

Individuel monitorering af thiopurin- og methotrexatbehandling

Overlæge Bo Baslund, overlæge Kim P. Dalhoff & overlæge Kjeld Schmiegelow

H:S Rigshospitalet, Reumatologisk Klinik, Klinisk Farmakologisk Afdeling og Pædiatrisk Klinik

Antimetabolitterne methotrexat (MTX), azathioprin (AZA), og 6-mercaptopurin (6-MP) anvendes i behandlingen af akut lymfatisk leukæmi og visse autoimmune sygdomme samt ved organtransplantation. Konventionel terapistyring i klassisk forstand med måling af lægemiddelkoncentrationer i plasma er ikke anvendelig for disse præparater, idet effekt og bivirkninger ikke er relateret til plasmakoncentrationer, om end de i nogle studier er relateret til niveauet af cytotoxiske metabolitter, der ophobes i erythrocytterne. De senere års kortlægning af den intraindividuelle variation i metabolisering af disse antimetabolitter og integrering af denne viden i patientbehandlingen er eksempler på, hvorledes klinisk farmakologi og ikke mindst farmakogenetik kan komme til at spille en afgørende rolle for fremtidens medicinske behandling.

Azathioprin og 6-mercaptopurin

Doseringen af disse lægemidler har traditionelt været baseret på patientens vægt eller legemsoverfladeareal. Selv om purin-analogerne AZA's og 6-MP's effekt er veldokumenteret, ses der hos op mod 30-50% af patienterne behandlingssvigt eller uacceptable bivirkninger, hvor især knoglemarvssuppression med risiko for svære, evt. letale infektioner er en af de mest frygtede. Både 6-MP og AZA, der efter absorptionen omdannes til 6-MP, er profarmaka, der metaboliseres ad tre fællesveje [1].

Katabolisme

6-MP kan oxideres af enzymet xanthinoxidase (XO) (Figur 1) til den inaktive thiourinsyre, som udskilles i urinen. Den høje intestinale og hepatiske XO-aktivitet nedsætter biotilgængeligheden af AZA og 6-MP. Allopurinol er en kraftig inhibitor af XO, og dosis af AZA og 6-MP skal derfor nedsættes til ca. 25% under allopurinol-behandling.

6-thioguaninnukleotid

Thiopurinerne kan omdannes til 6-thioguaninnukleotider (6-TGN) med hypoxantin-guaninfosforiboxylase (HGPRT) som det centrale enzym. 6-TGN er den vigtigste mediator af thiopurinernes cytotoxicitet, idet TGN inkorporeres i DNA, hvilket bl.a. fører til *mismatch*-DNA-repair og strengbrud. Der

findes endnu ikke metoder til rutinemæssig monitorering af DNA-6-TGN-niveauer under thiopurinbehandling. Under behandling med thiopuriner akkumuleres 6-TGN i erythrocytterne, indtil et *steady-state*-niveau opnås i løbet af 3-6 uger. TGN-niveauet i erythrocytterne (Ery-6-TGN) har hidtil været anvendt som surrogatparameter for 6-TGN-niveauet i kerneholdige celler. Både effekten ved leukæmi og graden af knoglemarvssuppression under thiopurinbehandling er relateret til Ery-6-TGN-niveauet [4]. Ofte er det dog ikke muligt at forudsige behandlingseffekten for den enkelte patient alene ved måling af Ery-6-TGN.

Thiopurinmetylering

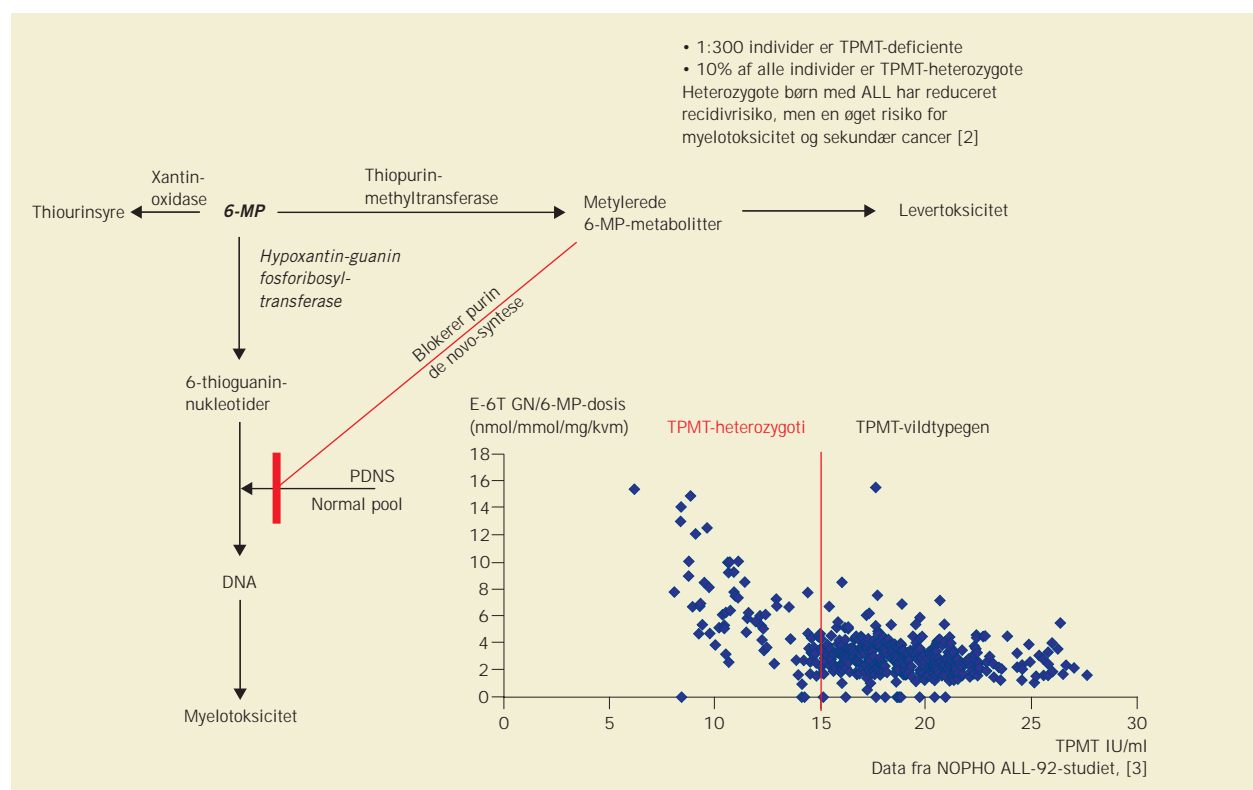
6-MP og visse af dets metabolitter kan S-metyleres af enzymet thiopurin metyltransferase (TPMT). Denne metabolisme influerer på 6-MP og dermed også på AZA-effekten; men kun i ringe grad på 6-thioguanin-effekten. De S-metylerede metabolitter, især metylthioinosin-monofosfat, er stærke hæmmere af purin de novo-syntesen og vil kunne øge inkorporeringen af 6-TGN i DNA. Det er endnu ikke afklaret, i hvilket omfang disse metabolitter spiller en rolle for cytotoxiciteten og immunsuppressionen under AZA/6-MP-behandling af cancer og immuninflammatoriske tilstande.

Genetisk polymofi og behandlingseffekt

Som følge af lavaktivitets-, enkelt nukleotidpolymorfier (SNPs) i TPMT-genet ses der hos de fleste racer, herunder hos kaukasider, en trimodal fordeling af TPMT-aktiviteten: 90% af individerne har høj enzymaktivitet (11-30 IU/ml erythrocytlysats), ca. 10% har lav-moderat aktivitet (5-10 IU/ml) pga. en lavaktivitetsallel, og 1:300 individer er TPMT-defekte med ekstrem lav aktivitet pga. to lavaktivitetsalleler [5]. Da TPMT-aktiviteten i betydelig grad afgør, om AZA/6-MP præferentielt metaboliseres til 6-TGN eller metylerede metabolitter, spiller disse polymorfier således en afgørende rolle for såvel behandlingseffekten som for mønsteret af bivirkninger.

Knoglemarvstoksicitet

Graden af knoglemarvstoksicitet under thiopurinbehandling er især relateret til Ery-6-TGN-niveauerne. Neutro- og leukopeni ses derfor især hos de 10% TPMT-heterozygote patienter med lav TPMT-aktivitet. I nogle studier er det fundet, at børn med leukæmi har en signifikant øget helbredelsesrate, men desværre også en øget risiko for sekundær cancer [2]. Behandling af TPMT-defekte patienter med standarddoser af AZA eller 6-MP vil i løbet af få uger føre til livstruende leukopeni. Denne kan og bør forebygges ved TPMT-genotypning og/el-



Figur 1. Metabolisme af 6-MP og relationen til TPMT-aktivitet og organtoksicitet. Patienter med TPMT-aktivitet i erythrocytter <14 IU/ml under 6-MP-behandling klassificeres som TPMT-heterozygote, dvs. med forventet mutation i TPMT-genet på den ene allel. 6-MP = 6-mercaptopurin, PDNS = purin de novo-syntese, 6-TGN = 6-thioguaninnukleotider, TPMT = thiopurinmetyltransferase.

ler-fænotypning af alle patienter før thiopurinbehandling, idet de kan behandles med AZA- og 6-MP-doser, der er reduceret til 0,2-0,3 mg/kg (svarende til 6-8 mg/m²) [5]. Selv ved disse doser vil patienterne have Ery-6-TGN-niveauer, der er 3-10 gange højere end dem, der opnås ved standardthiopurindoser til patienter med normal TPMT-aktivitet. Det er uafklaret, om svær neutropeni ved behandling med AZA/6-MP altid kan forklares ved lav TPMT-aktivitet og høj Ery-6-TGN eller ved høje niveauer af metylede metabolitter og hæmning af purin de novo-syntesen.

Levertoksicitet

Mens 6-TGN-niveauet er bestemmende for anticancereffekten og knoglemarvstoksiciteten, er risikoen for levertoksicitet med stigning i aminotransferaser korreleret til niveauet af metylede thiopurinmetabolitter i erythrocytter (Ery-MeMP) [6]. Patienter med to højaktivitetsalleler har således højere Ery-MeMP-niveauer samt hyppigere og mere udtalte stigninger i aminotransferaser end TPMT-heterozygote patienter. Til gengæld har de også lavere Ery-6-TGN-niveauer og mindre behandlingseffekt, og en del af disse patienter skal have AZA-doser på op til 4-6 mg/kg eller 6-MP-doser på op til 90-100 mg/m² eller mere for at opnå den ønskede behandlingseffekt.

Terapeutisk behandlingsmonitorering

På flere danske laboratorier tilbydes der monitorering af

erythrocytniveauer af 6-TGN og metylede forbindelser samt TPMT-fænotypning på erythrocytter, idet aktiviteten svarer til den, der findes i andre væv (herunder lymfocytter og levervæv), og TPMT-genotypning, idet de tre hyppigste SNPs dækker mindst 95% af de væsentlige polymorfier blandt kaukasidiske danskere. Ud over at kunne bruges til at finde de TPMT-defekte patienter med risiko for livstruende toksicitet ved thiopurinbehandling, vil TPMT-geno- og -fænotypning samt Ery-6-TGN- og -MeMP-analyser også være vejledende i behandlingen, idet den store inter- og intraindividuelle variation i biotilgængelighed og metylering indebærer, at vægt- eller overfladebaseret dosering er utilstrækkelig til at sikre både den nødvendige og den tolerable behandlingsintensitet. Ud over at være vejledende for dosisjustering og afklarende ved forekomst af betydende knoglemarvs- eller levertoksicitet kan analyserne også bruges til at identificere patienter med dårlig complians, idet disse både vil have meget lave (eller umålelige) Ery-6-TGN- og Ery-MeMP-niveauer på standardthiopurindoser.

Methotrexat

MTX er en folinsyreantagonist, som anvendes i behandlingen af cancer og autoimmune sygdomme. Metabolismen af MTX er betydelig mere kompliceret end metabolismen af AZA og 6-MP. Reduceret folinsyre er en essentiel kofaktor i cellers biokemi, herunder nukleotidsyntese, og MTX virker bl.a. ved

VIDENSKAB OG PRAKSIS | STATUSARTIKEL

at blokere dihydrofolatreduktase (DHFR), methylenetetrahydrofolatreduktase (MTHFR) og thymidylatsyntetase med inhibering af såvel RNA- som DNA-syntese. Ligesom folinsyre kan MTX polyglutameres ved tilhæftning af kæder på 2-7 glutaminsyrer, en proces, der medieres af enzymet folylpolyglutamylsyntetase (FPGS), og som fører til, at MTX akkumuleres intracellulært. Cancercellers MTX-sensitivitet afspejler bl.a. deres mulighed for polyglutamering. T-linje-leukæmi har eksempelvis en ringere mulighed for MTX-polyglutamering end B-linje-leukæmi, og det er derfor nødvendigt med højere MTX-doser for at opnå optimal antileukæmisk effekt. Virkningsmekanismen, når MTX anvendes antiinflammatorisk, herunder ved autoimmune sygdomme, er langt mindre kendt. Til gengæld er de fleste bivirkninger betinget af MTX's folinsyreantagonisme [7].

Farmakologi og -genetik

MTX's absorption fra mave-tarm-kanalen er meget varierende med en biotilgængelighed på 30-95%. Efter peroral indgift og absorption udskilles 90% uomdannet i urinen i løbet af 24 timer. MTX transporteres intracellulært af en reduceret folat-carrier (RFC). Under MTX-behandling akkumuleres MTX (inklusive MTX-polyglutamat) i erytrocytforstadier i knoglemarven, og de langkædede MTX-polyglutamater reineres i erytrocyterne i hele deres levetid (Ery-MTX). På uændret MTX-dosis opnås et *steady-state* Ery-MTX-niveau i løbet af 6-8 uger. Idet Ery-MTX afspejler MTX-dosis og den gennemsnitlige knoglemarvseksposition i de foregående 6-8 uger og også kan relateres til graden af knoglemarvstoksicitet under MTX-behandling, har Ery-MTX været anvendt som surrogatparameter for behandlingsintensitet og kompliance [8]. Selv om de enzymer, der spiller en central rolle for MTX-metabolismen og -behandlingseffekten, er velbeskrevne, savnes der større, prospektive studier af, hvilken rolle genetiske polymorfier i disse enzymsystemer spiller for behandlingseffekten og risikoen for bivirkninger [9].

Methyltetrahydrofolatreduktase (MTHFR)

Af de genetiske polymorfier for dette enzym, er det kun C677T og A1298C, der er fundet at være relateret til både nedsat enzymaktivitet og øget klinisk effekt af MTX. For patienter med reumatoid artrit og C677T-genotypen er der påvist en øget risiko for behandlingsophør pga. gastrointestinale bivirkninger og levertoksicitet [10]. Tilsyneladende kan en tilfredsstillende behandlingseffekt hos patienter med reumatoid artrit og A1298C-genotype opnås ved en lavere MTX-dosering end hos patienter uden denne allel [10].

Terapeutisk behandlingsmonitorering

Modsat polymorfierne beskrevet ved AZA/6-MP, er der endnu stor usikkerhed omkring den kliniske betydning af de mange genetiske polymorfier, der influerer på MTX's metabolisme. Både for dihydrofolatreduktase, thymidylatsyntetase

og folylpolyglutamylsyntetase er der beskrevet betydelig intraindividuel variation i enzymaktivitet, men det er usikkert, om disse variationer har nogen væsentlig klinisk betydning. I dag er det således kun Ery-MTX-analyser, der anvendes i behandlingsmonitoreringen, bl.a. til afklaring af behandlingskompliance.

Konklusion

Den hidtidige praksis med at dosere thiopuriner og MTX udelukkende efter vægt eller legemsoverflade kan i fremtiden blive suppleret med geno- og/eller fænotypning af lægemiddelmetaboliserende enzymer suppleret med monitorering af lægemiddelkoncentrationer, hvorved individuel dosering vil kunne give bedre effekt og færre bivirkninger. Der mangler dog fortsat kontrollerede, prospektive, randomiserede studier, hvori den kliniske betydning af sådanne behandlingsregimer belyses. For thiopurin-behandling er sådanne undersøgelser i gang, mens doseringen for det 50 år gamle præparat MTX formentlig i en årrække fortsat vil være empirisk i mangel på de nødvendige kliniske, farmakologiske studier. Indtil nu har man i de fleste undersøgelser kun beskæftiget sig med enkelte enzym-polymorfier, til trods for at en polymorfi, som medfører nedsat funktion, kan modvirkes af andre enzym-polymorfier med modsat virkning.

Korrespondance: Bo Baslund, Reumatologisk Klinik, Finsenscentret, H:S Rigshospitalet. E-mail: baslund@rh.hosp.dk

Antaget: 15. marts 2005

Interessekonflikter: Ingen angivet

Litteratur

1. Lennard L. The clinical-pharmacology of 6-mercaptopurine. *Eur J Clin Pharmacol* 1992;43:329-39.
2. Thomsen JB, Schroder H, Kristinsson J et al. Possible carcinogenic effect of 6-mercaptopurine on bone marrow stem cells: relation to thiopurine metabolism. *Cancer* 1999;86:1080-6.
3. Schmiegelow K, Bjørk O, Glomstein A et al. Intensification of mercaptopurine/methotrexate maintenance chemotherapy may increase the risk of relapse for some children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2003;21:1332-9.
4. Schmiegelow K, Bruunshuus I. 6-Thioguanine nucleotide accumulation in red blood cells during maintenance chemotherapy for childhood acute lymphoblastic-leukemia, and its relation to leukopenia. *Cancer Chemother Pharmacol* 1990;26:288-92.
5. Weinsilboum RM, Otterness DM, Szumlanski CL. Methylation pharmacogenetics: catechol O-methyltransferase, thiopurine methyltransferase, and histamine N-methyltransferase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999;39:19-52.
6. Nygaard U, Toft N, Schmiegelow K. Methylated metabolites of 6-mercaptopurine are associated with hepatotoxicity. *Clin Pharmacol Ther* 2004;75:274-81.
7. Kremer JM. Toward a better understanding of methotrexate. *Arthritis Rheum* 2004;50:1370-82.
8. Schmiegelow K, Schroder H, Pulczynska MK et al. Maintenance chemotherapy for childhood acute lymphoblastic-leukemia: relation of bone-marrow and hepatotoxicity to the concentration of methotrexate in erythrocytes. *Cancer Chemother Pharmacol* 1989;25:65-9.
9. Krajcinovic M, Moghrabi A. Pharmacogenetics of methotrexate. *Pharmacogenomics* 2004;5:819-34.
10. Van Ede AE, Laan RFJM, Blom HJ et al. The C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: a genetic risk factor for methotrexate-related elevation of liver enzymes in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 2001;44:2525-30.