

Thiopurines in Inflammatory Bowel Diseases : New perspectives to optimise safety and efficacy

Citation for published version (APA):

Wong, D. R. (2015). *Thiopurines in Inflammatory Bowel Diseases : New perspectives to optimise safety and efficacy*. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20150109dw>

Document status and date:

Published: 01/01/2015

DOI:

[10.26481/dis.20150109dw](https://doi.org/10.26481/dis.20150109dw)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Summary

The thiopurine analogues azathioprine (AZA) and mercaptopurine (6MP) are frequently used immunosuppressive drugs to treat the chronic inflammatory bowel diseases (IBD) Crohn's disease (CD), ulcerative colitis (UC) and indeterminate colitis. Thiopurines are the mainstay of conventional IBD therapy and have proven efficacy for both induction and maintenance of remission. Furthermore, they act as steroid-sparing agents by reducing the need of corticosteroids. The onset of action is usually slow (8-16 weeks), which make them unsuitable for fast induction therapy in case of a flare of disease.

Unfortunately, thiopurines are not effective in up to one-third of the patients, and up to one-fourth discontinue therapy due to intolerable adverse reactions.

The development of adverse reactions and toxicity has been related to specific active thiopurine metabolites, of which the 6-thioguanine nucleotides (6-TGN) and 6-methylmercaptopurine ribonucleotides (6-MMPR) are considered to be the most important.

The 6-TGN metabolites are related to the immunosuppressive effects, whereas highly elevated concentrations are associated with the development of myelotoxicity. Elevations of 6-MMPR metabolites are mainly associated with hepatotoxicity and treatment failure.

However, new insights obtained by pharmacogenetics in thiopurine metabolism and assessment of 6-TGN and 6-MMPR metabolites in patients on thiopurine therapy have led to strategies to reduce toxicity and optimise efficacy and safety in IBD.

The objective of this thesis was to design and evaluate new ways to improve efficacy and safety of thiopurine therapy in patients with IBD.

Knowledge of the activity of the most important metabolic enzymes involved in thiopurine metabolism may be helpful to explain or predict therapeutic response and toxicity.

In **Part I**, the pharmacogenetics of thiopurine metabolism are evaluated.

Chapter 2 provided an 'in-depth' review on pharmacogenetics of thiopurine metabolism. Several polymorphisms of genes encoding for the enzymes involved in thiopurine metabolism are reviewed and the clinical implications in IBD are discussed. Although knowledge in this field is rapidly increasing, the translation into practical guidelines requires much effort and additional prospective clinical studies are needed to elucidate the relevance in clinical practice.

One of the most extensively investigated enzymes involving thiopurine metabolism is thiopurine S-methyltransferase (TPMT). TPMT enzyme activity is related to genetic variants of the *TPMT* gene. Individuals carrying variant alleles show reduced TPMT

enzyme activity, and once treated with a standard thiopurine dose high myelotoxic 6-TGN levels will be formed at the expense of the 6-MMPR metabolite formation resulting in a highly increased risk of leukopenia. In **Chapter 3** we evaluated in a multicentre randomised-controlled trial (TOPIC, n=769) whether prior to thiopurine treatment TPMT genotype-guided dosing reduced the risk of leukopenia in IBD patients starting thiopurine therapy. Compared to the control group, TPMT genotype-based dosing resulted in a significant reduction of leukopenia in patients carrying a *TPMT* variant (*2, *3A or *3C) in the intervention group (22.9% versus 2.6%, relative risk 0.11 (95%CI: 0.01-0.85), without impeding treatment efficacy. Unfortunately, we could not demonstrate a leukopenia risk reduction when evaluating all patients of the intervention and control group. The finding indicates that the TPMT genotype cannot explain all cases of leukopenia, which is in accordance with previous reports. Thiopurine-induced leukopenia must therefore also be attributed to other factors than a diminished TPMT enzyme activity, which should be elucidated in future prospective studies.

Chapter 4 described the case of a female patient with chronic autoimmune pancreatitis treated with high-dose azathioprine who was not able to form detectable thiopurine metabolites due to hyperactivity of the catabolic enzyme xanthine oxidase. This case clearly demonstrates the relevance of xanthine oxidase in the biotransformation of thiopurines.

In **Part II**, the clinical relevance of thiopurine metabolite assessment is discussed in relation to the therapeutic efficacy and safety.

In **Chapter 5**, the usefulness of therapeutic drug monitoring (*TDM*) was evaluated in patients on thiopurine maintenance therapy. A prospective cross-sectional study was performed in adult IBD patients on thiopurine maintenance therapy comparing the thiopurine metabolite concentrations in patients with a flare of disease (n=41) with those of patients in remission (n=59). The median 6-TGN levels were not significantly different between the exacerbation and remission group. The previously reported therapeutic threshold of 6-TGN was confirmed to be $\sim 235 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ in adult IBD patients, although sensitivity and specificity were rather poor. Compliant patients with steady-state 6-TGN concentrations above the therapeutic threshold were approximately 4 times more likely to have quiescent disease. Another important finding was that approximately one in six patients showed non-compliance of thiopurine therapy. These data support the role of TDM in thiopurine maintenance therapy in IBD to reveal non-compliance or underdosing, and can be used as a practical tool to optimise thiopurine therapy, especially in case of thiopurine non-response.

Leukopenia is a potentially lethal adverse reaction of thiopurine treatment, which has mainly been attributed to highly elevated 6-TGN steady-state concentrations.

Thiopurine-induced leukopenia occurs in 2-5% of the patients, most frequently during the first weeks to months of treatment. Since steady-state thiopurine metabolite concentrations are generally reached after four to eight weeks of treatment, we evaluated whether early assessed thiopurine metabolites predict the development of leukopenia. **Chapter 6** described the prospective study on the predictive value of 6-TGN and 6-MMPR metabolites, assessed one week after initiation (*T1*), for the development of leukopenia during the first 8 weeks of treatment in a subset of IBD patients of the TOPIC trial starting thiopurine therapy. We evaluated the *T1* metabolite concentrations of 6-TGN and 6-MMPR in patients with and without leukopenia ($n=32$ and $n=162$, respectively). In order to predict the development of leukopenia, *T1* threshold concentrations of $213 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ red blood cells (RBC) for 6-TGN and $3,525 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ RBC for 6-MMPR were defined: patients exceeding these values were at increased leukopenia risk (OR 6.2 (95%CI: 2.8-13.8) and 5.9 (95%CI: 2.7-13.3), respectively). In addition, leukopenia rates appeared to be higher in patients treated with 6MP, compared to AZA (OR 7.3 (95%CI: 3.1-17.0)), and in patients on concurrent anti-TNF therapy (OR 5.1 (95%CI: 1.6-16.4)). Based on logistic regression analysis of the threshold concentrations, thiopurine type and concurrent anti-TNF therapy, we developed a predictive algorithm (AUC=0.84): elevations of both 6-TGN and 6-MMPR at *T1* resulted in the highest risk for leukopenia, followed by exceeding only the *T1* 6-MMPR or 6-TGN threshold concentration. Patients concurrently treated with anti-TNF therapy with elevations of both 6-TGN and 6-MMPR *T1* concentrations were at highest risk to develop leukopenia.

In this prospective study we showed for the first time that elevated 6-TGN and 6-MMPR metabolite levels at week 1 are both highly predictive for thiopurine-induced leukopenia during the first 8 weeks of treatment in IBD patients. Based on different combinations of the four independent determinants, patients can be classified by using this predictive algorithm to assess the degree of risk for the development of leukopenia.

Up to one-fourth of IBD patients discontinue thiopurine medication within the first months after initiation due to intolerable adverse events. *Hepatotoxicity*, *gastrointestinal complaints* and *general malaise* are the most common thiopurine limiting adverse reactions, which have been related to high 6-MMPR metabolite concentrations. **Chapter 7** described a prospective study performed in 270 IBD patients starting thiopurine therapy evaluating the predictive value of the 6-MMPR metabolite concentration, assessed one week after initiation (*T1*), for the development of hepatotoxicity, gastrointestinal complaints and general malaise during the first 20 weeks of treatment. Seventeen per cent of the patients developed hepatotoxicity. The 6-MMPR metabolites assessed at week one were associated with thiopurine-induced hepatotoxicity during the first 20 weeks of treatment. Patients with 6-MMPR concentrations exceeding the defined predictive *T1* threshold of $3,615 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ RBC were approximately 4 times more at risk of hepatotoxicity during the first 20 weeks of

treatment. 6-MMPR concentrations above the threshold correlated with gastrointestinal complaints (i.e. nausea, vomiting and anorexia; OR 2.4 (95%CI: 1.4-4.3)) and general malaise (OR 2.0 (95%CI: 1.1-3.7)). The discriminative value of 6-MMPR for these adverse events was rather poor. However, thiopurine-induced hepatotoxicity was independently correlated with the male gender, higher age, body weight and body mass index (BMI). Age and BMI demonstrated the best discriminative values to predict hepatotoxicity in patients starting thiopurine therapy.

A predictive algorithm was developed based on the relevant determinants age, gender, BMI and the 6-MMPR threshold to assess the risk for thiopurine-induced hepatotoxicity (AUC=0.83). Males, irrespective of age, with a BMI > 25 kg/m² and T1 6-MMPR concentrations exceeding the defined threshold of 3,615 pmol/8x10⁸ RBC, appeared to be at highest risk and all developed hepatotoxicity. Females meeting these criteria were then at highly increased risk of hepatotoxicity, followed by males or females older than 50 years with a BMI > 25 kg/m² with T1 6-MMPR concentrations below the defined threshold.

In this prospective study we showed that assessment of the 6-MMPR concentration one week after initiation identifies patients at risk for thiopurine-induced hepatotoxicity, gastrointestinal complaints and general malaise and can be helpful to optimise thiopurine treatment in IBD. We developed a predictive algorithm for thiopurine-induced hepatotoxicity with good accuracy, based on 6-MMPR metabolite concentrations assessed at week one, and the relevant patient characteristics age, gender and BMI.

In **Chapter 8**, the case of a patient with Crohn's disease was described who developed severe pancytopenia on a 50 mg 6MP dose due to a high myelotoxic 6-TGN metabolite concentration, resulting from complete TPMT enzyme deficiency. We demonstrated how this patient successfully was treated with a low dose of 6-thioguanine (6TG), an alternative thiopurine drug. The 6TG dose was adjusted and optimised by using frequent 6-TGN metabolite measurements eventually resulting to a 6TG maintenance dose of 20 mg every two weeks.

In **Part III**, the clinical relevance of some pharmacokinetic interactions in thiopurine metabolism were described.

Previous studies indicated that 5-aminosalicylates (5-ASA) may influence the metabolism of thiopurines. In **Chapter 9**, we described the prospective pharmacokinetic study on the influence of 5-ASA (Pentasa® granules, sachets) on 6-TGN and 6-MMPR formation in 26 IBD patients during steady-state AZA or 6MP maintenance therapy. We observed a dose-dependent increase of the 6-TGN concentrations after starting concurrent 5-ASA therapy. Concomitant use of 2 g 5-ASA daily for four weeks resulted in a 40% increase of the median 6-TGN concentration, whereas addition of a daily dose of 4 g 5-ASA led to a 70% increase compared to

baseline. Overall, the 6-MMPR concentrations were not affected, which suggests that the TPMT enzyme activity was not influenced by 5-ASA or its metabolites *in vivo*. Signs of myelotoxicity were observed in 8% of the patients, which points to an increased risk of myelosuppression resulting from combination therapy.

The level of the pharmacologically active 6-TGN significantly increases in a dose-dependent manner during 5-ASA coadministration. IBD patients who are unresponsive or refractory to standard thiopurine therapy due to suboptimal 6-TGN levels may benefit from the coadministration of 5-ASA.

The 6-thioguanine nucleotides consist of three different phosphorylated metabolites, namely 6-thioguanine monophosphate (6-TGMP), 6-thioguanine diphosphate (6-TGDP) and 6-thioguanine triphosphate (6-TGTP). 6-TGTP, in particular, is considered to contribute to the immunosuppressive effects of the thiopurine drugs by inhibiting the function of the small GTPase Rac1 in activated lymphocytes leading to T-cell apoptosis. In chapter 9 a dose-dependent effect of 5-ASA on total 6-TGN metabolite formation was shown. In **Chapter 10**, the influence of 5-ASA (Pentasa® granules, sachets) on the individual 6-thioguanine phosphate metabolite concentrations was evaluated in a subcohort of these patients (n=17). We observed that coadministration of 5-ASA 2 g daily for a period of 4 weeks in patients on steady-state AZA therapy induced an increase in median 6-TGDP, 6-TGTP and total 6-TGN levels. A subsequent dose-escalation of the 5-ASA dosage to 4 g daily showed no further elevation of the individual 6-TGN levels in RBC, but unexpectedly a reduction in total 6-MMPR levels was observed. Elevation of total 6-TGN levels was caused by an increase of both 6-TGTP and 6-TGDP metabolite levels; 6-TGTP remained the main metabolite within the total pool of 6-TGN (approximately 85% of total 6-TGN).

IBD patients unresponsive or refractory to standard thiopurine therapy may benefit from the coadministration of 5-ASA, leading to an increase of the pharmacologically active 6-TGN (i.e. 6-TGTP), and thereby stable or even a decrease of cytotoxic 6-MMPR metabolite levels.

Infliximab is a monoclonal antibody against the pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor- α (TNF- α), and has been shown good efficacy in induction and maintenance of remission in IBD. Previously a drug interaction between azathioprine and infliximab has been reported. **Chapter 11** describes the pharmacokinetic influence of the anti-TNF agent adalimumab on thiopurine metabolism in twelve Crohn's disease patients on AZA or 6MP maintenance therapy. During the follow-up period of 12 weeks the 6-TGN and 6-MMPR metabolite concentrations did not significantly change compared to baseline. The activity of three important enzymes involving thiopurine metabolism, thiopurine S-methyltransferase, inosine-triphosphate pyrophosphatase and hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, did not change either after 4 weeks of adalimumab treatment. Two patients (17%) showed clinically relevant myelotoxicity within 2–4 weeks on combination therapy. Remarkably, at baseline and

throughout the whole study period in almost two-third of the patients subtherapeutic 6-TGN concentrations were found, suggesting suboptimal thiopurine dosing.

The prospective interaction study in Crohn's disease patients did not provide evidence for a pharmacokinetic interaction between adalimumab and the conventional thiopurines AZA and 6MP.

Chapter 12 provides a general discussion of the implications of the results presented in this thesis in relation to the current literature, daily clinical practice and in perspective to future research.

Based on the most important findings of this thesis and the current literature, clinical recommendations, considerations and future perspectives are presented in **Chapter 13**.

Samenvatting

Samenvatting

De thiopurines azathioprine (AZA) en mercaptopurine (6MP) worden veelvuldig toegepast als immunosuppressiva bij de behandeling van de inflammatoire darmziekten (IBD), de ziekte van Crohn, colitis ulcerosa en niet-classificeerbare colitis. De effectiviteit van thiopurines voor inductie en handhaven van remissie is in klinische studies aangetoond. Bovendien werken ze corticosteroïdsparend. Thiopurines vormen daarmee een belangrijke pijler bij de behandeling van IBD. Het effect treedt echter langzaam op (veelal na ongeveer 8-16 weken), waardoor ze ongeschikt zijn voor een snelle inductietherapie in het geval van opvlamming van ziekte.

Helaas zijn thiopurines in de klinische praktijk bij ongeveer een derde van de patiënten onvoldoende effectief en een kwart stopt de behandeling wegens onverdraaglijke bijwerkingen.

De bijwerkingen en toxische effecten zijn gerelateerd aan specifieke actieve thiopurine metabolieten, waarvan de 6-thioguanine nucleotiden (6-TGN) en 6-methyl-mercaptopurine ribonucleotiden (6-MMPR) als meest relevant worden beschouwd.

De immunosuppressieve effecten worden voornamelijk toegeschreven aan de 6-TGN, maar te hoge 6-TGN concentraties zijn geassocieerd met myelotoxiciteit. Verhoogde concentraties van de 6-MMPR metabolieten zijn voornamelijk geassocieerd met levertoxiciteit en het falen van de behandeling.

Nieuwe inzichten in de farmacogenetica van het thiopurine metabolisme en het meten van de 6-TGN en 6-MMPR metabolietconcentraties in het bloed hebben geleid tot de ontwikkeling van nieuwe strategieën ter optimalisatie van de thiopurine therapie bij IBD.

In het onderzoek dat in het kader van dit proefschrift is uitgevoerd, werden nieuwe strategieën onderzocht ter verbetering van de effectiviteit en veiligheid van de thiopurine behandeling bij patiënten met IBD.

Inzicht met betrekking tot de activiteit van de relevante enzymen die betrokken zijn bij het thiopurine metabolisme kan nuttig zijn om het therapeutische effect en/of toxiciteit van thiopurines te verklaren, dan wel te voorspellen.

In **Deel I** wordt de farmacogenetica van het thiopurine metabolisme geëvalueerd.

Hoofdstuk 2 is een 'in-depth' review over de farmacogenetica van het thiopurine metabolisme bij IBD. Verscheidene polymorfismen van genen die coderen voor enzymen die betrokken zijn in het thiopurine metabolisme worden besproken. Tevens komt de klinische betekenis ervan aan de orde.

Hoewel de kennis op dit gebied de laatste jaren enorm is toegenomen, is de vertaling naar praktische richtlijnen echter nog moeilijk te realiseren. Er is een grote behoefte

aan prospectieve klinische studies om de relevantie in de klinische praktijk nader te bepalen.

Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) is een van de meest onderzochte enzymen betrokken bij het thiopurine metabolisme. De TPMT enzymactiviteit is sterk gerelateerd aan de interindividuele genetische variatie van het *TPMT* gen. Individuen met één of twee variant allelen hebben een (sterk) verlaagde TPMT enzymactiviteit, resulterend in hogere 6-TGN concentraties en daarmee een verhoogd risico op het ontwikkelen van een leukopenie wanneer ze met een standaard thiopurine dosering worden behandeld. In de studie beschreven in **Hoofdstuk 3** werd in een gerandomiseerd gecontroleerd multicenter onderzoek (TOPIC, n=769) onderzocht of een op het TPMT genotype-gebaseerde dosering tot een reductie van het optreden van leukopenie leidt bij IBD patiënten die starten met een thiopurine behandeling.

Vergeleken met de controle groep resulteerde een op TPMT genotype-gebaseerde dosering in een significante reductie van leukopenie in patiënten met een TPMT variant allel (*2, *3A or *3C) in de interventie groep (22,9% versus 2,6%, relatief risico 0,11 (95%CI: 0,01-0,85). Er werd geen risicoreductie van leukopenie gezien wanneer alle patiënten van de interventie en controle groep werden geëvalueerd.

In deze grote prospectieve studie is aangetoond dat een op TPMT genotype-gebaseerde dosering leidt tot een significante reductie van het optreden van leukopenie bij patiënten met een TPMT variant allel. Het blijkt echter dat het TPMT genotype niet alle gevallen van leukopenie kan verklaren, wat ook uit eerder onderzoek is gebleken. Thiopurine-geïnduceerde leukopenie zal daarom naast een verlaagde TPMT enzymactiviteit ook moeten worden toegeschreven aan andere factoren, die in toekomstig onderzoek nader zullen moeten worden onderzocht.

Hoofdstuk 4 beschrijft de casus van een vrouw met chronische auto-immuun pancreatitis bij wie, ondanks een hoge azathioprine dosering, geen actieve thiopurine metabolieten werden gemeten als gevolg van een sterk verhoogde activiteit van het katabole enzym xanthine oxidase.

De casus benadrukt de relevantie van xanthine oxidase in de biotransformatie van thiopurines.

In **Deel II** worden de resultaten van het onderzoek naar de klinische relevantie van het meten van thiopurine metaboliet concentraties besproken.

In een prospectieve cross-sectionele studie beschreven in **Hoofdstuk 5** werd het nut van therapeutic drug monitoring (TDM) onderzocht bij volwassen patiënten met een thiopurine onderhoudsbehandeling. De actieve thiopurine metabolieten van 41 patiënten met een opvlamming van IBD werden vergeleken met die van 59 patiënten in remissie.

De mediane 6-TGN concentraties in beide patiëntengroepen verschilden niet statistisch significant van elkaar. De eerder gerapporteerde therapeutische 6-TGN drempelwaarde van $\sim 235 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ werd bevestigd. De sensitiviteit en specificiteit waren echter matig. Therapietrouwe patiënten met 6-TGN steady-state concentraties boven deze therapeutische drempelwaarde hadden ongeveer vier maal zoveel kans op een remissie ten opzichte van patiënten met een 6-TGN concentratie onder deze drempelwaarde. Een tweede belangrijke bevinding van deze studie was dat één op de zes patiënten niet therapietrouw bleek te zijn met betrekking tot de thiopurine medicatie.

TDM kan worden gebruikt bij patiënten met een thiopurine onderhoudsbehandeling om non-compliance of onderdosering aan te tonen, en kan worden toegepast om de behandeling te optimaliseren, voornamelijk bij patiënten die onvoldoende respons vertonen.

Leukopenie is een potentieel gevaarlijke bijwerking van thiopurines, die voornamelijk wordt toegeschreven aan verhoogde toxische 6-TGN steady-state concentraties. Thiopurine-geïnduceerde leukopenie treedt op bij 2-5% van de patiënten met IBD, met name gedurende de eerste weken tot maanden van de behandeling. Aangezien steady-state concentraties van de actieve thiopurine metabolieten in het algemeen vier tot acht weken na aanvang van de thiopurine therapie worden bereikt, onderzochten we of vroeg in de therapie gemeten thiopurine metabolietconcentraties het optreden van leukopenie kunnen voorspellen. **Hoofdstuk 6** beschrijft de prospectieve studie bij een deel van de IBD patiënten van de TOPIC trial, waarin de voorspellende waarde van 6-TGN en 6-MMPR metabolieten op het optreden van leukopenie werd onderzocht gedurende de eerste 8 weken van de behandeling. De thiopurine metabolieten werden een week na start van de behandeling (*T1*) gemeten en vergeleken bij patiënten met en zonder leukopenie ($n=32$ resp. $n=162$).

Om een leukopenie te kunnen voorspellen werd de *T1* drempelwaarde van $213 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ rode bloedcellen (RBC) gedefinieerd voor 6-TGN en $3525 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ RBC voor 6-MMPR: patiënten die deze drempelwaarden overschreden hadden een verhoogd risico op het ontwikkelen van een leukopenie (OR 6,2 (95%CI: 2,8-13,8) resp. 5,9 (95%CI: 2,7-13,3)). Bij patiënten die werden behandeld met 6MP trad leukopenie vaker op, vergeleken met AZA (OR 7,3 (95%CI: 3,1-17,0)). Dit was ook het geval bij patiënten die gelijktijdig met anti-TNF therapie werden behandeld, vergeleken met thiopurine monotherapie (OR 5,1 (95%CI: 1,6-16,4)).

Met behulp van logistische regressie werd er een voorspellend algoritme ontwikkeld, waarbij de 6-TGN en 6-MMPR drempelwaarden, het thiopurine type en al dan niet een gelijktijdige behandeling met anti-TNF als determinanten werden meegenomen (AUC=0,84).

Bij patiënten behandeld met thiopurine monotherapie met *T1* 6-TGN én 6-MMPR concentraties hoger dan de drempelwaarden was het risico op een leukopenie het grootst, gevolgd door patiënten die alleen de *T1* 6-MMPR of 6-TGN drempelwaarde

overschreden. Patiënten met verhoogde *T1* 6-TGN en 6-MMPR concentraties die gelijktijdig werden behandeld met anti-TNF, ontwikkelden allen een leukopenie.

In dit prospectieve onderzoek bij IBD patiënten werd voor de eerste keer aangetoond dat verhoogde 6-TGN en 6-MMPR metaboliet concentraties op week 1 beiden zeer voorspellend zijn voor thiopurine-geïnduceerde leukopenie. Op basis van de vier onafhankelijke determinanten, gebruikmakend van het voorspellend algoritme, kunnen patiënten een week na aanvang van de behandeling worden geclassificeerd om het risico op een leukopenie gedurende de eerste 8 weken van de behandeling te bepalen.

Gedurende de eerste maanden na start staakt tot ongeveer 25% van de IBD patiënten de thiopurine behandeling vanwege onverdraaglijke bijwerkingen. Hepatotoxiciteit, gastrointestinale klachten en algehele malaise zijn de meest voorkomende limiterende bijwerkingen, en zijn geassocieerd met hoge 6-MMPR metabolietconcentraties.

Hoofdstuk 7 beschrijft een prospectieve studie bij 270 patiënten startend met thiopurine therapie, waarbij de voorspellende waarde van de 6-MMPR metaboliet concentratie op week 1 (*T1*) werd bepaald voor het optreden van hepatotoxiciteit, gastrointestinale klachten en algehele malaise gedurende de eerste 20 weken van de thiopurine behandeling.

Hepatotoxiciteit trad op bij 17% van de patiënten. Deze bleek te zijn geassocieerd met de *T1* 6-MMPR metabolietconcentratie. Patiënten die de gedefinieerde 6-MMPR drempelwaarde van $3615 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ op week 1 overschreden, hadden ongeveer een 4 maal verhoogd risico op hepatotoxiciteit. 6-MMPR concentraties boven de drempelwaarde correleerden tevens met gastrointestinale klachten (misselijkheid, braken en anorexie; OR 2,4 (95%CI: 1,4-4,3)) en algehele malaise (OR 2,0 (95%CI: 1,1-3,7)).

De discriminatieve waarden van de *T1* 6-MMPR concentratie voor deze bijwerkingen waren matig. Thiopurine-geïnduceerde hepatotoxiciteit bleek echter mede geassocieerd te zijn met de onafhankelijke determinanten mannelijk geslacht, leeftijd, lichaamsgewicht en body mass index (BMI). Leeftijd en BMI toonden de hoogste discriminatieve waarden voor het optreden van hepatotoxiciteit.

Op basis van de meest relevante determinanten leeftijd, geslacht, BMI en de *T1* 6-MMPR drempelwaarde werd er een algoritme ontwikkeld om het risico op hepatotoxiciteit te bepalen (AUC=0,83). Mannen met een BMI $>25 \text{ kg}/\text{m}^2$, onafhankelijk van de leeftijd, die de *T1* 6-MMPR drempelwaarde van $3615 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ overschreden, hadden het grootste risico en ontwikkelden allen hepatotoxiciteit. Het risico was vervolgens het grootst onder vrouwen met dezelfde karakteristieken, gevolgd door mannen of vrouwen ouder dan 50 jaar met een BMI $>25 \text{ kg}/\text{m}^2$ en een *T1* 6-MMPR concentratie onder de gedefinieerde drempelwaarde.

In dit prospectieve onderzoek werd aangetoond dat met behulp van het meten van de 6-MMPR concentratie, een week na aanvang van de thiopurine behandeling, patiënten kunnen worden geïdentificeerd met een verhoogd risico op thiopurine-geïnduceerde hepatotoxiciteit, gastrointestinale intolerantie en algehele malaise. Voor het eerst werd

er een voorspellend algoritme ontwikkeld voor het optreden van hepatotoxiciteit, gebaseerd op de *T1* 6-MMPR concentratie and de relevante patiëntkarakteristieken leeftijd, geslacht en BMI. In de klinische praktijk kan het algoritme van nut zijn om de thiopurine behandeling bij IBD in een vroeg stadium te optimaliseren.

In **Hoofdstuk 8** wordt de casus beschreven van een patiënt met de ziekte van Crohn die een ernstige pancytopenie ontwikkelde tijdens een behandeling met 50 mg 6MP/dag. Hoge myelotoxische 6-TGN metabolietconcentraties ten gevolge van een complete TPMT deficiëntie waren hiervoor de oorzaak

De patiënt werd succesvol behandeld met een zeer lage dosis 6-thioguanine (6-TG), een alternatief thiopurine analoog. De 6TG dosering werd aangepast op basis van frequente 6-TGN metingen, uiteindelijk resulterend in een onderhoudsdosering van 20 mg elke 2 weken.

In **Deel III** wordt het onderzoek naar de klinische relevantie van enkele farmacokinetische interacties met thiopurines gepresenteerd.

Eerdere studies vonden aanwijzingen dat 5-aminosalicylaten (5-ASA) het metabolisme van AZA en 6MP beïnvloeden. In **Hoofdstuk 9** werd in een prospectieve studie bij 26 patiënten met een thiopurine onderhoudsbehandeling de invloed van 5-ASA (Pentasa® granulaat, sachets) onderzocht op de vorming van 6-TGN en 6-MMPR.

We observeerden een dosisafhankelijke stijging van de 6-TGN concentratie ten opzichte van baseline: gelijktijdig gebruik van 2 gram 5-ASA/dag gedurende vier weken resulteerde in een 40% stijging van de 6-TGN concentratie, terwijl 4 gram 5-ASA/dag leidde tot een stijging van 70%. De 6-MMPR concentratie veranderde hierbij niet significant, wat suggereert dat de activiteit van het enzym thiopurine S-methyltransferase, verantwoordelijk voor de vorming van 6-MMPR, *in vivo* niet wordt beïnvloed door 5-ASA of zijn metabolieten. Bij 8% van de patiënten werd een voorbijgaande milde myelotoxiciteit gezien, wat wijst op een licht verhoogd risico op myelosuppressie als gevolg van combinatie therapie.

De concentratie van het farmacologisch actieve 6-TGN neemt op een dosisafhankelijke wijze toe bij gelijktijdig gebruik van 5-ASA. IBD patiënten met onvoldoende respons of bij wie de thiopurine behandeling faalt als gevolg van een suboptimale 6-TGN concentratie hebben mogelijk baat bij een combinatie met 5-ASA.

De 6-thioguanine nucleotiden bestaan uit drie verschillende gefosforyleerde metabolieten, namelijk 6-thioguanine monofosfaat (6-TGMP), 6-thioguanine difosfaat (6-TGDP) en 6-thioguanine trifosfaat (6-TGTP). Met name 6-TGTP wordt verantwoordelijk gehouden voor het immunosuppressieve effect van de thiopurines door remming van het enzym GTPase Rac1 in geactiveerde lymfocyten, leidend tot stimulatie van de geprogrammeerde celdood van de T-cel.

In hoofdstuk 9 werd een dosisafhankelijk effect van 5-ASA beschreven op de vorming van de totale concentratie 6-TGN metabolieten. **Hoofdstuk 10** beschrijft de studie waarin bij een deel van deze patiënten (n=17) de invloed werd onderzocht van 5-ASA (Pentasa® granulaat, sachets) op de individuele 6-thioguanine nucleotiden.

Gelijktijdig gebruik van 2 gram 5-ASA/dag gedurende 4 weken bij patiënten met een azathioprine onderhoudsbehandeling resulteerde in een stijging van de mediane 6-TGDP, 6-TGTP en de totale 6-TGN concentraties. De toename van de totale 6-TGN concentratie was het gevolg van de stijging van 6-TGTP én 6-TGDP, waarbij 6-TGTP nog steeds het grootste aandeel had binnen de totale pool van de 6-TGN metabolieten (ca. 85%). Een direct daaropvolgende dosisverhoging naar 4 gram 5-ASA/dag liet geen verdere stijging zien van de individuele 6-TGN metabolieten, maar onverwachts wel een daling van de totale 6-MMPR metabolietconcentratie.

Patiënten met IBD die niet of onvoldoende reageren op de standaard thiopurine behandeling hebben mogelijk baat bij een combinatie met 5-ASA, leidend tot een toename van de farmacologisch actieve 6-TGN metabolieten, met name 6-TGTP, bij een gelijkblijvende of zelfs dalende concentratie van de cytotoxische 6-MMPR metabolieten.

Infliximab is een monoklonaal antilichaam gericht tegen het pro-inflammatoire cytokine tumor necrosis factor- α (TNF- α), en is bewezen effectief als inductietherapie en als onderhoudsbehandeling van IBD.

In eerder onderzoek kwam een geneesmiddelinteractie aan het licht tussen azathioprine en infliximab. **Hoofdstuk 11** beschrijft de invloed van het anti-TNF- α antilichaam adalimumab op het thiopurine metabolisme bij 12 patiënten met een azathioprine of mercaptopurine onderhoudsbehandeling voor de ziekte van Crohn.

Na het toevoegen van adalimumab veranderden de 6-TGN and 6-MMPR metaboliet concentraties gedurende een follow-up periode van de eerste 12 weken niet significant ten opzichte van baseline. De enzymactiviteit van drie relevante enzymen betrokken bij het thiopurine metabolisme, namelijk thiopurine S-methyltransferase, inosine-trifosfaat pyrofosfatase en hypoxanthine-guanine fosforibosyltransferase, waren 4 weken na aanvang van de adalimumab behandeling ook niet significant veranderd.

Twee patiënten (17%) toonden binnen 2-4 weken klinisch relevante myelotoxiciteit na het starten van adalimumab bij de thiopurine behandeling.

Opvallend was dat bij circa tweederde van de patiënten subtherapeutische 6-TGN concentraties werden gemeten gedurende de gehele studieperiode, wat suggereert dat de thiopurine medicatie bij deze patiënten niet optimaal werd gedoseerd.

In deze prospectieve interactiestudie bij patiënten met de ziekte van Crohn kon geen farmacokinetische interactie worden aangetoond tussen adalimumab en de conventionele thiopurines azathioprine en mercaptopurine.

In **Hoofdstuk 12** volgt een discussie over de betekenis van de belangrijkste uitkomsten van dit proefschrift in relatie tot de thans beschikbare literatuur, de dagelijkse klinische praktijk, maar ook met het oog op toekomstig onderzoek.

Tenslotte worden in **Hoofdstuk 13** op basis van de belangrijkste in dit proefschrift gepresenteerde bevindingen en de meest recente literatuur enkele klinische aanbevelingen en overwegingen gepresenteerd, voor nu en wellicht voor de toekomst.