiek in de tijd, en de invloed van co-medicatie, ondersteunen daarentegen de TDM van MPA, voornamelijk vroeg na de transplantatie (Arns *et al.*, 2006).

MPA- C_0 waarden correleren niet met de totale geneesmiddelblootstelling, zoals gemeten door $AUC_{0 \rightarrow 12}$. $AUC_{0 \rightarrow 2}$ -waarden, verkregen door 3 staalnames (C_0 , C_{30} of C_{40} en C_2) voorspellen meer accuraat de totale geneesmiddelblootstelling (Kuypers, 2005; Arns *et al.*, 2006).

Vroeg na transplantatie lijkt de bepaling van MPA $AUC_{0 \rightarrow 2}$ nuttig voor het inschatten van het risico op acute resectie. C_0 -waarden zijn daarentegen minder betrouwbaar. Gedurende tenminste de eerste 6 maanden post nier- en harttransplantatie wordt een totale MPA-AUC waarde tussen 45-60 mg.h/L vooropgesteld, bij combinatietherapie met CI en steroïden. De corresponderende C_0 -waarden gaan van 2,5-4 mg/L, maar deze correleren niet volledig met de totale blootstelling en moeten met zekere voorzichtigheid geïnterpreteerd worden (Kuypers, 2005).

De incidentie aan neveneffecten lijkt eerder gerelateerd aan de dagelijkse dosis, dan aan een farmacokinetische parameter. Dus wat betreft MPA toxiciteit, is er geen correlatie tussen de MPA farmacokinetiek en neveneffecten. Dit kan te wijten zijn aan de acylglucuronide-metabooliet van MPA die geassocieerd is met neveneffecten zoals diarree en anemie, en die meestal niet gedoseerd wordt (Arns *et al.*, 2006; Kuypers, 2005).

BESLUIT II.6: TDM van MPA bij vaste orgaantransplantaties is controversieel. Er is lijkt een gunstig effect onmiddellijk posttransplantatie, maar de kosteneffectiviteit en lange termijns klinische relevantie moeten nog aangetoond worden. $AUC_{0 \rightarrow 2}$ bepaling is de aangewezen methode voor TDM van MPA bij vaste orgaantransplantaties.

UZLeuven

Bij nier- en levertransplantatie wordt de therapie initieel op punt gesteld door de bepaling van $AUC_{0 \rightarrow 2}$ (**Tabel II.3**). Tijdens follow-up wordt de MPA-spiegel vaak enkel gecontroleerd bij klinische aanwezigheid van neveneffecten (vnl. gastrointestinaal). De dosis wordt aangepast o.b.v. C_0 .

TABEL II.3: Mycopenolaat monitoring UZLeuven

| | NIERTx | LONGTx | LEVERTx | HARTTx |
|--------------------|---|--------------------|---|------------------|
| Frequentie | Initieel: $AUC_{0 \rightarrow 2}$ Follow up: geen strikte monitoring | 1x/week | Initieel: $AUC_{0 \rightarrow 2}$ Follow up: geen strikte monitoring | 1-2x/week |
| Staal | Plasma Initieel: $AUC_{0 \rightarrow 2}$ Follow up: C_0 | Plasma; C_0 | Plasma Initieel: $AUC_{0 \rightarrow 2}$ Follow up: C_0 | Plasma; C_0 |
| Doelwaarden | AUC: 45-60 mg.h/L C_0 : 2,5-4 mg/L | C_0 : 2,5-4 mg/L | AUC: 45-60 mg.h/L C_0 : 2,5-4 mg/L | C_0 : 2-4 mg/L |

BESLUIT II.7: zowel bij nier- als levertransplantatie worden de MPA-spiegels, voornamelijk tijdens de onmiddellijke posttransplantperiode, gecontroleerd o.b.v. $AUC_{0 \rightarrow 2}$ bepaling.

D. Sirolimus

TDM is zeker noodzakelijk voor de klinische toepassing van SRL bij vaste orgaantransplantatie. mTOR worden gekarakteriseerd door een nauw therapeutisch venster, zeer variabele absorptie en een grote intra- en interindividuele variabiliteit m.b.t. farmacokinetische eigenschappen (MacDonald *et al.*, 2000).

In tegenstelling met CI bestaat er een goede correlatie tussen de C_0 -waarden van SRL en de $AUC_{0 \rightarrow 24}$. Bij het gebruik van de lage, vaste dosis SRL (2mg/dag) in combinatie met een volledige dosis CsA (4 uur tussentijd), beoogt men een therapeutisch venster van 5-15 ng/ml. Bij monotherapie (5 mg/dag) worden doelwaarden van 12-20 ng/ml vooropgesteld (Kuypers, 2005). Verschillende klinische studies inzake de combinatietherapie van SRL, MPA corticosteroiden en IL-2R antilichamen, in het zogenaamde CI-vrije protocol, hebben ook een nuttig therapeutisch venster opgeleverd: $C_0 = 10-12$ ng/ml gedurende de eerste maanden posttransplant en 5-10 ng/ml daarna (Flechner *et al.*, 2002).

UZLeuven

SRL kent geen plaats meer in de immunosuppressieve therapie binnen UZLeuven. Bij zeldzame toepassing bij niertransplantatie gebeurt de monitoring o.b.v. C_0 -waarden.

1.3 Analytische eigenschappen

Een algemeen overzicht van de analysemethoden die in UZLeuven worden gebruikt i.k.v. de TDM van immunosuppressiva vindt u in **Bijlage II.1** en deze van andere perifere ziekenhuizen onder 'Comments'.

A. Cyclosporine

Momenteel produceren 5 grote, commerciële firma's 7 verschillende immunoassays voor de bepaling van CsA in volbloed (**Tabel II.4**). Daarnaast gebruiken een aantal laboratoria HPLC voor de bepaling van het immunosuppressivum, gekoppeld aan UV-spectrofotometrie. Met behulp van HPLC is het mogelijk om het moedermolecule van zijn metabolieten te scheiden, waardoor deze techniek als gouden standaard wordt beschouwd voor de CsA-bepaling. De meeste laboratoria gebruiken semi-automatische immunoassays, hoewel er een trend is naar het gebruik van HPLC-UV of zelfs LC-MS/MS in grotere centra (**Bijlage II.3**).

TABEL II.4: Commerciële beschikbare bepalingmethoden voor cyclosporine A (Wallemacq, 2004)

| TEST | FIRMA | ANALYSEPRINCIPE | MEETBEREIK ($\mu\text{G/L}$)* | AFWIJKING T.O.V. LC- MS/MS (%) |
|-------------------------|--------------|---|------------------------------------|--------------------------------------|
| TDx FPIA-non-specific | Abbott | fluorescence polarization immunoassay | 65-2000 | 300-500 |
| TDx-FPIA-specific | Abbott | fluorescence polarization immunoassay | 25-1500 | 38 |
| AxSYM FPIA-specific | Abbott | fluorescence polarization immunoassay | 23-800 | 17 |
| RIA Cylco-Trac-specific | DiaSorin | radio-immunoassay | 25-1200 | 11 |
| EMIT | Dade Behring | homogeneous enzyme multiplied immunoassay | 36-500 | 9 |
| CEDIA plus | Microgenics | cloned enzyme donor immunoassay | 25-2000 | 13 |
| Dimension ACMIA | Dade Behring | affinity colom mediated immunoassay | 25-500 | -5 |

* Cattaneo *et al.*, 2005; Armstrong *et al.*, 2001

Van de 7 beschikbare immunoassays is er 1 niet-specifiek en deze vertoont een opmerkelijke kruisreactiviteit met CsA metabolieten: de 'Abbott[®] TDx Drug and metabolites assay' maakt

gebruik van een polyclonaal antilichaam en geeft resultaten die 3 tot 5 keer groter zijn dan het resultaat van HPLC. Deze niet-specifieke bepaling vertoont een slechte correlatie met de kliniek en wordt ook minder en minder gebruikt. De andere 6 immunoassays worden beschouwd als specifiek maar vertonen, zij het in meer beperkte mate, nog een zekere kruisreactiviteit met sommige metabolieten, en geven hierdoor niet noodzakelijk hetzelfde resultaat voor hetzelfde staal (**Tabel II.4**). Meer bepaald, de verhouding van het resultaat van de specifieke assay t.o.v. HPLC verandert met de metaboliet/moedermolecule verhouding in het bloed, en zal daardoor wijzigen met het type transplantatie en het tijdstip posttransplantatie. De metaboliet kruisreactiviteit bij immunoassays is bv. opvallend verlaagd bij C₂-stalen, aangezien de verhouding moedermolecule/metabolieten groter is (tot 6x i.g.v. de belangrijkste kruisreagerende metaboliet AM-1) (Morris, 2005). Een bijkomende oorzaak voor het verschil tussen de bepalingsmethoden kan te wijten zijn aan een incorrecte calibratie (Armstrong, 2002). Een ander mogelijke oorzaak is het verschil in de preanalytische stap en het extractie proces. Met uitzondering van de ACMIA-test op Dimension[®], vertonen de andere immunoassays een manuele precipitatie en extractiestap.

Geen van de selectieve immunoassays voldoen inzake accuraatheid volledig aan de criteria die door consensus conferenties zijn vastgelegd (Armstrong, 2002). De verschillen in de accuraatheid van de metingen heeft echter geen invloed op het klinische nut van de bepalingen, maar dragen bij tot de variabiliteit van de gemeten concentraties in de literatuur en hebben hun invloed op de lokale streefconcentraties (Wallemacq, 2004). Wat de precisie betreft, vertoont de TDx-FPIA-specifiek de laagste imprecisie (L= 6%; H= 2%). De meeste assays voldoen wel aan de between-day vereisten van de CsA consensus guidelines van ≤ 10% bij 50 µg/L en ≤ 5% bij 300 µg/L (Armstrong, 2002). Hoewel het analytisch meetbereik van de verschillende assays het therapeutisch venster dekt dat gebruikt wordt voor de monitoring van CsA-C₀-waarden, is dit niet steeds het geval voor monitoring van C₂-waarden, waar de concentraties 1000 µg/L overschrijden. De meer accurate monitoring o.b.v. C₂-concentratie, implementeert een verdunning, hetgeen een extra bron van variabiliteit met zich meebrengt. Dit werd aangetoond door het International Proficiency Testing Program bij de verdeling van stalen met hogere CsA concentraties. Gevalideerde verdunningsprocedures zijn essentieel om correcte CsA concentraties te rapporteren (Cattaneo *et al.*, 2005).

UZLeuven

TDM van CsA in volbloed vinden we terug op aanvraagbon 3012 onder de rubriek 'Geneesmiddelen dosage' met aanvraagnummer 5130 (=C₀-monitoring) en 5132 (C₂-monitoring).

De TDM van CsA gebeurt a.d.h.v. een immunoassay. Het nadeel van een eventuele bias wordt gecompenseerd door het belangrijk voordeel van een TAT < 1 dag, hetgeen een snelle klinische interpretatie mogelijk maakt. In UZLeuven is men in het laatste kwartaal van 2002 overgeschakeld van de TDx-FPIA CsA-specifieke methode overgeschakeld naar de ACMIA op Dimension[®]. Deze immunoassay bevat geen manuele staalvoorbereiding, hetgeen zowel de productiviteit als de precisie van de assay bevordert. De CV% liggen binnen de 10% over het gehele meetbereik (25-500 µg/L) van de immunoassay zoals vooropgesteld door de consensus guidelines. Het meetbereik omvat echter enkel het therapeutisch interval van de C₀-waarden. Indien het de monitoring van C₂-stalen betreft, worden in de laboratoriumpraktijk manuele verdunningen uitgevoerd.

Om de analytische performantie van C₂-bepalingen te bevorderen heeft Dade Behring een specifieke 'Cyclosporine Extended Range Flex[®] reagent cartridge' ontwikkeld met een meetbereik van 350-2000 µg/L. Gezien de lage uitvoerfrequentie van C₂-monitoring in UZLeuven is deze assay niet beschikbaar in UZLeuven.

BESLUIT II.8: de ACMIA voor CsA op Dimension[®] is algemeen bruikbaar voor TDM van CsA. Een gevalideerde procedure voor C₂-monitoring is mogelijks beschikbaar.

B. Tacrolimus

Tac is een meer potent immunosuppressivum, met een 10- tot 100-keer grotere in vitro immunosuppressieve activiteit dan CsA. De therapeutische concentraties van Tac in volbloed zijn dan ook veel lager, nl. 5-15 µg/L, hetgeen de analyse aanzienlijk bemoeilijkt (Armstrong *et al.*, 2001). Daarnaast bevat zijn moleculaire structuur geen electrofoor of chromofoor, waardoor absorptie, fluorescentie en electro-chemische detectie niet mogelijk is bij therapeutische bloedconcentraties (Wallemacq, 2004). Daarom werden zeer gevoelige en specifieke LC-MS/MS methoden ontwikkeld voor de kwantificatie van Tac in volbloed. Voor de routine TDM gebruiken de meeste laboratoria echter commercieel beschikbare immunoassays, vooral MEIA[®] uitgevoerd op de IMx (**Bijlage II.3**).

Al de beschikbare immunoassays worden gekarakteriseerd door een positieve bias t.o.v. LC-MS/MS (**Tabel II.5**). Tenminste 3 metabolieten van Tac vertonen kruisreactiviteit met het antilichaam dat gebruikt wordt in de immunoassays: M-II, M-III en M-V voor 109%, 90,5% en 92,2% respectievelijk. De beschreven kruisreactiviteit van de actieve M-II metaboliet is klinisch relevant (Wallemacq, 2004). Bij een significant aantal stalen van patiënten met leverfalen (in de vroege periode post levertransplantatie; bij patiënten met cholestasis) werd echter een onaanvaardbare bias (tot 3 µg/L) teruggevonden, indien het geneesmiddel gemeten werd met een immunoassay. Er wordt dan ook voorzichtigheid geboden bij de interpretatie van de immunoassay-resultaten in deze specifieke patiëntengroep (Armstrong *et al.*, 2001).

TABEL II.5: Commercieel beschikbare bepalingmethoden voor tacrolimus (Wallemacq, 2004)

| TEST | FIRMA | ANALYSEPRINCIPE | MEETBEREIK (µG/L) | AFWIJKING T.O.V. LC- MS/MS (%) |
|----------------------|---------------|--|----------------------|--------------------------------------|
| Pro-Trac II | DiaSorin Inc. | enzyme-linked immunosorbent assay | 0.3-30 | 12 |
| EMIT 2000 Tacrolimus | Dade Behring | homogeneous enzyme multiplied immunoassay | 1.5-30 | 23 |
| IMx Tacrolimus | Abbott | microparticle enzyme-linked immunoassay | 1.5-30 | 6 |
| Architect Tacrolimus | Abbott | chemiluminescent microparticle immunoassay | 2-30 [§] | 7 [§] |

[§] Package insert ARCHITECT[®] Tacrolimus, november 2006.

UZLeuven

De bepaling van Tac in volbloed gebeurt volgens aanvraagnummer 5136 op aanvraagbon 3012 onder de rubriek 'Geneesmiddelen dosage'.

In UZLeuven wordt de Tac-bepaling, zoals in het merendeel van de laboratoria (cfr. **Bijlage II.2**), uitgevoerd o.b.v. MEIA op IMx (Abbott Diagnostics). Het gebruik van een immunoassay maakt de TAT van minder dan 1 dag mogelijk, inclusief bepalingen in het weekend. De techniek vertoont randaanvaarbare CV% (low level= 20,2%; medium level= 15,7%; high level 12,6%) over het gehele meetbereik, dat het volledig therapeutisch dosisinterval dekt (1,5-30 µg/L). In 2007 komt er een nieuwe, relatief specifieke ACMIA-immunoassay (Dade Behring) op de markt voor de bepaling van Tac op Dimension. Het is de enige immunoassay die geen manuele staalvoorbereiding vereist, hetgeen de productiviteit kan verhogen en het risico op door staalmanipulatie kan verminderen. Daarenboven toonde een preliminaire evaluatie een opmerkelijk betere reproduceerbaarheid (CV low level= 6,9%; high level= 4,9%). Omwille van reagensinstabiliteit wordt de test niet geïmplementeerd in UZLeuven tot verdere verbeteringen vanwege de firma aangebracht zijn.

BESLUIT II.9: De huidige analytische performantie voor de Tac-bepaling lijkt bevorderd te worden door de switch naar ACMIA voor Tac op Dimension[®], maar verdere evaluatie is vereist. Voorzichtigheid is geboden met de interpretatie van de resultaten bij leverpatiënten in de onmiddellijke posttransplantatieperiode.

C. MPA

De actieve component van MMF, MPA komt voornamelijk in het plasma voor aan concentraties die 100-keer hoger zijn dan deze van Tac. Hoewel de MPA bepaling mogelijk is m.b.v. HPLC-UV en LC-MS/MS, gebruiken de meeste laboratoria een commerciële immunoassay, die minder arbeidsintensief en tijdrovend is (**Bijlage II.3**). Voor deze immunoassay tonen meerdere studies een positieve bias t.o.v. van HPLC (**Tabel II.6**). Deze bias is primair te wijten aan de kruisreactiviteit met de actieve acylglucuronide metaboliet van MPA (Shipkova *et al.*, 1999). De inactieve fenolglucuronide metaboliet MPAG, vertoont geen kruisreactiviteit met de gebruikte antilichamen, maar is onstabiel in het plasma, en kan afbreken tot MPA, hetgeen resulteert in een hogere bias bij stalen die gedurende langere tijd bewaard worden (Holt *et al.*, 2002). Het is de vrije fractie van MPA, die geassocieerd is met de in vitro efficaciteit. Omdat significante wijzigingen in deze vrije fractie optreden na veranderingen in de albumineconcentratie, verdringing van MPA op albumine door MPAG, nierinsufficiëntie of hyperbilirubinemie, is er veralgemeende interesse in de bepaling van de vrije fractie MPA, die slechts 1-2% uitmaakt van het totale gehalte aan MPA (Wallemacq, 2004). Maar enkele assays, zoals LC-MS/MS (Weber *et al.*, 2002) of membraandialyse en HPLC-UV, zij hierdoor in staat de nodige sensitiviteit te behalen (Wallemacq, 2004).

TABEL II.6: Commercieel beschikbare bepalingsmethoden voor mycofenolaat (Wallemacq, 2004)

| TEST | FIRMA | ANALYSEPRINCIPE | MEETBEREIK (MG/L) | AFWIJKING T.O.V. LC- MS/MS (%) |
|------|--------------|--|----------------------|--------------------------------------|
| EMIT | Dade Behring | Homogeneous enzyme multiplied immunoassay | 0,1-50 | 20 |

UZLeuven

Dosage van MPA in plasma wordt aangevraagd met nummer 5080, terug te vinden op aanvraagbon 3012 onder de rubriek ‘Geneesmiddel dosage’.

Voor de TDM van MPA werd een specifieke LC-MS/MS methode ontwikkeld, met een goede imprecisie (low level=10%, medium level= 7,5%, high level= 9,0%) over het gehele meetbereik (0,12-20 mg/L).

De bepaling wordt in de praktijk meestal op elke weekday uitgevoerd (TAT<1 dag). De voorgeschreven uitvoerfrequentie van 2x/week is voldoende voor de transplantatiepraktijk en schept ruimte voor eventuele nieuwe LC-MS/MS-bepalingen.

BESLUIT II.10: De geoptimaliseerde standaardmethode vertoont een voldoende analytische performantie. Er is ruimte voor de reductie van de uitvoerfrequentie naar de voorgeschreven 2x/week.

D. Sirolimus

Na de terugtrekking in 2001 van de MEIA[®] analyse op de IMx (Abbott Laboratories), waren er tot voor kort enkel chromatografische technieken op de markt voor de bepaling van SRL in volbloed stalen. Deze technieken zijn zowel gekoppeld aan UV, MS en tandem-MS voor detectie. De HPLC-UV methoden zijn wat beperkt in sensitiviteit, en worden daarom gekenmerkt door een uitgebreide preanalytische fase (Shaw *et al.*, 2000; Kahan *et al.*, 2002).

De voordelen van LC-MS/MS zijn de hogere sensitiviteit (tot 0,2 µg/L) en de snellere preanalytische en analytische stappen (Streit *et al.*, 1996).

De commerciële immunoassays die sinds 2004 op de markt zijn voor de SRL bepaling zijn de CEDIA[®] en de heruitgegeven versie van de MEIA[®] op het IMx toestel in 2004, nu gefabriceerd door de firma Axis Shield (Morris *et al.*, 2006) (**Bijlage II.3**). Beide bepalingmethoden vertonen een opmerkelijke positieve bias t.o.v. de gouden standaard, d.i. LC-MS/MS (**Tabel II.7**), door een belangrijke kruisreactiviteit met SRL-metabolieten (vnl. hydroxy-SRL, 41-O-demethyl-SRL, 32-O-demethyl-SRL). De bias wordt tevens gekenmerkt door een grote spreiding van ± 23%, hetgeen ook kon worden vastgesteld bij de originele versie van de SRL MEIA[®] methode (Abbott Diagnostics) (Morris *et al.*, 2006). Deze spreiding is voornamelijk te wijten aan het verschil in metabolietconcentraties in stalen afgenomen van verschillende patiëntenpopulaties, op verschillende tijdstippen binnen het dosisinterval, en op verschillende tijdstippen na transplantatie (Shaw *et al.*, 2000). SRL-concentraties, verkregen door deze immunoassays, worden dan ook best zeer voorzichtig geïnterpreteerd, vooral i.k.v. dosisaanpassingen. Door de uitgesproken bias en hoge graad aan variabiliteit vormen de immunoassays niet de voorkeursmethoden voor de TDM van SRL, zeker niet in de vroege posttransplantatie periode (Morris *et al.*, 2006).

TABEL II.7: Commercieel beschikbare bepalingmethoden voor sirolimus.

| TEST | FIRMA | ANALYSEPRINCIPE | MEETBEREIK (µG/L) | AFWIJKING T.O.V. LC- MS/MS (%) |
|---------------------|-------------|--|----------------------|--------------------------------------|
| IMx Sirolimus | Axis Shield | microparticle enzyme-linked immunoassay | 3-30* | ±50* |
| CEDIA | Microgenics | cloned enzyme donor immunoassay | 3-30** | ±20** |
| Architect Sirolimus | Abbott | chemiluminescent microparticle immunoassay | 2-30 [§] | ±20 [§] |

* Moris *et al.*, 2006

** Westley *et al.*, 2005

§ Package insert ARCHITECT[®] Sirolimus, november 2006.

UZLeuven

De bepaling van SRL in volbloed gebeurt volgens aanvraagnummer 5081 op aanvraagbon 3012 onder de rubriek 'Geneesmiddel dosage'.

Voor de TDM van SRL werd een specifieke LC-MS/MS methode ontwikkeld, met een goede imprecisie (low level=10%, medium level= 7,0%, high level= 7,0%) over het gehele meetbereik (1,4-40 µg/L).

De bepaling wordt elke weekdag uitgevoerd, zoals voorgeschreven (TAT<3 dagen). Gezien het beperkt toepassingsgebied van SRL heden ten dagen, wordt deze uitvoerfrequentie niet gehaald.

BESLUIT II.11: LC-MS/MS is de voorkeursmethode gezien de uitgesproken kruisreactiviteit van SRL-metabolieten bij immunoassays.

III. WAT IS DE PLAATS VAN HET NIEUW IMMUNOSUPPRESSIVUM EVEROLIMUS IN DE KLINISCHE PRAKTIJK?

1. Clinical impact

Everolimus werd voor de profylaxis van transplantafstoting bestudeerd in combinatie met andere immunosuppressieve geneesmiddelen, voornamelijk CsA en corticosteroiden. De opzet van de belangrijkste studies zijn samengevat in **Tabel III.1**. Het immunosuppressivum heeft momenteel een Europese goedkeuring als immunosuppressivum bij de profylaxis van transplantafstoting bij zowel volwassen hart- en niertransplantpatiënten, als bij pediatrische niertransplantpatiënten. Daarnaast wordt everolimus ook gebruikt in combinatie met stents voor de behandeling van coronaire laesies (Mabasa *et al.*, 2005).

TABEL III.1: Belangrijkste klinische studies van Certican® post vaste orgaantransplantatie

| REFERENTIE | BEHANDELING | PAT. | STUDIEOPZET EN DUUR |
|----------------------------------|--|-------|--|
| Niertransplantatie | | | |
| Lorber <i>et al.</i> , 2005 | Certican 1,5 mg/dag | 194 | Vaste dosis Certican |
| | Certican 3 mg/dag | 198 | Gerandomiseerde, dubbelblinde, parallelle studie |
| | MMF 2g/dag | 196 | 3 jaar (1 jaar dubbelblind, 2 jaar open) |
| | (+ standaarddosis CsA en corticosteroiden) | = 588 | |
| Oppenheimer <i>et al.</i> , 2003 | Certican 1,5 mg/dag | 193 | Vaste dosis Certican |
| | Certican 3 mg/dag | 194 | Gerandomiseerde, dubbelblinde, parallelle studie |
| | MMF 2g/dag | 196 | 3 jaar (1 jaar dubbelblind, 2 jaar open) |
| | (+ standaarddosis CsA en prednisone) | =583 | |
| Nashan <i>et al.</i> , 2004 | Certican 3 mg/dag + volledige dosis CsA | 58 | Gerandomiseerde, open-label, parallelle studie |
| | Certican 3 mg/dag + verminderde dosis CsA | 53 | 3 jaar |
| | MMF 2g/dag | =111 | |
| | (+ basiliximab en corticosteroiden) | | |
| Harttransplantatie | | | |
| Eisen <i>et al.</i> , 2003 | Certican 1,5 mg/dag | 209 | Vaste dosis Certican |
| Kovarik <i>et al.</i> , 2003 | Certican 3 mg/dag | 211 | Gerandomiseerde, dubbelblinde, parallelle studie |
| | AZA 1-3 mg/kg/dag | 214 | 2 jaar (1 jaar dubbelblind, 1 jaar open) |
| | (+ standaarddosis CsA en corticosteroiden) | | |
| Longtransplantatie | | | |
| Valentine <i>et al.</i> , 2004 | Certican 3 mg/dag | 101 | Vaste dosis Certican |
| | AZA 1-3 mg/kg/dag | 112 | Gerandomiseerde, dubbelblinde, parallelle studie |
| | (+ standaarddosis CsA en corticosteroiden) | = 213 | 3 jaar (3 jaar dubbelblind) |

1.1 Niertransplantatie

De doeltreffendheid van everolimus na niertransplantatie werd met MMF vergeleken in 2 grote, gerandomiseerde dubbelblinde studies (**Tabel III.1**) (Lorber *et al.*, 2005; Oppenheimer *et al.*, 2003). Everolimus bleek in beide studies even effectief als MMF wat betreft de preventie van transplantafstoting, met na 36 maanden geen significante verschillen tussen beide groepen inzake het eerste efficaciteitseindpunt, gedefinieerd als incidentie van BPAR ('biopsy proven acute rejection'), transplantafstoting, dood of verlies aan follow-up (Lorber *et al.*: resp. 33,7%, 34,0%, 31,1%; Oppenheimer *et al.*: 33,0%, 38,9% en 37,2%) (**Bijlage III.1**).

In de studie van Lorber *et al.* werd de everolimusarm met 1,5 mg/dag geassocieerd met een lagere incidentie na 36 maanden van antilichaam-behandelde acute transplantafstoting in vergelijking met MMF (10% vs. 18%; $P=0,014$), en in de studie van Oppenheimer *et al.*, werd voor dezelfde everolimusdosis een significant lagere incidentie van laattijdige BPAR, orgaanafstoting, dood of verlies aan follow-up gerapporteerd in vergelijking met MMF (1,2% versus 5,9%; $P < 0,05$).

Belangrijk is dat het gebruik van everolimus gepaard ging met een lagere incidentie aan CMV infectie dan MMF (6% en 7% versus 20%; $P < 0,05$).

Data na 12 maanden van de studie van Lorber *et al.* toonden hogere serum creatinineconcentraties bij patiënten behandeld met 1,5 of 3 mg everolimus in vergelijking

met patiënten die MMF toegediend kregen (1,7 mg/dL en 1,8 mg/dL vs. 1,5 mg/dL). De gemiddelde creatinineklaring was ook lager voor de everolimus-behandelde patiëntengroep. Het gebruik van everolimus in combinatie met CsA steunt op synergistische immunosuppressie. Doch, eventuele lange termijns voordelen van CsA-gebruik worden overschaduwed door de geassocieerde, toenemende nefrotoxiciteit. Dit heeft geresulteerd in studies naar de efficaciteit van de gecombineerde behandeling van everolimus met enerzijds volledige dosis CsA en anderzijds verminderde dosis CsA (cfr. **Tabel III.1**: Nashan *et al.*, 2004). In de studie van Nashan *et al.* werden 111 patiënten gerandomiseerd voor het krijgen van enerzijds volledige en anderzijds verminderde dosissen CsA in combinatie met everolimus, corticosteroiden, en basiliximab. De volledige dosis groep kreeg 6-8 mg/kg/dag CsA en de dosis werd aangepast op geleide van C₀-waarden van 150-300 µg/L gedurende de eerste 2 maanden en 125-250 µg/L vanaf 3 maanden tot 36 maanden. De groep met verminderde dosis CsA kreeg 3-4 mg/kg/dag CsA toegediend, en de dosis werd aangepast gericht op C₀-waarden van 75-125 µg/L tijdens de eerste 2 maanden en 50-100 µg/L van maand 3 tot maand 36. Primair efficaciteitsfalen was gedefinieerd als BPAR, transplantafstoting, dood of verlies aan follow-up van de patiënt, en bleek significant lager in de studiearm met verminderde dosis CsA in vergelijking met de groep die een volledige dosis CsA kreeg toegediend en dit zowel na 6 maanden (3,4% vs 15,1%; P=0,046), 12 maanden (8,6% vs 28,3%; P=0,012) en 36 maanden (17,2% vs 35,8%; P=0,032).

Een veel voorkomend neveneffect bij het gebruik van everolimus of sirolimus is hyperlipidemie, met toegenomen serum cholesterol- en triglycerideconcentraties bij ongeveer 30-50% van de patiënten (Pascual *et al.*, 2006). Dyslipidemie kan onder controle worden gehouden door enerzijds een verandering in levensgewoontes en anderzijds hypolipemiserende geneesmiddelen zoals statines voor hypercholesterolemie en fibraten bij hypertriglyceridemie, in samenspraak met gepubliceerde guidelines zoals deze van 'the National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative' (Kasikse *et al.*, 2004).

In 2006 publiceerden Webster *et al.* een meta-analyse inzake het gebruik van mTOR-inhibitoren (SRL, everolimus) als primaire immunosuppressie bij niertransplantpatiënten. In totaal werden 33 studies geïncludeerd (27 voor SRL, 5 voor everolimus en 1 met beide). De algemene conclusie was een verbeterde graftoverleving met combinatietherapie met mTOR-na niertransplantatie (lager risico op acute transplantafstoting en hogere GFR), maar meer neveneffecten zoals beenmergsuppressie (vnl. trombocytopenie) en lipidenstoornissen (Webster *et al.*, 2006). Een andere recente meta-analyse van mTOR inhibitoren bij niertransplantpatiënten heeft aangetoond dat onderhoudstherapie met SRL en everolimus geassocieerd is met een significant verminderd risico op het ontwikkelen van zowel een posttransplant *de novo* maligniteit (Kauffman *et al.*, 2005).

BESLUIT III.1: Het gebruik van everolimus na niertransplantatie blijkt even effectief als MMF, beide in combinatie met CsA en corticosteroiden, voor de preventie van acute en chronische rejectie. Belangrijk is dat de combinatie met everolimus een verminderde dosis van CsA toelaat, waardoor de CI gebonden nefrotoxiciteit beduidend kan verminderd worden. Daarenboven vertoont de onderhoudstherapie met everolimus anti-tumorale effecten.

1.2 Harttransplantatie

De efficaciteit en veiligheid van everolimus (1,5 mg/dag en 3 mg/dag) werd bestudeerd in vergelijking met AZA (1-3 mg/kg/dag) bij 634 primaire harttransplantpatiënten in combinatietherapie met CsA, corticosteroiden en statines (cfr. **Tabel III.1**; Eisen *et al.*, 2003; Kovarik *et al.*, 2003). De incidentie aan acute transplantafstoting (Graad 3A of hoger) was significant lager voor de patiënten in beide everolimusarmen (30,6% en 21,3% resp.) in

vergelijking met de AZA-arm (46%; $P < 0,001$). Daarenboven vertoonden de everolimusgroepen een significant lagere incidentie van CMV infectie na 12 maanden t.o.v. de AZA-groep (7,7% en 7,6% vs. 21,5%; $P < 0,001$). In deze studie bepaalde men de coronaire intima proliferatie bij aanvang van de studie en na 12 maanden m.b.v. intravasculaire ultrasonografie (IVUS). Zowel de gemiddelde intima dikte als de incidentie van cardiale allograft vasculopathie waren significant lager bij patiënten die everolimus kregen dan bij deze die AZA kregen en dit zowel na 12 maanden (35,7% en 30,4% vs 52,8%; $P < 0,05$) als na 24 maanden (**Bijlage III.2**) (Eisen *et al.*, 2006). Een belangrijk minpunt is dat de IVUS-data afkomstig zijn van slechts 1/3 van de patiënten en de selectiecriteria van deze patiëntengroep werden niet strikt gedefinieerd. De bestudeerde patiënten zijn dus niet ad random geselecteerd. Nierinsufficiëntie was bv. een veel voorkomende reden om geen IVUS uit te voeren bij patiënten, maar dit impliceert dat de meest zieke patiënten, met waarschijnlijk de meest ernstige vasculopathie, uit de analyse werden geëxcludeerd (Hiatt *et al.*, 2006).

Cardiale allograft vasculopathie is de hoofdoorzaak voor mortaliteit 1 jaar post harttransplantatie en zowel acute rejectie als CMV infectie blijken een sleutelrol te spelen in de ontwikkeling ervan. Het gebruik van everolimus heeft een gunstige invloed op elk van deze factoren, hetgeen resulteert in belangrijke voordelen voor harttransplantpatiënten (Neumayer *et al.*, 2005).

Everolimus is sinds juli 2003 in Europa goedgekeurd voor klinisch gebruik bij hart- en niertransplantpatiënten, maar is dit nog niet in de Verenigde Staten. In November 2005 reageerde 'Cardiovascular and Renal Drugs Advisory Committee on Food and Drug Administration' tegen de goedkeuring van het algemeen gebruik van everolimus voor de preventie van cardiale en renale transplantafstoting tot meer informatie beschikbaar is (Hiatt *et al.*, 2006). Deze kan geleverd worden door de lopende Europese studie en de geplande US cardiale transplantatie studie.

In praktijk wordt everolimus gebruikt voor de prophylaxis van orgaanafstoting bij volwassen patiënten met een allogene hart- of niertransplant. Het wordt gegeven in combinatie met CsA en corticosteroïden. Meer specifieke indicaties zijn patiënten met chronisch nierfalen; met recurrenente CMV infecties; patiënten die een 2^{de} transplantatie ondergaan; in hart-long transplantaties na het optreden van BOS; bij patiënten met maligniteiten onder immunosuppressie.

BESLUIT III.2: Bij harttransplantpatiënten vermindert everolimus de incidentie van transplantverlies, acute rejectie, dood en vasculopathie in vergelijking met AZA. In de huidige transplantpraktijk is het gebruik van everolimus Europees goedgekeurd voor de prophylaxis van orgaanafstoting bij volwassen patiënten met een allogene hart- of niertransplant.

1.3 Long- en levertransplantatie

De doeltreffendheid van everolimus in het vertragen van progressieve chronische rejectie bij longtransplantpatiënten is aangetoond door de studie van Valentine *et al.* (**Tabel III.1**). Na longtransplantatie manifesteert chronische transplantafstoting zich o.v.v. B.O.S. In vergelijking met de AZA-groep vertoonden de met everolimus behandelde patiënten een significant verminderde incidentie van $\Delta FEV_1 > 15\%$ (vermindering in 'forced expiratory volume' in 1 seconde $> 15\%$ van de referentiewaarde bepaald bij aanvang van de studie; 27,7% vs 15,8%; $P < 0,05$) en $\Delta FEV_1 > 15\%$ met B.O.S. (20,5% vs. 8,9%) 12 maanden posttransplantatie. De afname van de incidentie van acute transplantafstoting bleek minder significant na 2 jaar (Snell *et al.*, 2006).

Een recent gepubliceerde studie van Levy *et al.* toont de veiligheid, tolerantie en doeltreffendheid van everolimus t.o.v. placebo bij levertransplantpatiënten (Levy *et al.*, 2006).

Alle patiënten kregen CsA en men vergeleek 4 groepen, nl. deze met 0,5 mg everolimus BID (n=28), 1,0 mg everolimus BID (n=30), 2 mg everolimus BID (n=28) en placebo (n=30). De resultaten toonden geen significant verschil in transplantafstoting, hoewel de patiënten met 1 en 2 mg BID de laagste, absolute rejectieaantallen vertoonden. Het uitblijven van transplantafstoting was gecorreleerd met de everolimus C₀-waarden: patiënten met C₀-waarden ≤3 µg/L vertoonden 3x hogere kans op transplantafstoting dan deze met C₀-waarden > 3 µg/L. Er was geen statisch significant verschil in neveneffecten tussen de 4 groepen. De nierfunctie verminderde ongeveer in gelijke mate in de 4 groepen en er was op geen enkel tijdstip een significant verschil tussen de everolimus behandelde en placebo-arm. De incidentie van hepatische arteriële trombose (HAT) was 0%, 3,3%, 3,2% en 3,3% voor de 0,5 mg BID, 1 mg BID en 2 mg BID en placebo groepen resp. Er werd geen toename in infectieuze complicaties, zoals CMV-infectie, wondinfecties of transplantafstoting vastgesteld in de everolimus-behandelende groep en de algemene transplant- en patiëntoverleving was gelijkaardig voor de 4 patiëntengroepen (Levy *et al.*, 2006; Everson, 2006).

Door SRL zijn mTOR inhibitoren berucht bij levertransplantatie. De constatare van een belangrijke toename van voornamelijk HAT bij levertransplantpatiënten, die behandeld werden met SRL heeft geresulteerd in een FDA-waarschuwing, die het gebruik van SRL afraadt bij levertransplantpatiënten. In de studie van Levy *et al.* waren er slechts 3 gevallen van HAT in de everolimus-groepen, waarvan geen enkele geneesmiddel gerelateerd bleek te zijn. De interpretatie van de studieresultaten is echter beperkt door de kleine studiegrootte. Grotere, gerandomiseerde studies zijn nog zeker nodig om zowel de doeltreffendheid als de veiligheid van everolimus bij levertransplantpatiënten te bevestigen (Everson, 2006).

BESLUIT III.3: Er bestaat heden ten dage nog weinig evidentie voor het gebruik van everolimus bij andere vaste orgaantransplantaties. Everolimus is wel het eerste geneesmiddel met een significante vermindering in verlies van longfunctie, waardoor het een veelbelovend geneesmiddel lijkt voor de langdurige onderhoudstherapie na longtransplantatie. Het gebruik na levertransplantatie vergt nog uitgebreid onderzoek.

1.2 UZLeuven

Het merendeel van de aanvragen voor de bepaling van everolimus in volbloed is afkomstig van nier- en harttransplantatie (zie bijlage). Vooral bij niertransplantatie is de overgang van sirolimus naar everolimus opvallend tijdens het afgelopen jaar (cfr. Bijlage 3.3)

Vanuit de verschillende vaste orgaantransplantatie disciplines bestaat er een toenemende interesse naar het gebruik van everolimus:

- **Prof. Vanhaecke:** ‘Everolimus krijgt een belangrijke rol in de onderhoudstherapie bij verschillende orgaantransplantatie disciplines. Wat harttransplantatie betreft, vertoont everolimus voordelen m.b.t. de voornaamste complicaties na harttransplantatie (intima proliferatie, verminder nefrotoxiciteit door verlaging van CI-dosage, anti-tumorale effecten)

- **Prof. Kuypers:** ‘Everolimus kent een toenemend gebruik bij niertransplantatie als ‘add on’ drug’ (Bijlage III.3)

- **Prof. Pirenne/Nevens:** ‘Everolimus kent een toenemend gebruik na levertransplantatie, omdat het immunosuppressivum niet geassocieerd is met verhoogd risico op arteria hepatica trombose (AHT). Door eventuele problemen met de wondheling, wordt het niet onmiddellijk posttransplantatie gebruikt, maar pas na 2-3 maanden. De toepassing is voornamelijk 2^{de} lijnstherapie bij nierinsufficiëntie t.g.v. CI-gebruik en bij gastrointestinale neveneffecten bij MMF.’

- **Prof. Verleden:** ‘Everolimus kent een toenemend gebruik bij longtransplantatie, hoewel dit nog niet overtuigend genoeg werd aangetoond.’

BESLUIT III.4: De toepassing van everolimus in de routine transplantatiepraktijk in UZLeuven neemt toe.

2. Analytische performantie karakteristieken

2.1 Staalsoort en stabiliteit

Ongeveer 75% van everolimus in bloed is proteïnegebonden en meer dan 75% wordt gesekwestreerd door de rode bloedcellen. Hierdoor worden EDTA volbloedstalen aanbevolen voor TDM (Mabasa *et al.*, 2005).

Everolimus stockoplossingen zijn voor tenminste 6 maanden houdbaar bij -80°C. In een koelkast (4°C) verliezen everolimus stockoplossingen 14% van hun concentratie gedurende 14 dagen. Everolimus volbloedstalen verdragen tenminste 3 vries-dooi cycli. Bloedstalen bewaard bij -80°C zijn stabiel voor tenminste 8 maanden. Geëxtraheerde bloedstalen zijn in een autosampler stabiel gedurende tenminste 48 uur (Kirchner *et al.*, 2004).

BESLUIT III.5: EDTA volbloed is de aanbevolen matrix voor TDM. De analyse wordt bij voorkeur binnen 1 week na staalname uitgevoerd. Tot dan is bewaring van het volbloedstaal bij 4°C aangewezen.

2.2 Tijdstip van staalname

TDM van C_0 -waarden verbetert de uitkomst van patiënten onder immunosuppressieve therapie met everolimus. Data van talrijke, relatief recent gepubliceerde studies bij nier-, hart- en levertransplantatie suggereren dat er gedurende het eerste jaar posttransplantatie een goede relatie bestaat tussen de everolimus C_0 en de farmacologische respons (Mabasa *et al.*, 2005).

Bij niertransplantatie werd het therapeutische dosisinterval vastgesteld door Kovarik *et al.* o.b.v. een open, prospectieve, multicenter studie met verminderde CsA dosage bij *de novo* niertransplantpatiënten. 237 patiënten werden gerandomiseerd voor het krijgen van enerzijds 0,75 mg everolimus BID of 1,5 mg everolimus BID samen met een verminderde dosis CsA en corticosteroiden. Vervolgens werd de everolimus dosis geïndividualiseerd o.b.v. TDM van C_0 -waarden gericht op ≥ 3 mg/L. Het vooropgestelde dosisinterval van 3 μ g/L werd afgeleid uit een fase 3 studie naar de vergelijking van MMF met everolimus, beide in combinatie met CsA. Voor everolimus kon een verhoogde incidentie aan acute resectie (37%) en graft verlies (17%) worden vastgesteld bij patiënten met een C_0 -waarden < 3 μ g/L in vergelijking met deze met een concentratie tussen 3-8 μ g/L (respectievelijk 18% en 4%). Er bestond een toegenomen incidentie van trombocytopenie en hypertriglyceridemie bij everolimus C_0 -waarden > 8 mg/L (9%) in vergelijking met 0% bij waarden < 3 μ g/L en 3% bij 3-8 μ g/L. De onderzoekers concludeerden dat therapeutische C_0 -waarden tussen 3-8 μ g/L optimaal zijn voor de efficaciteit en veiligheid van everolimus. Hetzelfde dosisinterval werd vastgesteld door andere studies bij niertransplantpatiënten (Vitko *et al.*, 2004; Kovarik *et al.*, 2002).

Ook in de populatie van harttransplantpatiënten werd het therapeutisch concentratieinterval onderzocht door Kovarik *et al.* in vergelijking met azathioprine, beide samen met CsA en corticosteroiden. Er werd een significante lineaire correlatie tussen everolimus AUC en C_0 geconstateerd (Kovarik *et al.*, 2003).

Over het algemeen vormen dalwaarden gemeten door LC-MS/MS de beste predictor voor klinische efficaciteit, met waarden >3 μ g/L geassocieerd met een verminderd risico op acute afstoting en >8 μ g/L geassocieerd met een mogelijk toegenomen incidentie aan neveneffecten (bv. hypertriglyceridemie, leukocytopenie, trombocytopenie) (Neumayer, 2005). De bovengrens van het concentratieinterval is echter nog niet volledig vastgelegd, aangezien sommige patiënten C_0 -waarden tolereren tot 15 μ g/L zonder het optreden van enig neveneffect (Mabasa *et al.*, 2005).

BESLUIT III.6: Er bestaat een goede correlatie tussen everolimus C_0 -waarden en de farmacologische respons bij nier- en harttransplantpatiënten. Voor de andere groepen van vaste orgaantransplantaties bestaat er heden ten dage nog onvoldoende evidentie.

2.3 Therapeutische drugmonitoring

Everolimus vertoont een belangrijke interindividuele farmacokinetische variabiliteit. Zo vereisen bv. zwarte patiënten hogere dosissen everolimus t.g.v. een toegenomen klaring. De everolimus bloedconcentraties zijn onderhevig aan intraindividuele variaties tijdens de behandeling o.i.v. geneesmiddelinteracties, veranderingen in de gezondheidstatus van de patiënt en de therapietrouw. Zo zal comediatie van potente CYP-3A4 inhibitoren (bv. erythromycine, itraconazole,...) een verlaging van de everolimus klaring veroorzaken. Bij patiënten met leverdysfunctie, zullen wijzigingen in de klaring dosisreducties tot 50% teweeg brengen (Kovarik *et al.*, 2001). Deze belangrijke inter- en intraindividuele noopt samen met het nauwe therapeutische concentratie-interval van 3-8 µg/L tot TDM van everolimus, voornamelijk tijdens het eerste jaar posttransplantatie (Mabasa *et al.*, 2005).

Het nut van TDM voor everolimus werd bv. aangetoond door Starling *et al.* bij harttransplantpatiënten (Starling *et al.*, 2004). Het risico op BPAR was significant verschillend bij patiënten met everolimus concentratie 3-8 µg/L (24%) dan < 3 µg/L (17%). De gemiddelde maximale intimadikte 12 maanden posttransplantatie was significant minder in de 2 everolimusgroepen (1,5 mg/dag en 3 mg/dag) dan in niet-everolimusgroep. De incidentie aan allograft vasculopathie toonde gelijkaardige resultaten (cfr. supra). Er werd een algemene tendens vastgesteld tot trombocytopenie bij hogere everolimus C₀-waarden. TDM bevordert de klinische efficiëntie van de immunosuppressieve behandeling met everolimus.

Een gelijkaardige retrospectieve analyse bij niertransplantpatiënten: Lorber *et al.* (Lorber *et al.*, 2005) toonden dat everolimus C₀-waarden van ≥ 3 µg/L geassocieerd is met een verminderde incidentie van BPAR en transplantverlies in vergelijking met lagere C₀-waarden. Hypertriglyceridemie en hypercholesterolemie lijken toe te nemen met hogere C₀-waarden (**Bijlage III.4**).

Aangezien het risico op transplantafstoting het grootst is tijdens de onmiddellijke periode posttransplantatie, zal het therapeutische dosisinterval niet noodzakelijk hetzelfde zijn voor dit acute stadium als voor de langetermijns behandeling. Tijdens het verdere levensverloop van de patiënt verandert ook zijn medicatie, hetgeen nieuwe geneesmiddelinteracties mogelijk maakt. Gezien de langetermijns behandeling met everolimus blijft TDM dus nuttig. Heden ten dage bestaan er echter nog geen studies die de farmacokinetiek en farmacodynamiek van everolimus evalueerden, meer dan 1 jaar posttransplantatie. Hiervoor is een langetermijns studie vereist (Mabasa *et al.*, 2005).

BESLUIT III.7: Belangrijke inter- en intraindividuele farmacokinetische variabiliteit noodzaakt tot TDM van everolimus, voornamelijk in het eerste jaar posttransplantatie.

2.4 Analytische eigenschappen

De meest gebruikte techniek voor de bepaling van everolimus in volbloed is HPLC met enerzijds MS/MS en anderzijds UV-detectie. HPLC-MS/MS vertoont een hogere sensitiviteit in vergelijking met HPLC-UV. De LLQ voor everolimus m.b.v. HPLC-MS/MS varieert van 0.15-0.5 µg/L in vergelijking met een spreiding van 1 tot 5 µg/L m.b.v. HPLC-UV (Mabasa *et al.*, 2005).

Kovarik *et al.* kwantificeerden everolimus volbloedconcentraties a.d.h.v. een gevalideerde ELISA, maar er zijn slechts beperkte data beschikbaar voor de klinische toepassing van deze assay (Kovarik *et al.*, 2001).

Om de routine TDM van everolimus te vergemakkelijken, werd een commercieel beschikbare Innofluor[®] Certican[®] assay ontwikkeld, die gebruik maakt van de FPIA-technologie op Abbott TDx/TDxFix[®] (Mabasa *et al.*, 2005). De LLQ (CV≤20%) van 2 µg/L voor deze immunoassay is een belangrijk discussiepunt, gezien de aanbevolen dalconcentratie van 3 µg/L voor everolimus (Mabasa *et al.*, 2005). Strom *et al.* evalueerden de kruisreactiviteit van

de Innofluor[®] Certican[®] immunoassay en stelden een minimale kruisreactiviteit vast voor de 3 detecteerbare metaboliëten van everolimus (nl. < 5% voor 46-hydroxy en 24-hydroxy everolimus en 4-6% voor 25-hydroxy everolimus) (Strom *et al.*, 2005). Een eerste longitudinale vergelijking van de analyse van klinische stalen afkomstig van niertransplantpatiënten met enerzijds de everolimus FPIA t.o.v. HPLC-MS werd gepubliceerd door Salm *et al.* (Salm *et al.*, 2006). De 2 methoden vertoonden een adequate interrater performantie (Shaw *et al.*, 1995), met voor de HPLC-MS methode een inaccuraatheid en precisie t.o.v. 'inhouse' controlemateriaal van $\leq 2.5\%$ en $\leq 6.6\%$ en voor de FPIA, gebaseerd op door de fabrikant geleverd controlemateriaal, van $\leq \pm 6.0\%$ en $\leq 13.0\%$. De analyse van de FPIA calibratiemateriaal via HPLC-MS toonde echter een calibratieverschil van $\approx -13\%$. Daarnaast werden patiëntstalen met beide methoden geanalyseerd. Deming regressie analyse toonde een proportionele bias van 19% tussen beide methoden en verdere analyse met Bland en Altman gaf een gemiddelde overschatting door de FPIA methode in vergelijking met HPLC-MS van 24,4% (**Tabel III.4**) Dit is in overeenstemming met Engelmayer *et al.* (Engelmayer *et al.*, 2005), die een gemiddelde bias van 23,1% aantoonde door FPIA in patiëntstalen in vergelijking met HPLC-MS. Op basis van farmacokinetische studies, vertegenwoordigen de belangrijkste gedemethyleerde metaboliëten <20% van de concentratie aan moedermoleculen met een gerapporteerde kruisreactiviteit van 5-27%. Dus, naast een zekere calibratiebias, is een deel van de geobserveerde overschatting te wijten aan de kruisreactiviteit van de FPIA antilichaam met de circulerende metaboliëten (Salm *et al.*, 2006)

TABEL III.4 : Commercieel beschikbare bepalingmethoden voor everolimus.

| TEST | FIRMA | ANALYSEPRINCIPE | MEETBEREIK ($\mu\text{G/L}$) | AFWIJKING T.O.V. LC- MS/MS (%) |
|---|--------------|--|-----------------------------------|--------------------------------------|
| Innofluor [®] Certican [®] assay (FPIA) on TDx | Seradyn Inc. | fluorescence polarization immunoassay | 2-40* | $\pm 27^*$ |

*Morris *et al.*, 2006

BESLUIT III.8: De referentiemethode voor de bepaling van everolimus in volbloed is HPLC-MS/MS. De commerciële Innofluor[®] Certican[®] assay geeft een analytisch en klinisch belangrijke overschatting van de everolimusconcentratie in volbloed.

UZLeuven

De bepaling van everolimus in volbloed gebeurt volgens aanvraagnummer 5082 op een geachte collegabon. Momenteel worden de volbloedstalen 1x/week (donderdag) doorgestuurd naar Cliniques Universitaires St.Luc, waar de bepaling 1x/week (vrijdag) wordt uitgevoerd a.d.h.v. de Innofluor[®] Certican[®] FPIA. Verdere optimalisatie van de TDx/TDxFix[®] resulteerde in een verlaging van de LLQ tot 1 $\mu\text{g/L}$. Verder vertoont de assay een goede precisie over het gehele meetbereik (CV% bij $\pm 4 \mu\text{g/L} = 12,3\%$, $\pm 12 \mu\text{g/L} = 9,5\%$, $\pm 25 \mu\text{g/L} = 11,6\%$).

De TAT (<6 dagen) die heden ten dage gepaard gaat met de bepaling van everolimus in volbloed bemoeilijkt een efficiënte TDM van het immunosuppressivum post orgaantransplantatie aanzienlijk. Daarom werd er recent in UZLeuven een LC-MS/MS methode ontwikkeld voor de bepaling van everolimus in volbloed, naar voorbeeld van deze gepubliceerd door Salm *et al.* (Salm *et al.*, 2002). Samengevat worden de volbloedstalen (200 μL) voorbehandeld met 800 μL precipitatieoplossing (acetonitril/zinksulfaatoplossing 0,1M (70/30)), met ascomycine als inwendige standaard. Na centrifugatie wordt het extract opgezuiverd op een C₁₈-kolom als vaste drager. Uiteindelijk worden de geëxtraheerde stalen op het LC-MS/MS toestel geplaatst voor de specifieke detectie van everolimus (m/z 975,4 →

908,4). Volbloed calibratoren (1,5 µg/L; 2,5 µg/L; 5µg/L, 10 µg/L; 20 µg/L) zijn ‘inhouse’ bereid o.b.v. spiking met everolimus rechtstreeks verkregen bij Novartis Pharmaceuticals. Het meetbereik (0,5-20 µg/L) werd bepaald o.b.v. de therapeutische range die voor everolimus is vooropgesteld, maar kan eventueel verder verhoogd worden.

De huidig geoptimaliseerde methode vertoont een LLQ (CV≤15%) van 0,75 µg/L en een goede imprecisie over het gehele meetbereik ($\pm 4\mu\text{g/L} = 8,73\%$; $\pm 11\mu\text{g/L} = 4,73\%$; $\pm 20\mu\text{g/L} = 5,57\%$). Passing Bablok analyse toont een lineaire correlatie van de geoptimaliseerde LC-MS/MS methode en de Innofluor[®] Certican[®] immunoassay ($[\text{innofluor}] = 0,977[\text{LC-MS/MS}] + 1,417$), met een constante, positieve bias van 1,029 (95% C.I.=[0,616-1,441]) met de Innofluor[®] Certican[®] immunoassay (cfr. **Bijlage III.7**). Bland Altman analyse toont in het therapeutisch interval een gemiddelde bias van 26,3% met de Innofluor[®] Certican[®] immunoassay t.o.v. LC-MS/MS.

3. Kostenimpact: binnen en buiten het laboratorium

3.1 Kostenimpact inzake immunosuppressieve therapie

Heden ten dage is de kans op transplantoverleving 1 jaar na nier- of harttransplantatie groter dan 80%. Ondanks dit hoge percentage, is de kans op transplantafstoting nog steeds reëel. Transplantafstoting heeft veel gevolgen, enerzijds natuurlijk voor de gezondheid van de patiënt, maar anderzijds creëert het tevens een substantiële economische bijdrage van de maatschappij. De kost voor de behandeling van een episode van acute afstoting bij niertransplantpatiënten wordt geschat op US \$15.000 tot US \$18.000 (Homes *et al.*, 2004). Daarom is het belangrijk dat de meest succesvolle immunosuppressieve therapie voor de preventie van transplantafstoting wordt toegepast (Mabasa *et al.*, 2005).

Eisen *et al.* publiceerden in 2005 een vergelijkende studie naar de economische aspecten van het gebruik van everolimus in vergelijking met AZA bij *de novo* harttransplant patiënten. De globale incidentie van MACE (Major adverse cardiac events) na 4 jaar behandeling was hoger met AZA dan met om het even welke dosis van everolimus (**Bijlage III.5**). Voor de berekening van de behandelingskosten voor MACE, werd gebruik gemaakt van de gemiddelde hospitalisatiekosten verkregen van de US Healthcare Cost and Utilization Project; deze kosten varieerden van US \$70.618 voor een CABG tot US \$20.600 voor congestief hartfalen. In het algemeen werden de totale behandelingskosten t.g.v. MACE in de AZA-groep geschat op US \$431.428 en op US \$136.664 voor de everolimus 1,5mg/dag-groep en US \$191.957 voor de everolimus 3,0 mg/dag groep (**Bijlage III.6**) hetgeen een belangrijke economische besparing met zich meebrengt (Eisen *et al.*, 2005).

3.2 Kostenimpact TDM

De Innofluor Certican assay is realitief dure assay: de totaalsom voor kit van 150 testen bedraagt 1.438€, naast de nodige calibrator (314€) en controles (314€). Een inschatting van de kostprijs, uitgaande van de huidige Tac-bepaling, bedraagt 12,7€/test. De firma schrijft voor om elk patiëntenstaal in duplo te bepalen, hetgeen de kostprijs/test verhoogt tot 18,0€.

Een ruwe inschatting van de kostprijs van de everolimusbepaling op LC-MS/MS, uitgaande van de huidige SRL-bepaling, bedraagt 15,5€/test.

De test is beschreven in de nomenclatuur onder nummers 548413/548424 en het bijhorend honorarium bedraagt 17,2€ (B600). Momenteel wordt de test in onderaanneming uitgevoerd aan de UCL in Brussel.

4. Decision making

Talrijke studies tonen de goede correlatie tussen de C₀-waarden en de farmacologische respons. Toxiciteit t.g.v. everolimus zoals thrombocytopenie, hypercholesterolemie, hypertriglyceridemie kan gemonitord worden a.d.h.v. de traditionele laboratoriumanalyses.

Daarnaast verschaft TDM de clinicus extra informatie, nl. de patiënt loopt immers een hoger risico op toxiciteit indien zijn of haar C_0 -waarden te hoog is. Gelijkaardig wordt de clinicus gewaarschuwd door een subtherapeutische concentratie, aangezien deze de patiënt blootstelt aan een verhoogd risico op transplantafstoting. De klinische vaststelling van transplantafstoting is meestal vertraagd t.g.v. de aspecifieke presentatie. Daarenboven wordt de diagnose enkel bevestigd indien biopsie wordt uitgeoefend. TDM laat de clinicus toe zijn therapie te monitoren o.b.v. een surrogaat merker, hetgeen de kans op een negatieve uitkomst vermindert. Tenslotte is de controle van everolimus C_0 -waarden tijdens de behandeling aanbevolen o.w.v. de mogelijke fluctuaties in geneesmiddelconcentratie (cfr. co-medicatie) t.g.v. intraindividuele farmacokinetische variabiliteit en het opvolgen van therapietrouw (Mabasa *et al.*, 2005).

BESLUIT III.9: TDM vormt vaak het eerste signaal voor de clinicus bij de typisch aspecifieke klinische presentatie van een transplantafstoting.

COMMENTS

Overzicht van TDM van immunosuppressiva in perifere ziekenhuizen:

| | CYCLOSPORINE | TACROLIMUS | SIROLIMUS | EVEROLIMUS | MPA |
|-----------------------|----------------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| HH ROESELAEERE | TDx FPIA 1x/dag | IMx Tacro 2x/week | UZLeuven | UZGent | UZLeuven |
| OLVZ AALST | RIA CycloTrac 1x/dag | IMx Tacro 3x/week | UZLeuven | TDx FPIA 2x/week | UZLeuven |
| AZ BRUGGE | LC-MS/MS 1x/dag | LC-MS/MS 1x/dag | UCL | UCL | UZLeuven |
| VJZ HASSELT | LC-MS/MS 1x/dag | LC-MS/MS 3x/week | LC-MS/MS 1x/week | UZGent | LC-MS/MS 1x/week |
| ZOL GENK | Dimension ACMIA 2x/week | UZLeuven | UZLeuven | UCL | UZLeuven |
| IZ BONHEIDEN | UZLeuven | UZLeuven | UZLeuven | / | / |

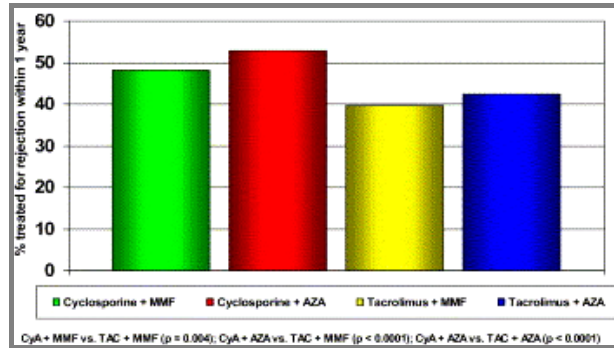
TO DO/ACTIONS

- 1) Overleg met clinici inzake C_2 -monitoring + eventueel invoeren specifieke dilutiekit.
- 2) Evaluatie Tacrolimus immunoassay op Dimension[®].
- 3) Overleg tussen clinici en LAG inzake het invoeren van de everolimusbepaling in volbloed in de routinepraktijk van LAG UZLeuven. Implementatie van de test vereist verder: vervolledigen 'Checklist 204', opstellen van SOP, toevoegen van de bepaling aan de aanvraagbon 3012, wijzigingen op intranet en rondschrijven naar perifere ziekenhuizen.

ATTACHMENTS

Bijlage I.1

FIG. I.1: % recipiënten behandeld voor reëctie/ 1^{ste} jaar post longtransplantatie 200-2004 (Adapted from Trulock *et al.*, 2006)



Bijlage I.2

FIG. I.2: Onderhoudstherapie 1 en 5 jaar posttransplant bij volwassen harttransplantpatiënten 2000-2004 (Adapted from Taylor *et al.*, 2006)

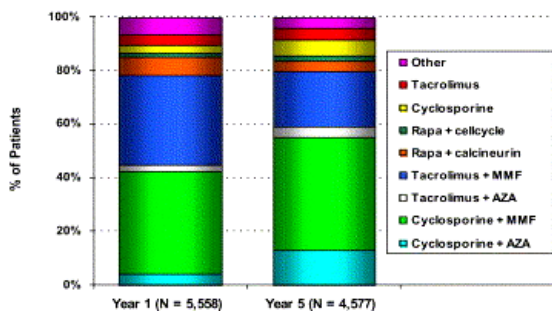
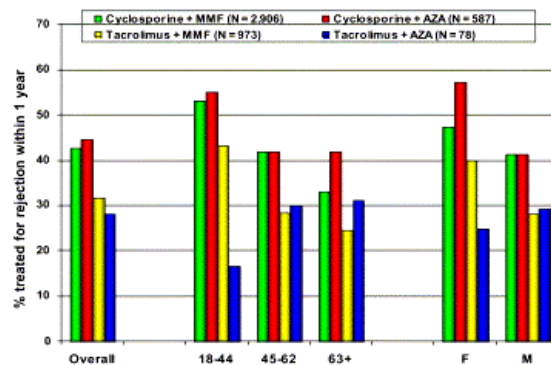
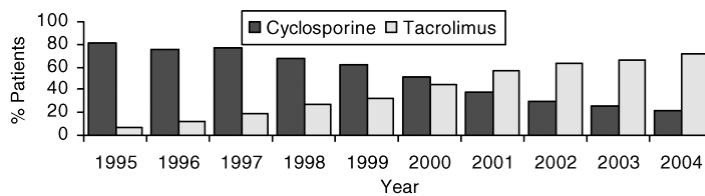


FIG. I.3: % reëcties 1 jaar post harttransplantatie i.f.v. onderhoudstherapie 2000-2004 (Adapted from Taylor *et al.*, 2006)



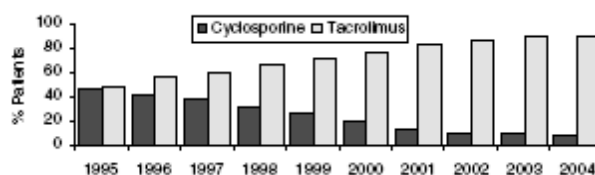
Bijlage I.3

FIG. I.4: Onderhoudstherapie voor ontslag uit het ziekenhuis na niertransplantatie, 1995-2004 (Adapted from Meier-Kriesche *et al.*, 2006)



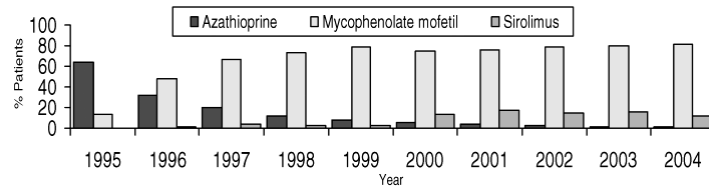
Bijlage I.4

FIG. I.5: Onderhoudstherapie voor ontslag uit het ziekenhuis na levertransplantatie, 1995-2004 (Adapted from Meier-Kriesche *et al.*, 2006).



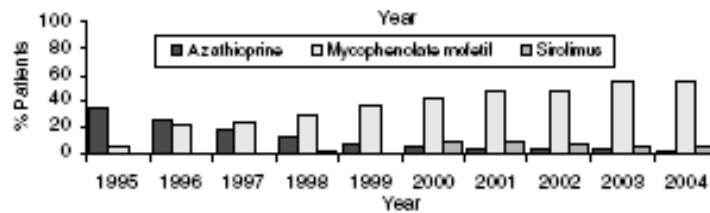
Bijlage I.5

FIG. I.6: Onderhoudstherapie voor ontslag uit het ziekenhuis na niertransplantatie, 1995–2004 (Adapted from Meier-Kriesche *et al.*, 2006).



Bijlage I.6

FIG. I.7: Onderhoudstherapie voor ontslag uit het ziekenhuis na levertransplantatie, 1995–2004 (Adapted from Meier-Kriesche *et al.*, 2006).



Bijlage I.7

FIG. I.8: % aanvragen TDM immunosuppressiva in UZLeuven afkomstig van LTx+Pne (8/2005-8/2006)

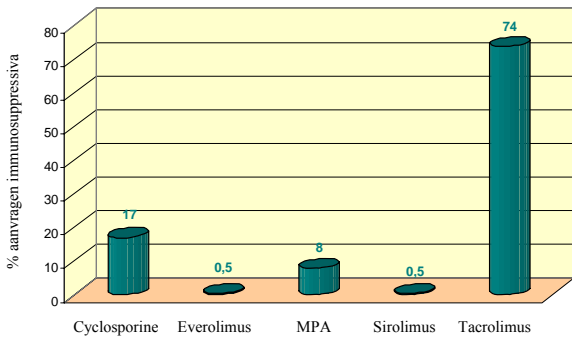


FIG. I.9: % aanvragen TDM immunosuppressiva UZLeuven afkomstig van HTx (8/2005-8/2006)

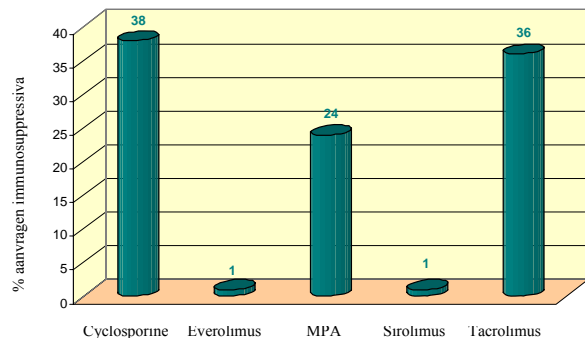


FIG. I.10: % aanvragen TDM immunosuppressiva in UZLeuven afkomstig van NEF (8/2005-8/2006)

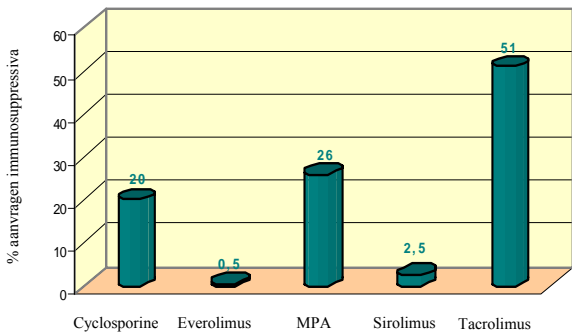
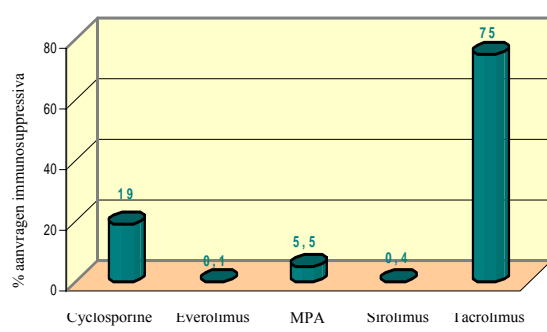


FIG. I.11: % aanvragen TDM immunosuppressiva UZLeuven afkomstig van HEP (8/2005-8/2006)



Bijlage II.1

TABEL: Huidige analysemethoden in UZLeuven i.k.v. TDM van immunosuppressiva

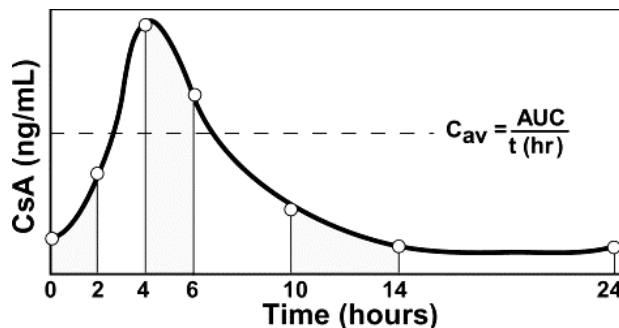
| | ANALYSE | ANALYTISCH MEETBEREIK | CV | STAAL | UITVOER-FREQ. | TAT |
|-------------------|-----------------------------------|------------------------|--|---|----------------|------|
| CYCLOSPORINE | Dimension ACMIA | 25-500 µg/L | L(10%) H(10%) | EDTA volbloed; C ₀ , C ₂ | Elke dag | <12h |
| TACROLIMUS | IMx Tacrolimus (IMx) | 1,5-30 µg/L | L(20,2%) M(15,7%) H(12,6%) | EDTA volbloed; C ₀ | Elke dag | <1d |
| SIROLIMUS | LC-MS/MS | 1,4-40 µg/L | L(10%) M(7,0%) H(7,0%) | EDTA volbloed; C ₀ | Elke werkdag | <3d |
| MPA | LC-MS/MS | 0,12-20 mg/L | L(10%) M(7,5%) H(9,0%) | plasma; C ₀ | 2x/week* | <5d |
| EVEROLIMUS (<UCL) | Innofluor® Certican® assay on TDx | 2-40 µg/L ⁰ | L(12,3%) ⁰ M(9,5%) ⁰ H(11,6%) ⁰ | EDTA volbloed; C ₀ | 1x/week (<UCL) | <6d |

* in procedureboek: 2x/week ↔ praktijk: elke dag

⁰ SALM P. *et al.* Evaluation of a FPIA for whole blood everolimus determination in renal transplant recipients. *Clinical Biochemistry* 2006; 39: 732-738. (OPM: Prof. Wallemacq: 1-50 µg/L; CV= 5-15%; LOQ: 1 µg/L)

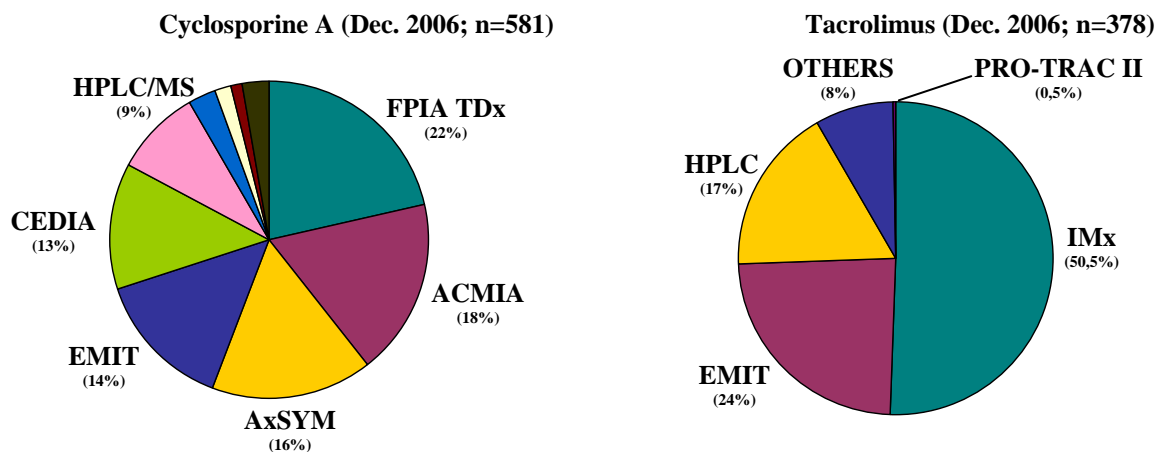
Bijlage II.2

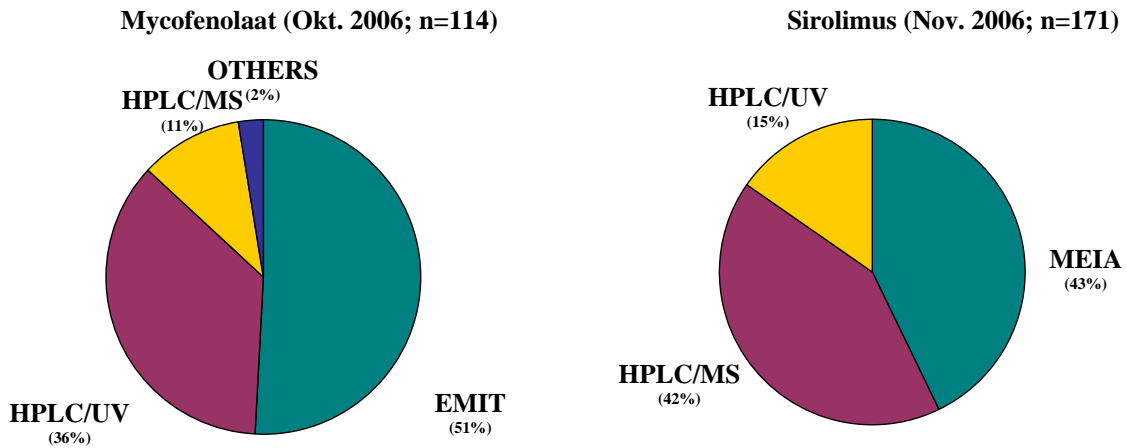
FIG. II.1: Farmacokinetische profilering: berekening van de gemiddelde cyclosporine A concentratie (C_{av}) (Kahan, 2004).



Bijlage II.3

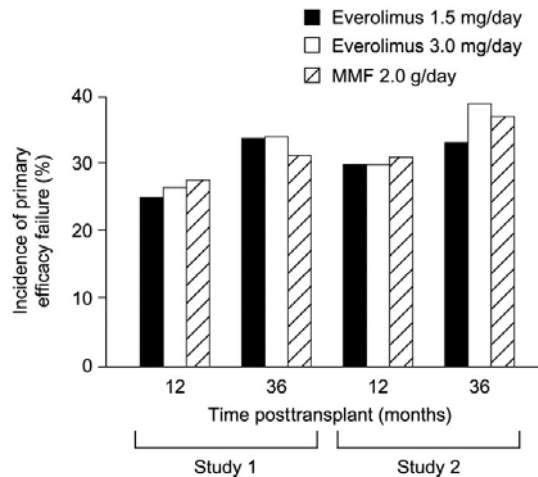
FIG. II.2: Analysemethoden gebruikt i.k.v. TDM van immunosuppressiva in ‘Immunosuppressive Drugs International Proficiency Testing Scheme’ (<http://www.bioanalytics.co.uk/>).





Bijlage III.1

FIG. III.1: Vergelijkbare incidentie van primair efficaciteit falen na 12 en 36 maanden in *de novo* niertransplantatie met everolimus in vergelijking met volledige standaarddosis cyclosporine A vs. mycophenolaat + volledige standaarddosis cyclosporine A (Lorber *et al.*, 2005; Oppenheimer *et al.*, 2003).



Bijlage III.2

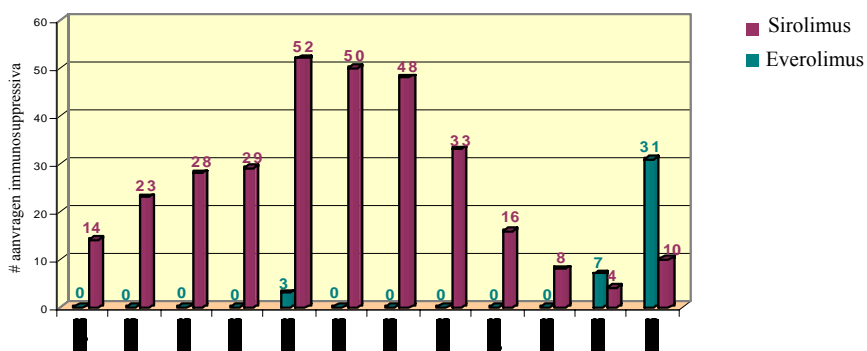
TABEL III.2: Parameters van allograft vasculopathie bepaald o.b.v. intravasculaire ultrasonografie (IVUS) na 24 maanden behandeling met everolimus of azathioprine (adapted from Eisen *et al.*, 2006)

| IVUS measurement: change from baseline | Everolimus 1.5 mg/day (n = 45/209) | Everolimus 3.0 mg/day (n = 44/211) | Azathioprine (n = 60/214) |
|--|------------------------------------|------------------------------------|---------------------------|
| Maximum intimal thickness (mm) | 0.07* | 0.06** | 0.15 |
| Intimal area (mm ²) | 0.79** | 0.83** | 1.52 |
| Intimal volume (mm ³) | 13.21 | 12.54** | 20.25 |
| Incidence of vasculopathy (%) | 33.3* | 45.5 | 58.3 |

*P < 0.05 vs azathioprine; **P < 0.01 vs azathioprine.

Bijlage III.3

FIG. III.2: Grafiek: # aanvragen sirolimus versus everolimus afkomstig van NEF (8/2005-8/2006)



Bijlage III.4

TABEL III.3: Associatie van everolimus C_0 -waarden en farmacologische respons: nut van TDM (adapted from Lorber *et al.*, 2005).

| | Everolimus C_{min} | | | MMF | |
|---------------------------------------|----------------------|----------|-----------|------|----------|
| | All patients | <3 ng/mL | 3–8 ng/mL | | ≥8 ng/mL |
| Efficacy | | | | | |
| BPAR (%) | 21.7 | 45.3 | 16.8 | 8.4 | 24.2 |
| Graft loss (%) | 7.3 | 20.3 | 4.4 | 2.8 | 7.7 |
| Safety | | | | | |
| Thrombocytopenia ^a (%) | 5.0 | 5.5 | 4.0 | 6.6 | 3.1 |
| Hypertriglyceridemia ^b (%) | 21.6 | 18.2 | 21.2 | 26.7 | 10.7 |
| Hypercholesterolemia ^c (%) | 82.7 | 78.9 | 84.9 | 83.8 | 68.6 |

C_{min} , trough concentration; MMF, mycophenolate mofetil; BPAR, biopsy-proven acute rejection.

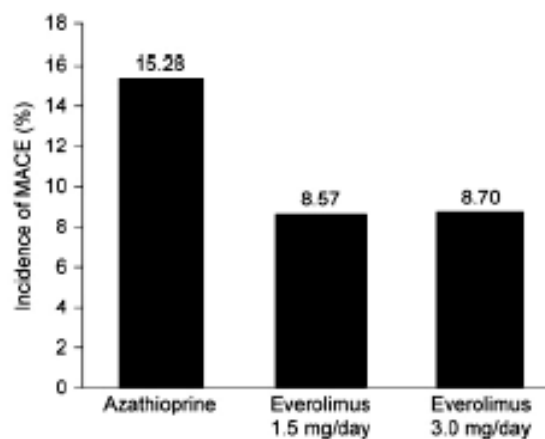
^a Platelet count $\leq 75 \times 10^9/L$.

^b Triglycerides ≥ 5.6 mmol/L (495.6 mg/dL).

^c Cholesterol ≥ 6.2 mmol/L (239.4 mg/dL).

Bijlage III.5

FIG. III.3: Incidentie aan MACE na 4 jaar behandeling van harttransplantatiepatiënten met azathioprine of everolimus in combinatie met cyclosporine A en steroïden (adapted from Eisen *et al.*, 2006).

**Bijlage III.6**

TABEL III.5: Geschatte hospitalisatiekosten t.g.v. MACE na 4 jaar behandeling van harttransplantatie- patiënten onder azathioprine of everolimus in combinatie met cyclosporine en steroïden (adapted from Eisen *et al.*, 2006).

| | Everolimus 1.5 mg/day | Everolimus 3.0 mg/day | Azathioprine |
|----------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------|
| MACE | | | |
| 1 CHF = \$20 600 | 4 | 3 | 6 |
| 1 PCI = \$34 075 | 0 | 1 | 6 |
| 1 CVA = \$24 557 | 1 | 0 | 3 |
| 1 AMI = \$36 668 | 0 | 1 | 0 |
| 1 PVD = \$29 707 | 1 | 2 | 1 |
| Total MACE | 6 | 7 | 16 |
| Total hospitalization cost | \$136 664 | \$191 957 | \$431 428 |
| Everolimus vs azathioprine | -68.30% | -55.50% | |

AMI, acute myocardial infarction; CHF, congestive heart failure; CVA, cerebrovascular accident; MACE, major cardiac adverse events; PCI, percutaneous coronary intervention; PVD, peripheral vascular disease.

Bijlage III.7

FIG. III.4: Passing Bablok analyse van de geoptimaliseerde LC-MS/MS methode en de Innofluor® Certican® immunoassay (n=22).

| | Coefficient | 95% CI | |
|------------------|--------------------|---------------|----------|
| Intercept | 1,417 | 0,046 | to 2,019 |
| Slope | 0,977 | 0,852 | to 1,169 |

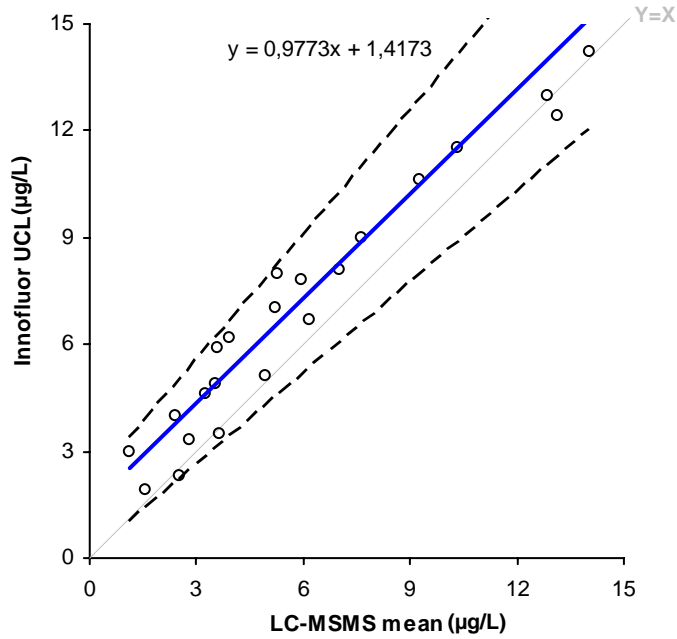


FIG. III.5: Bland Altman analyse van de geoptimaliseerde LC-MS/MS methode en de Innofluor® Certican® immunoassay (n=22).

| | Mean bias |
|-------------------|------------------|
| [3-8] µg/L | 26,3% |

