

# Therapeutic drug monitoring of thiopurine therapy in IBD patients

## Citation for published version (APA):

Gilissen, L. P. (2008). *Therapeutic drug monitoring of thiopurine therapy in IBD patients*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20080130lg>

## Document status and date:

Published: 01/01/2008

## DOI:

[10.26481/dis.20080130lg](https://doi.org/10.26481/dis.20080130lg)

## 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](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

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

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

# Chapter 13

## Summary



## Summary

**Chapter 1** starts with a **short introduction** about inflammatory bowel diseases (IBD). IBD consist of Crohn's disease, ulcerative colitis and indetermined colitis. The cause of these diseases seems multifactorial. IBD are characterised by an overactive, pro-inflammatory immune system in-, or even outside the bowel. One group of immunomodulatory medications used in IBD therapy are thiopurines, such as azathioprine (AZA), 6-mercaptopurine (6-MP) and 6-thioguanine (6-TG).

In the second part of this chapter a **review** is presented about thiopurine pharmacology, pharmacogenetics, interactions and new strategies for optimization of pharmacotherapy, including therapeutic drug monitoring (TDM) and genotyping of thiopurine S-methyltransferase (TPMT), an important enzyme in thiopurine metabolism. Thiopurines are metabolised to therapeutic 6-thioguanine nucleotides (6-TGN) and hepatotoxic 6-methylmercaptopurine ribonucleotides (6-MMPR), which both can be measured in red blood cells (RBC).

In the third part the **outline of this thesis** is described: the clinical usefulness of TDM of thiopurine therapy in IBD. Theoretically, measuring metabolite levels of thiopurines could improve individual efficacy and safety of this therapy. The possible clinical usefulness of TDM in thiopurine therapy is demonstrated in several clinical trials.

**Chapter 2** describes in detail the method of metabolite measurements and TPMT genotyping in a prospective study in 30 IBD patients, who have started with 6-MP treatment. TDM is performed at  $t = 0, 1, 2, 4$  and 8 weeks after starting 50 mg 6-MP daily. Large inter-individual differences in metabolite concentrations were demonstrated. No correlation was found between metabolite levels and 6-MP dose. Steady state 6-TGN and 6-MMPR metabolite levels were found after four weeks, thus the half life of these metabolites is approximately five days. One patient had homozygous mutant TPMT alleles, four patients had heterozygous TPMT mutants. A correlation between TPMT genotype and 6-TGN level was found. One mutation of a TPMT allele increased the risk of leukopenia twelve times. All patients with leukopenia had 6-TGN levels of at least  $300 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$  after one week of 6-MP therapy. No correlation was found between metabolite levels and hepatotoxicity (one patient) or pancreatitis (three patients). Interestingly, 83% of the patients with initially active IBD and remission after eight weeks of 6-MP treatment had 6-TGN levels above the proposed therapeutic threshold level of  $235 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ . Inversely, 75% of the patients without clinical improvement of IBD activity after eight weeks of 6-MP treatment had 6-TGN levels below  $235 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ . This is in accordance with previous

literature on this subject.

This study clearly indicates the usefulness of TPMT genotyping and especially TDM of thiopurine therapy in this population. TPMT genotyping before start of thiopurine treatment may prevent early myelotoxicity due to thiopurine treatment in a selection of patients. TDM may facilitate the clinician to improve 6-MP efficacy by demonstrating suboptimal dosing and predicting the risk of leukopenia. Based on this study following recommendations can be made: TDM after one week (to prevent early toxicity: 6-TGN should not exceed 300 pmol/ $8 \times 10^8$  RBC) and after four weeks (to detect suboptimal dosing: 6-TGN are lower than 235 pmol/ $8 \times 10^8$  RBC then).

Five thiopurine treated IBD patients from daily clinical practice are described in **Chapter 3**. The first case demonstrated non-compliance, as is often seen in chronic patients in general. TDM is the only method to detect this phenomenon. The second case showed that high 6-MMPR levels may give rise to a toxic hepatitis. This patient with wildtype TPMT<sup>H/H</sup> genotype had a preferential metabolism of 6-MP to 6-MMPR, resulting in a failure to achieve adequate clinical benefit (which is associated with 6-TGN levels), but leading to hepatitis due to high 6-MMPR metabolite concentrations. This case subscribes earlier findings that TDM can reveal a subgroup of patients resistant to 6-MP treatment, in danger of hepatotoxicity when 6-MP dose is increased. Case 2 is also an example of treatment with 6-TG, a product near the end of the metabolic pathway of thiopurines, which can be used as an alternative immunosuppressive therapy in case of AZA or 6-MP intolerance, as described in Chapters 7-9.

In case 3 relatively high 6-TGN and low 6-MMPR levels were measured. Sufficient 6-TGN levels were reached at 50% of the initial dose. This patient is an example of an intermediate metaboliser (heterozygous TPMT<sup>L/H</sup>). This case also illustrates the inter-individual differences in TPMT activity and corresponds with earlier findings in which clinical response only correlates with 6-TGN levels and not with any other variable such as drug dose.

The fourth case represents the one out of 300 patients with no functional TPMT activity (TPMT<sup>L/L</sup>), showing extremely high 6-TGN levels within just one week of 6-MP treatment. This patient had a homozygous variant allele (TPMT \*3A/\*3A). Case 5 is extraordinarily interesting, presenting reversible pancytopenia due to extremely high 6-MMPR levels. This is the first case showing this phenomenon and points out the relation between myelotoxicity and other 6-MP metabolites than just 6-TGN alone.

This chapter illustrates in a descriptive way some clinical situations, in which it is worthwhile to employ TDM during initiation of thiopurine treatment. TDM improves efficacy of treatment and diminishes risks of serious complications such as myelodepression and hepatitis. TDM can also be used to reveal bad

compliance or undertreatment in steady state treated patients and might help clinicians to overcome their fear for overdosing. TPMT-genotyping before starting thiopurine treatment may be complementary to TDM. TPMT genotype predicts the chance of early neutropenia, while TDM can be used to adjust 6-TGN and 6-MMPR levels.

**Chapter 4** describes a prospective pharmacokinetic study in IBD patients with steady state AZA treatment. The original intention of this study was to examine the metabolite levels in a small cohort of AZA treated IBD patients, after previous publications about the 6-TGN metabolite threshold. TDM was performed at  $t= 0, 1, 4$  and 8 weeks in fifteen IBD patients with established AZA therapy. Primary outcomes were 6-TGN and 6-MMPR metabolite levels, secondary were the correlation between metabolite levels, drug dose, disease activity and laboratory parameters and compliance. Eleven patients completed the eight week study interval (one intolerant and three non-compliant patients dropped out). Mean baseline 6-TGN levels were relatively low:  $158 \text{ pmol}/8 \times 10^8$  RBC and increased during the study interval, but not significantly. Overall, non-compliance was found in six of fifteen cases (40%), TDM revealed non-compliance in four of these six patients, two patients did not show up for blood withdrawal. This result is in accordance with literature on non-compliance in other chronic diseases, such as diabetes mellitus.

In **Chapter 5** a prospective study is reported about a relevant clinical question: is TDM useful in case of an exacerbation of IBD during thiopurine therapy? In daily practice a switch to different therapy, for example to a biological immunomodulator (infliximab, adalimumab or certolizumab), is considered in this situation. In case of an exacerbation the question should be however, whether the patient has been compliant and whether the thiopurine dose was adequate in the individual patient.

This study was performed to examine the possible difference of thiopurine metabolite levels between exacerbations versus remissions and to redefine a therapeutic threshold 6-TGN level in adult IBD patients. Forty-one adult IBD patients with an exacerbation of IBD were compared with 59 patients with IBD in remission during thiopurine therapy (AZA or 6-MP). Thiopurine metabolite levels and TPMT phenotype were measured. Disease activity was scored by CAI (UC) and CDAI (CD). Primary outcomes were 6-TGN and 6-MMPR metabolite levels, secondary were TPMT activity, laboratory parameters and correlations between metabolite levels, disease activity and laboratory parameters.

At first, a high prevalence of non-compliance was found. Zero 6-TGN levels were measured in 12% of the patients with an exacerbation versus zero or very

low levels in 19% of the patients in remission (16% in all included patients). It is well known that non-compliance is seen in up to 60% of treatment of chronic diseases in general. Nevertheless, this is often underestimated in daily clinical practice, especially in IBD patients. The only way to exclude non-compliance as the cause of an exacerbation is by measuring metabolite levels. This seems one of the most important arguments to perform TDM in case of thiopurine refractory disease, presenting in daily clinical practice.

Secondly, no significant differences in 6-TGN or 6-MMPR metabolite levels were found between patients with exacerbations and remissions. Besides, no correlation between thiopurine dose (in mg or mg per kilograms bodyweight) and metabolite levels was found.

Calculations for three different situations were made: in all included patients (N= 100), in all exacerbations versus compliant patients in remission (N=89), and in all compliant patients (N= 84). In all calculations a cut-off therapeutic 6-TGN level was found between 235-250 pmol/8x10<sup>8</sup> RBC. Optimal values of sensitivity, specificity and positive predictive value were found in the sub-analysis without non-compliant remittent patients (71, 73 and 67%, AUC 0.70 respectively), but were relatively low. Only in this sub-group 6-TGN levels showed a difference between exacerbations and remissions (237 versus 320 pmol/8x10<sup>8</sup> RBC, p= 0.0007) and a correlation was found between 6-TGN and disease activity (r= -0.24, CI95% -0.42- -0.029). The OR for having an exacerbation in case of 6-TGN levels below the proposed threshold of 235 pmol/8x10<sup>8</sup> RBC was 4.7 (CI95% 1.9-11.5).

In the first analysis (all included patients), active disease was found in 52% of patients below, versus 30% above this threshold (OR 2.5, CI95% 1.11-5.75, p=0.04), although no significant difference in mean 6-TGN levels was found.

At last, a quartile analysis, as originally described by Dubinsky, showed a very similar cut-off 6-TGN level between 233-236 pmol/8x10<sup>8</sup> RBC and significantly more remissions above this threshold.

This is the fifth study demonstrating a threshold 6-TGN within the interval of 230-260 pmol/8x10<sup>8</sup> RBC, with significant differences in the prevalence of remission above and below this cut-off, confirming its value, but also with a relatively low sensitivity and specificity. In conclusion, TDM may be useful in a clinical setting, in case of thiopurine refractory IBD, mostly to reveal non-compliance and secondly to find underdosing or unfavourable metabolite profiles, however, with low sensitivity, specificity and predictive values.

**Chapter 6** demonstrates the effect of mesalamine use on thiopurine metabolite levels in IBD patients. In vitro studies had indicated a potentiating effect of mesalamines on 6-TGN levels by inhibition of TPMT activity. In this pharmacokinetic study in 17 patients, TDM was performed during a steady 6-MP therapy in combination with a steady mesalamine dose (t=0), as well as

four weeks after mesalamine discontinuation (t=4 weeks) and four weeks after reintroduction (t=8 weeks). A significant decrease of 6-TGN levels was measured after four weeks of discontinuation compared to baseline (from 262 to 209 pmol/8x10<sup>8</sup> RBC), significantly increasing to 270 pmol/8x10<sup>8</sup> RBC after reintroduction. In contrary to in vitro experiments, in vivo TPMT activity did not change significantly during the study. Maybe the method of measurement of TPMT activity plays a role in this contrasting result. The mechanism of the measured synergistic effect of mesalamine on 6-TGN levels remains unclear therefore.

In 2001 **6-Thioguanine (6-TG)** was introduced as an alternative for AZA or 6MP intolerant IBD patients. By using 6-TG, the effective 6-TGN metabolites are formed more directly, without the formation of several potentially toxic metabolites. **Chapter 7** describes a short term prospective pharmacokinetic study in 6-TG treated IBD patients. TDM was performed at t= 0, 1, 2, 4 and 8 weeks in 28 AZA/6MP intolerant IBD patients. Eight week and 24 hour 6-TGN curves were measured. High steady state 6-TGN levels (mean 856 pmol/8x10<sup>8</sup> RBC, CI95% 715-997) were found, when compared to AZA or 6-MP treatment, with a large, five-fold inter-patient variability. No correlation with drug dose was found. 6-TGN levels reached steady state after four weeks, suggesting a half life of five days. Twenty-four hour curves in steady state patients showed constant levels, as expected with this half life of 6-TGN metabolites. No correlation between 6-TGN levels and myelo- or hepatotoxicity, or pancreatitis was found (one patient had temporarily elevated lipase values without symptoms). Sixteen patients had active disease at baseline: five out of eleven CD patients (45%) and three out of five UC (60%) achieved remission. However, no correlation between disease activity and 6-TGN levels was found.

In **Chapter 8** an open, prospective, multicentre, short term safety study on 6-TG treatment in AZA or 6-MP intolerant IBD patients is presented. The occurrence of adverse events, 6-TGN metabolite levels and laboratory parameters were obtained in 32 AZA/6MP intolerant IBD patients at baseline, 1, 2, 4 and 8 weeks after initiation of 6-TG therapy. Primary outcomes were 6-TG tolerance and adverse events, secondary outcomes were 6-TGN levels and laboratory parameters. 6-TG was tolerated in 26 patients (81%) during the first eight weeks. In two patients side effects were probable (gastro-intestinal symptoms) and in one patient obvious (fever and erythema nodosum). No clinically relevant myelo- or hepatotoxicity occurred. Steady state 6-TGN levels were 1621 pmol/8x10<sup>8</sup> RBC on 40 mg daily and 937 pmol/8x10<sup>8</sup> RBC on 20 mg, showing a significant difference. In conclusion, 6-TG safety seems promising in AZA/6-MP intolerant IBD patients in this short term study. A relatively low 6-TG dose was used in contrary to previously reported studies, and measured



6-TGN levels were lower as well. Efficacy of 6-TG was not examined in this study.

**Chapter 9** describes the tolerability and safety of 6-TG in 95 IBD patients, intolerant for AZA or 6-MP, during at least one year of 6-TG treatment. In this retrospective, multicentre study primary outcomes were tolerance and safety of 6-TG, secondary were clinical and laboratory parameters, metabolite levels and ultrasonography of the liver. Mean 6-TG dose was 24.6 mg (0.34 mg/kg/day), which is lower than other studies. Twenty out of 95 (21%) patients discontinued 6-TG within one year. Altogether they had 26 adverse events, such as gastrointestinal complaints (31%), malaise (15%), hepatotoxicity (15%), myelodepression (4%), pancreatitis (4%), allergic reactions (4%) and others (27%). Haematological events occurred in three patients, one discontinued treatment. In the 6-TG tolerant group 9% (7/75) were classified as having hepatotoxicity, but two patients had mildly disturbed liver tests before initiation of 6-TG and one had symptomatic choledocholithiasis. An abdominal ultrasound was performed in 54% of patients: one patient had splenomegaly, no other signs of portal hypertension were found. No liver histology was examined in this study.

This study shows that the majority of AZA or 6-MP intolerant IBD patients (79%) is able to tolerate maintenance treatment with 6-TG. 6-TG may (still) be considered as an escape maintenance immunosuppressant in this difficult group of patients.

In 2003, some reports showed nodular regenerative hyperplasia (NRH) in liver biopsies in up to 16% of 6-TG treated IBD patients, even without biochemical signs of hepatotoxicity. Later, a report on a special magnetic resonance imaging (MRI) technique showed that some patients with normal liver histology, had signs of NRH on their MRI, demonstrating the complementary findings of both methods in the search for NRH. In **Chapter 10** the results of liver histology and MRI in long term 6-TG treated IBD patients are presented.

All IBD patients of the Sittard IBD cohort, using 6-TG for at least 24 months, were asked to undergo a liver biopsy and MRI with two intravenous contrast agents (gadolinium and ferrocabutan). Thirteen of fourteen patients participated. Mean 6-TG therapy duration was 36 months, mean daily 6-TG dose was 18.8 mg (0.28 mg/kg) and mean 6-TGN levels were 705 pmol/8x10<sup>8</sup> RBC. No signs of hepatotoxicity or portal hypertension were found by biochemical analysis and ultrasonography of the liver and spleen. Liver histology and MRI showed no NRH.

This study is the first to describe a long term follow-up of 6-TG treated IBD patients. 6-TG dose and 6-TGN levels were lower compared with previous NRH reports, suggesting dose or metabolite level-dependent effects (6-TG

dose of 20 mg or 0.28 mg/kg versus 40 - 80 mg and 6-TGN levels of 705 pmol/ $8 \times 10^8$  RBC versus 1230 pmol/ $8 \times 10^8$  RBC, respectively).

No NRH has been found in our IBD patients with longterm, low dosed 6-TG with low 6-TGN metabolite levels. Hence, 6-TG still seems useful, in selected patients intolerant for other immunosuppressives, when it is low dosed and close surveillance is kept of metabolite levels and hepatotoxicity. Also, patients should be informed extensively about the risks of 6-TG prior to initiation.



# Chapter 14

## Samenvatting



## Samenvatting

**Hoofdstuk 1** begint met een korte **introductie** over inflammatoire darmziekten (IBD). Onder IBD worden de ziekte van Crohn (CD), colitis ulcerosa (UC) en indetermined colitis verstaan. De oorzaak van deze ziekten lijkt multifactorieel te zijn. IBD kenmerken zich door een overactief, pro-inflammatoir immuunsysteem in en buiten de darm. Er worden verschillende immuunmodulerende medicijnen gebruikt in de behandeling van IBD, zoals bijvoorbeeld de thiopurines, bestaande uit azathioprine (AZA), 6-mercaptopurine (6-MP) en 6-thioguanine (6-TG).

In het tweede gedeelte van dit hoofdstuk wordt een **overzicht** gegeven over de farmacologie, farmacogenetica en interacties van thiopurines en nieuwe strategieën voor optimalisatie van de behandeling met thiopurines bij IBD patiënten, zoals het meten van metaboliet concentraties, ook wel therapeutisch drug monitoring (TDM) genaamd en genotypering van thiopurine S-methyltransferase (TPMT), een belangrijk enzym in het metabolisme van thiopurines. Thiopurines worden gemetaboliseerd tot twee groepen metabolieten: therapeutische 6-thioguanine nucleotiden (6-TGN) en hepatotoxische 6-methylmercaptopurine ribonucleotiden (6-MMPR), welke allebei gemeten kunnen worden in rode bloedcellen (RBC).

In het derde deel van dit hoofdstuk wordt de **opzet van dit proefschrift** beschreven: patiëntgebonden onderzoek naar de klinische bruikbaarheid van TDM in de behandeling van IBD met thiopurines.

**Hoofdstuk 2** beschrijft in detail de bepaling van metabolieten van thiopurines en TPMT genotypering middels een prospectieve studie bij 30 IBD patiënten, tijdens start van de behandeling met 6-MP. TDM werd uitgevoerd op  $t = 0, 1, 2, 4$  en 8 weken na de start van 50 mg 6-MP per dag. Grote inter-individuele verschillen in concentraties van thiopurine metabolieten werden gevonden. Er was geen correlatie tussen 6-MP dosis en metaboliet spiegels. Stabiele concentraties van 6-TGN en 6-MMPR werden gevonden na vier weken, waaruit een halfwaardetijd van ongeveer vijf dagen kan worden berekend. Eén patiënt was homozygoot voor mutante TPMT allelen, vier hadden één mutant allel. Er werd een correlatie tussen TPMT genotype en 6-TGN spiegel gevonden. Eén mutant TPMT allel verhoogde het risico op leukopenie twaalf keer. Alle patiënten met een leukopenie hadden een week na het starten van 6-MP 6-TGN spiegels van minimaal  $300 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ . Er werd geen correlatie gevonden tussen metaboliet concentraties en hepatotoxiciteit (een patiënt) en pancreatitis (drie patiënten). Opvallend was het feit dat 83% van de patiënten met vooraf actieve IBD en remissie na acht weken behandeling, een 6-TGN spiegel had boven de in de literatuur voorgestelde therapeutische drempel van  $235 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ . Omgekeerd, had 75% van de patiënten

zonder klinische verbetering van de ziekte-activiteit na acht weken behandeling met 6-MP 6-TGN spiegels onder deze drempel. Deze resultaten komen overeen met eerdere publicaties.

Deze studie toont duidelijk het klinische nut van TPMT genotypering en vooral TDM van de behandeling met 6-MP. TPMT genotypering voor de start van 6-MP kan vroege myelodepressie voorkomen door het aantonen van mutante TPMT allelen. TDM kan de clinicus helpen om de effectiviteit van 6-MP te verbeteren door onderdosering aan te tonen en het risico op leukopenie te voorspellen. Gebaseerd op deze studie kan het volgende advies gegeven worden: TDM na één week behandeling (om vroege myelotoxiciteit te voorkomen: 6-TGN moeten lager dan  $300 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$  zijn) en na vier weken (om suboptimale dosering op te sporen: 6-TGN zouden dan hoger moeten zijn dan  $235 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ ).

In **Hoofdstuk 3** worden vijf IBD patiënten uit de dagelijkse praktijk beschreven, die worden behandeld met een thiopurine. In de eerste casus wordt door TDM non-compliance onthuld. Non-compliance komt veel voor bij chronische ziekten in het algemeen en TDM is de enige methode om dit objectief aan te tonen. De tweede casus laat zien dat hoge 6-MMPR concentraties aanleiding kunnen geven tot toxische hepatitis. Deze patiënt met een wildtype TPMT<sup>H/H</sup> genotype had een preferentieel metabolisme van 6-MP naar 6-MMPR, leidend tot onvoldoende effectiviteit van de behandeling door te lage 6-TGN concentraties, maar wel tot hepatitis door hoge 6-MMPR concentraties. Deze casus bevestigt eerdere bevindingen dat TDM een subgroep van patiënten kan onderscheiden, die weerstandig is aan de behandeling met 6-MP, met een verhoogd risico op hepatotoxiciteit als de dosis 6-MP wordt verhoogd. De tweede casus is daarnaast een voorbeeld van de behandeling met 6-TG, een medicament dat zich dicht bij de effectieve metabolieten in het thiopurine metabolisme bevindt. Het kan worden gebruikt als een alternatief immuunsuppressivum in geval van intolerantie voor AZA of 6-MP, zoals ook beschreven wordt in Hoofdstuk 7-9.

In Casus 3 werden relatief hoge 6-TGN en lage 6-MMPR concentraties gemeten. Sufficiënte 6-TGN spiegels werden bereikt met 50% van de initiële dosis. Deze patiënt is een voorbeeld van een intermediaire metaboliseerder (heterozygoot TPMT<sup>L/H</sup>). Deze casus illustreert ook de inter-individuele verschillen in TPMT activiteit, corresponderend met de eerder gerapporteerde bevindingen dat de klinische respons op de behandeling met een thiopurine alleen correleert met 6-TGN concentraties en niet met de thiopurine dosis.

De vierde casus is een voorbeeld van de één op 300 patiënten zonder functioneel TPMT (TPMT<sup>L/L</sup>), met extreem hoge 6-TGN spiegels binnen een week na start van de behandeling met 6-MP. Deze patiënt heeft een homozygoot variant TPMT \*3A/\*3A.

Casus 5 is buitengewoon interessant, omdat het een reversibele pancytopenie door extreem hoge 6-MMPR concentraties toont. Dit is de eerste casus die dit fenomeen beschrijft. Het demonstreert dat niet alleen 6-TGN metabolieten myelotoxiciteit kunnen veroorzaken tijdens behandeling met een thiopurine.

Dit hoofdstuk beschrijft enkele alledaagse klinische situaties tijdens de beginfase van de behandeling met een thiopurine, waarin het nuttig is om TDM toe te passen. TDM verbetert de effectiviteit van de behandeling en vermindert de kans op ernstige complicaties, zoals myelodepressie en hepatitis. TDM kan daarnaast ook gebruikt worden om non-compliance of onderdosering aan te tonen in patiënten met een onderhoudsbehandeling en kan theoretisch klinici helpen om hun angst voor overdosering te overwinnen. TPMT-genotypering voor de start van de behandeling met een thiopurine kan een complementaire rol vervullen naast TDM. Het TPMT genotype voorspelt de kans op een vroege neutropenie, terwijl TDM toegepast kan worden om de 6-TGN en 6-MMPR concentraties te beïnvloeden.

**Hoofdstuk 4** beschrijft een prospectieve, farmacokinetische studie bij IBD patiënten met een onderhoudsbehandeling met AZA. De oorspronkelijke bedoeling van deze studie was om de metaboliet concentraties van AZA te bestuderen van een kleine groep IBD patiënten, naar aanleiding van recente publicaties over de therapeutische drempel van de 6-TGN spiegel. TDM werd uitgevoerd op  $t = 0, 1, 4$  en  $8$  weken bij vijftien IBD patiënten met AZA onderhoudsbehandeling. De primaire uitkomstmaten waren de 6-TGN en 6-MMPR spiegels, secundaire waren de correlatie tussen metaboliet concentraties, AZA dosis, ziekte-activiteit en laboratorium parameters en compliance. Elf patiënten vervulde de acht weken durende onderzoeksperiode (één intolerante en drie niet-compliance patiënten vielen uit). De gemiddelde baseline 6-TGN concentratie was relatief laag:  $158 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$  en steeg gedurende het studie-interval, maar niet significant. In totaal werd non-compliance aangetoond in zes van de vijftien patiënten (40%), TDM onthulde er hiervan vier en twee patiënten kwamen niet opdagen voor afspraken om bloed te laten prikken. Dit resultaat komt overeen met de literatuur over non-compliance in andere chronische ziekten, zoals diabetes mellitus.

In **Hoofdstuk 5** wordt een prospectieve studie gepresenteerd over een relevante klinische vraag: is TDM bruikbaar in geval van een exacerbatie van IBD tijdens de behandeling met een thiopurine? In de dagelijkse praktijk wordt in dit geval omschakeling naar een ander medicament overwogen, zoals bijvoorbeeld een 'biological' (influximab, adalimumab of certolizumab). Eigenlijk zou de eerste vraag in geval van een exacerbatie echter moeten zijn of de



patiënt wel compliant is geweest en of de thiopurine dosis wel correct was voor deze individuele patiënt.

Er werd een studie opgezet om te bestuderen of er een verschil was tussen hoogte van de metaboliet concentraties bij patiënten met een exacerbatie versus remissie en om een nieuwe drempelwaarde voor de therapeutische 6-TGN spiegel te formuleren voor volwassen IBD patiënten.

Eenenvertig IBD patiënten met een exacerbatie werden vergeleken met 59 patiënten in remissie tijdens de behandeling met een thiopurine (AZA of 6-MP). Thiopurine metaboliet concentraties en TPMT activiteit werden gemeten. De ziekte-activiteit werd gemeten met een CAI (UC) en CDAI (CD). Primaire uitkomstmaten waren 6-TGN en 6-MMPR metaboliet spiegels, secundaire waren TPMT activiteit, laboratorium parameters en correlaties tussen metaboliet spiegels, ziekte-activiteit en laboratorium parameters.

Ten eerste werd een hoge prevalentie van non-compliance gevonden: bij 16% van alle geïnccludeerde patiënten. Bij 12% van de patiënten met een exacerbatie werden 6-TGN spiegels van nul gemeten. Bij 19% van de patiënten in remissie werden 6-TGN spiegels van nul of zeer lage spiegels gevonden. Het is bekend dat bij tot wel 60% van de behandeling van chronische ziekten in het algemeen non-compliance voorkomt. Niettemin wordt non-compliance toch nog altijd onderschat in de dagelijkse praktijk, met name bij IBD patiënten. De enige manier om het aan te tonen als oorzaak van een exacerbatie is door metaboliet concentraties te meten. Een van de belangrijkste redenen om TDM uit te voeren in de dagelijkse praktijk lijkt derhalve in geval van een thiopurine refractaire IBD.

Ten tweede werden er geen significante verschillen gevonden in 6-TGN of 6-MMPR spiegels tussen patiënten met een exacerbatie en remissie. Daarnaast werd geen correlatie gevonden tussen thiopurine dosis (in mg of mg per kilogram lichaamsgewicht) en metaboliet spiegels.

Er werden berekeningen voor drie afzonderlijke klinische situaties uitgevoerd: voor alle geïnccludeerde patiënten (N=100), voor alle exacerbaties versus compliante patiënten in remissie (N=89) en voor alle compliante patiënten (N=84). In alle situaties werd een therapeutische 6-TGN drempelwaarde van 235-250 pmol/8x10<sup>8</sup> RBC gevonden. Optimale sensitiviteit, specificiteit en positief predictieve waarde voor exacerbatie werden gevonden in de groep zonder niet-compliance patiënten met een remissie: 71, 73 en 67% (AUC 0.70), maar waren relatief laag. Alleen in deze subgroep bleken de 6-TGN spiegels significant verschillend tussen exacerbaties en remissies (237 versus 320 pmol/8x10<sup>8</sup> RBC, p= 0.0007) en was er een correlatie tussen 6-TGN en ziekte-activiteit (r=-0.24, CI95% -0.42- -0.029). De OR om in geval van een exacerbatie een 6-TGN spiegel onder de drempel van 235 pmol/8x10<sup>8</sup> RBC te hebben was 4.7 (CI95% 1.9-11.5).

In de eerste analyse (alle geïnccludeerde patiënten) werd actieve ziekte gevonden bij 52% van de patiënten met een 6-TGN spiegel onder, versus 30% boven de drempelwaarde (OR 2.5, CI95% 1.11-5.75,  $p=0.04$ ), hoewel er geen significant verschil werd aangetoond in 6-TGN concentraties.

Ten laatste toonde een kwartiel analyse, zoals oorspronkelijk beschreven door Dubinsky, om de 6-TGN drempelwaarde van  $235 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$  te berekenen, een sterk overeenkomende therapeutische 6-TGN drempelwaarde van  $233\text{-}236 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ , met significant meer remissies boven deze drempel.

Dit is de vijfde studie die een therapeutische 6-TGN drempelwaarde binnen het interval van  $230\text{-}260 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$  toont, met significante verschillen in remissies onder en boven deze drempel, wat de waarde van deze drempel lijkt te bevestigen, maar met een relatief lage sensitiviteit en specificiteit.

Concluderend kan worden gesteld dat TDM nuttig is in de dagelijkse praktijk, in geval van een exacerbatie, om vooral non-compliance aan te tonen en ten tweede om onderdosering of ongunstige metaboliëtoprofielen te vinden, maar met een lage sensitiviteit, specificiteit en predictieve waarden.

**Hoofdstuk 6** demonstreert het effect van mesalazine op de concentraties van thiopurine metaboliëten bij IBD patiënten. In vitro onderzoeken toonden al een potentiërend effect van mesalazines op 6-TGN concentraties door remming van de TPMT activiteit. In de huidige farmacokinetische studie, die uitgevoerd werd bij 17 patiënten, werden 6-TGN en 6-MMPR gemeten tijdens een stabiele onderhoudsbehandeling met 6-MP in combinatie met een stabiele dosis mesalazine ( $t=0$ ), vier weken na het stoppen van mesalazine ( $t=4 \text{ w}$ ) en vier weken na herstart hiervan ( $t=8 \text{ w}$ ). Er werd een significante afname van de 6-TGN spiegels gemeten vier weken na stoppen van mesalazine, vergeleken met  $t=0$  (van  $262$  tot  $209 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ ), significant toenemend na herstart hiervan tot  $270 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ . In tegenstelling tot eerdere in vitro onderzoeken veranderde de TPMT activiteit niet tijdens de studie. Mogelijk speelt de meetmethode van TPMT hierin een rol. Het mechanisme achter het synergistisch effect van mesalazine op 6-TGN concentratie blijft nog steeds onduidelijk.

In 2001 werd **6-thioguanine** (6-TG) geïntroduceerd als alternatief immuunsuppressivum voor AZA of 6-MP intolerante IBD patiënten. Door 6-TG te gebruiken worden de effectieve 6-TGN metaboliëten directer gevormd, zonder dat er verschillende potentieel toxische metaboliëten ontstaan. In **Hoofdstuk 7** wordt een kortdurende prospectieve, farmacokinetische studie beschreven bij IBD patiënten die met 6-TG werden behandeld. TDM werd uitgevoerd op  $t=0, 1, 2, 4$  en  $8$  weken bij 28 AZA/6-MP intolerante IBD patiënten. Er werden 6-TGN curves getekend voor de acht weekse periode,

maar ook enkele 24-uurs curves. Er werden hoge steady state 6-TGN spiegels (gemiddeld  $856 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ ,  $\text{CI}_{95\%} 715\text{-}997$ ) gevonden, vergeleken met metingen bij eerdere onderzoeken met AZA of 6-MP, met daarnaast een grote, vijfvoudige inter-individuele spreiding. Er werd geen correlatie tussen 6-TG dosis en 6-TGN spiegels gevonden. 6-TGN concentraties bereikten een steady state na vier weken, hetgeen een farmacokinetische halfwaardetijd van vijf dagen suggereert. Vierentwintig uur-curves in steady state toonden constante 6-TGN spiegels, zoals verwacht bij de beschreven halfwaardetijd. Er werd geen correlatie gevonden tussen 6-TGN spiegels en myelo- of hepatotoxiciteit, of pancreatitis (één patiënt had tijdelijk asymptomatisch verhoogde lipasewaarden). Zestien patiënten hadden actieve ziekte bij start van de studie; vijf van de elf Crohn-patiënten (45%) en drie van de vijf colitis ulcerosa patiënten (60%) waren in remissie na acht weken. Toch werd er geen correlatie gevonden tussen 6-TGN concentraties en ziekte-activiteit.

In **Hoofdstuk 8** wordt een open, prospectieve, multicenter, korte termijnstudie beschreven naar de veiligheid van de behandeling met 6-TG bij AZA of 6-MP intolerante IBD patiënten. Het voorkomen van bijwerkingen, laboratoriumparameters en 6-TGN concentraties werden geregistreerd bij 32 IBD patiënten bij start ( $t=0$ ) en na 1, 2, 4 en 8 weken behandeling met 6-TG. Primaire uitkomstmaten waren tolerantie voor 6-TG en bijwerkingen, secundaire waren 6-TGN spiegels en laboratoriumparameters. 6-TG werd goed verdragen door 26 patiënten (81%) gedurende het studie-interval van acht weken. Bij twee patiënten werden bijwerkingen als waarschijnlijk (gastro-intestinale symptomen) en bij één als duidelijk (koorts en erythema nodosum) geclassificeerd. Er werd geen relevante myelo- of hepatotoxiciteit vastgesteld. Steady state 6-TGN concentraties waren significant verschillend voor de behandeling met 40 mg en 20 mg 6-TG:  $1621 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$  en  $937 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$  respectievelijk. Concluderend lijkt de veiligheid van 6-TG veelbelovend op de korte termijn bij IBD patiënten die intolerant zijn voor AZA of 6-MP. Een relatief lage dosis 6-TG werd gebruikt vergeleken met eerdere studies en de gevonden 6-TGN concentraties waren ook lager. De effectiviteit van 6-TG werd niet onderzocht in deze studie.

**Hoofdstuk 9** beschrijft de tolerantie en veiligheid van 6-TG bij 95 IBD patiënten, intolerant voor AZA of 6-MP, gedurende minimaal één jaar behandeling met 6-TG. In deze retrospectieve, multicenter studie waren de primaire uitkomstmaten tolerantie en veiligheid van 6-TG, secundaire waren klinische en laboratorium parameters, metaboolie concentraties en echografie van de lever. De gemiddelde 6-TG dosis was 24.6 mg (0.31 mg/kg lichaamsgewicht), wat lager is dan in andere studies. Twintig van de 95 patiënten (21%) staakten de behandeling met 6-TG binnen een jaar. Zij hadden samen 26 bijwerkingen of

laboratoriumafwijkingen, waarvan gastro-intestinale bezwaren (31%), malaise (15%), hepatotoxiciteit (15%), myelodepressie (4%, naast deze ene patiënt waren er nog twee andere patiënten die de behandeling niet hoefden te staken), pancreatitis (4%), allergische reacties (4%) en andere oorzaken (27%). Van de 75 6-TG tolerante patiënten hadden zeven patiënten tekenen van hepatotoxiciteit, waarvan er twee al mild gestoorde levertesten hadden voor start van 6-TG en één bewezen choledocholithiasis had. Abdominale echografie werd verricht bij 54% van de patiënten: één patiënt had splenomegalie, geen andere tekenen van portale hypertensie werden gevonden. Lever histologie werd niet onderzocht in deze studie.

Deze studie toont dat het grootste deel van de AZA of 6-MP intolerante IBD patiënten (79%) een onderhoudsbehandeling gedurende minimaal één jaar met 6-TG (dosis 0.3-0.4 mg/kg/dag) goed verdraagt. 6-TG kan daarom (nog altijd) overwogen worden als alternatief immunosuppressivum in deze moeilijk te behandelen IBD patiënten.

In 2003 beschreven enkele publicaties het voorkomen van nodulaire regeneratieve hyperplasie (NRH) van de lever bij in totaal 16% van de met 6-TG behandelde IBD patiënten, gediagnosticeerd door een leverbiopt. Niet bij alle patiënten waren er biochemische aanwijzingen voor hepatotoxiciteit. Later verscheen er een rapport over een speciale magnetische resonantie imaging (MRI) techniek, waarbij patiënten met normale lever histologie toch aanwijzingen voor NRH hadden bij MRI. Dit demonstreerde de complementariteit van beide onderzoeksmethoden in de zoektocht naar NRH. In **hoofdstuk 10** worden de resultaten van lever histologie en MRI bij IBD patiënten die langdurig met 6-TG werden behandeld beschreven. Alle IBD patiënten uit het Sittardse IBD cohort, die minimaal 24 maanden met 6-TG werden behandeld, werden gevraagd om een leverbiopt en MRI met twee contrastmiddelen (gadolinium en ferrocabutan) te ondergaan. Dertien van de veertien patiënten namen deel aan het onderzoek. De gemiddelde duur van de behandeling met 6-TG was 36 maanden, de gemiddelde dagelijkse dosis was 18.8 mg (0.28 mg/kg) en de gemiddelde 6-TGN spiegels waren 705 pmol/8x10<sup>8</sup> RBC. Er waren geen tekenen van hepatotoxiciteit of portale hypertensie bij biochemische analyse en echografie van de lever en milt. Lever histologie en MRI toonden geen argumenten voor NRH.

Dit is de eerste studie die IBD patiënten, behandeld met 6-TG, gedurende een lange termijn heeft gevolgd. De 6-TG dosis en 6-TGN concentraties waren lager vergeleken met eerdere publicaties over NRH, wat een mogelijk dosis- of metabolietconcentratie-afhankelijk effect suggereert (6-TG dosis 20 mg of 0.28 mg/kg versus 40-80 mg en 6-TGN spiegels van 705 pmol/8x10<sup>8</sup> RBC versus 1230 pmol/8x10<sup>8</sup> RBC, respectievelijk).

Er werd dus geen NRH gevonden bij patiënten, die langdurig een lage dosis 6-TG kregen en waarbij lage 6-TGN spiegels werden gemeten. Daarom lijkt 6-TG toch nog bruikbaar in een geselecteerde groep IBD patiënten die intolerant is voor andere immuunsuppressiva, wanneer 6-TG laag gedoseerd wordt en de metaboliet spiegels en hepatotoxiciteit regelmatig gecontroleerd worden. Daarnaast dienen patiënten vanzelfsprekend goed geïnformeerd te worden over de risico's van 6-TG vóór start van de behandeling hiermee.