

**UNIVERSIDAD DE BARCELONA**

Departamento de Biología Celular y  
Anatomía Patológica

**SEGUIMIENTO FARMACODINAMICO DEL TRATAMIENTO  
INMUNOSUPRESOR**

Tesis presentada por

**OLGA MILLAN LOPEZ**

Para optar al grado de

**DOCTORA EN QUIMICA**

Director: Jaume Martorell Pons

Tutor: Oriol Bachs Valdeneu

Tesis realizada en el Servicio de Inmunología del  
Hospital Clínico de Barcelona

Barcelona, Octubre 2003



El Dr. Jaume Martorell Pons, Consultor Senior del Servei d' Immunologia del Hospital Clínic i Provincial de Barcelona,

Certifica que la Tesis Doctoral titulada "Seguimiento Farmacodinámico del tratamiento inmunosupresor" presentada por Olga Millán López, ha sido realizada bajo mi dirección en el Servei d' Immunologia del Hospital Clínic de Barcelona.

Considero que la Tesis reúne las condiciones necesarias para ser presentada y leída ante el tribunal correspondiente con el fin de optar al grado de Doctora en Química.

Lo que hago constar para los efectos oportunos en Barcelona, a diez de Octubre del dos mil tres.

Dr. Jaume Martorell Pons

**INDICE**

---

**INDICE**

<b>INTRODUCCION.....</b>	<b>5</b>
<b>1. INMUNOLOGIA DEL TRANSPLANTE.....</b>	<b>6</b>
<b>2. EL RECHAZO.....</b>	<b>10</b>
<b>3. LA INMUNOSUPRESION.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1 INTERACCION DE LOS INMUNOSUPRESORES CON LA ALORESPUESTA:.....</b>	<b>16</b>
<b>Inhibidores de la calcineurina: CsA y TRL.....</b>	<b>18</b>
<b>Sirolimus (SRL).....</b>	<b>23</b>
<b>Micofenolato Mofetil (MMF).....</b>	<b>25</b>
<b>4. MONITORIZACION DE FARMACOS.....</b>	<b>27</b>
<b>4.1 FASES DE DESARROLLO DE UN FARMACO: DETERMINACION DE LA DOSIS ESTÁNDAR.....</b>	<b>29</b>
<b>5. MONITORIZACION DE LOS FARMACOS INMUNOSUPRESORES...32</b>	
<b>5.1 MONITORIZACION FARMACOCINETICA DE LOS INMUNOSUPRESORES.....</b>	<b>34</b>
<b>5.2 ESTRATEGIAS DE EVALUACION DE LOS EFECTOS FARMACODINAMICOS.....</b>	<b>36</b>
<b>HIPOTESIS.....</b>	<b>41</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>

**TRABAJOS PUBLICADOS.....45**

**1. MONITORIZACION DEL MICOFENOLATO MOFETIL EN**

**TRANSPLANTADOS RENALES EN ETAPA DE MANTENIMIENTO..46**

O. MILLAN, F. OPPENHEIMER, M. BRUNET, J. VILARDELL, I. ROJO, J. VIVES, J. MARTORELL. *ASSESSMENT OF MYCOPHENOLIC ACID-INDUCED IMMUNOSUPPRESSION: A NEW APPROACH*. CLINICAL CHEMISTRY 2000; 46:9;1376-1383

**1.1 JUSTIFICACION DE LOS EXPERIMENTOS Y SINTESIS DE RESULTADOS.....47**

**1.2 CONCLUSIONES.....51**

**2. MONITORIZACION DE LOS INHIBIDORES DE LA CALCINEURINA EN TERAPIAS COMBINADAS CON MMF EN TRANSPLANTADOS**

**RENALES EN ETAPA DE MANTENIMIENTO.....52**

O. MILLAN, M. BRUNET, J.M. CAMPISTOL, A. FAURA, I. ROJO, E. VIDAL, O. JIMENEZ, J. VIVES, F. OPPENHEIMER, J. MARTORELL. *A PHARMACODYNAMIC APPROACH TO IMMUNOSUPPRESSIVE THERAPIES USING CALCINEURIN INHIBITORS AND MMF*. CLINICAL CHEMISTRY; 2003; 49:11; 1891-1899.

**2.1 JUSTIFICACION DE LOS EXPERIMENTOS Y SINTESIS DE RESULTADOS.....53**

**2.2 CONCLUSIONES.....58**

<b>DATOS EN PRENSA.....</b>	<b>59</b>
<b>1. MONITORIZACION DEL MICOFENOLATO MOFETIL EN</b>	
<b>    PACIENTES VIH POSITIVOS.....</b>	<b>60</b>
<i>O. MILLAN, M. BRUNET, J. MARTORELL, F. GARCIA, E. VIDAL, I. ROJO, M. PLANA, T. GALLART, T. PUMAROLA, J.M. MIRO, J.M. GATELL. PHARMACOKINETICS AND PHAMRNACODYNAMICS OF LOW DOSE MYCOPHENOLATE MOFETIL IN HIV INFECTED PATIENTS TREATED WITH ABACAVIR, EFAVIRENZ AND NELFINAVIR. ACEPTADO EN EL CLINICAL PHARMACOKINETICS. IN PRESS</i>	
<b>    1.1 JUSTIFICACION DE LOS EXPERIMENTOS Y SINTESIS DE</b>	
<b>    RESULTADOS.....</b>	<b>61</b>
<b>    1.2 CONCLUSIONES.....</b>	<b>65</b>
<b>DATOS ADICIONALES: MONITORIZACION FARMACODINAMICA DE DOSIS</b>	
<b>BAJAS DE CsA EN TRANSPLANTADOS RENALES ESTABLES.....</b>	<b>66</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>74</b>
<b>    1. ANEXO 1: TECNICA DE MEDICION DE LA RESPUESTA DE CEM..</b>	<b>75</b>
<b>    2. ANEXO 2: MODIFICACIONES DE LA TECNICA DE MEDICION DE</b>	
<b>    LA ACTIVIDAD DE LA CALCINEURINA.....</b>	<b>77</b>
<b>DISCUSION.....</b>	<b>80</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>90</b>
<b>BIBLIOGRAFIA ADICIONAL.....</b>	<b>93</b>

**INTRODUCCION**

## INTRODUCCION

### 1. INMUNOLOGIA DEL TRANSPLANTE

Los seres vivos en su necesidad de defenderse de las agresiones exteriores han desarrollado un complejo sistema de defensa con capacidad adaptativa, es decir, con capacidad de aprender, es el llamado Sistema Inmunitario (SI). El sistema inmunitario tiene la capacidad de desarrollar respuestas especializadas gracias a que sus células disponen de receptores específicos los cuales tienen capacidad para identificar antígenos y distinguir unos de otros. La activación de estas células con receptores específicos requiere un complejo entramado de interrelaciones celulares, en el que básicamente intervienen:

1. Células que procesan y presentan los antígenos, las células dendríticas.
2. Linfocitos T con receptores antígeno específicos (TCR), secretores de linfocinas facilitadoras de la expansión de los linfocitos T y de la producción de inmunoglobulinas por parte de los linfocitos B.
3. Linfocitos T con receptores antígeno específicos (TCR) con capacidad de eliminar, por citotoxicidad, los linfocitos infectados por virus.
4. Linfocitos B productores de Inmunoglobulinas.

Los receptores antígeno específicos TCR sólo se activan si las proteínas procedentes de organismos agresores son procesadas, fraccionadas, convertidas en péptidos y éstos péptidos son presentados sobre unas proteínas presentadoras, que se localizan en la



membrana de las células, que son las proteínas del sistema de histocompatibilidad o HLA. Así las proteínas HLA constituyen un conjunto de proteínas de membrana cuya función es la de presentar péptidos procedentes de organismos extraños.

De las proteínas HLA existen dos clases diferentes: unas HLA-clase II, que son las encargadas de presentar antígenos extracelulares (generalmente bacterias) a los linfocitos T secretores de linfocinas expansoras (o T Helper o CD4+). Estas proteínas de HLA-clase II se hallan en células presentadoras profesionales, dendríticas, macrófagos, monocitos, células B y algunos endotelios. Y por otro lado encontramos las proteínas HLA-clase I, que presentan antígenos intracelulares (básicamente virus) a los linfocitos citotóxicos y por tanto son la diana de la respuesta T defensiva frente a las células infectadas por virus. Estas proteínas HLA-clase I están presentes en todas las células del organismo (excepto hematíes).

Una moléculas HLA puede presentar varios péptidos virales, pero no a todos los péptidos ya que se requieren unas ciertas interrelaciones moleculares entre los péptidos y la brecha de la proteína HLA que lo acoge.

Si las moléculas de HLA fueran iguales en todos los individuos, el repertorio de péptidos sería limitado e idéntico para todos los miembros de la especie. Afortunadamente, las moléculas de HLA son polimórficas, es decir, diferentes de unos individuos a otros. Ello confiere a la especie un mayor repertorio de péptidos contra los cuales somos capaces de defendernos como especie.

Estas diferencias en las proteínas de la membrana celular que representan una ventaja evolutiva, se convierten en un problema cuando pretendemos transplantar órganos de unos individuos a otros.

El trasplante de un órgano implica que el sistema inmunitario del receptor tendrá que enfrentarse a células vivas del donante, que expresan moléculas de HLA diferentes a las suyas propias y por lo tanto susceptibles de ser reconocidas como extrañas, lo cual provocara una respuesta.

La respuesta del sistema inmunitario que desencadenan los antígenos de HLA tiene dos componentes, el celular y el humoral. La respuesta celular ocurre casi siempre, es difícil su monitorización y es relativamente sensible a la acción de los inmunosupresores clásicos. En cambio la respuesta humoral, la cual viene mediada por los anticuerpos, es sólo evidenciable en aproximadamente uno de cada cuatro receptores, pero es fácilmente monitorizable in vitro. Sin embargo, es muy poco sensible a la acción de los inmunosupresores.

Cuando se transplanta un órgano entre individuos de una misma especie se desencadena lo que se conoce como la alorespuesta. Este término hace referencia al reconocimiento que realizan las células T de polimorfismos genéticamente codificados entre miembros de una misma especie. Las principales dianas de la respuesta inmune a los tejidos alogénicos son las moléculas de HLA que se encuentran en las células del donante. Dicho reconocimiento se produce en los ganglios linfáticos del receptor, por migración de células dendríticas o de los antígenos HLA del donante. Existen 2 vías, que no son mutuamente excluyentes, a través de las cuales se puede producir esta alorespuesta: la vía directa y la vía indirecta que difieren en el mecanismo con el que se llevan a cabo.

En el reconocimiento indirecto las moléculas de HLA del donante son fagocitadas y fraccionadas en péptidos por las Células Presentadoras de Antígeno (APC) del receptor. Una vez fagocitadas, las moléculas de HLA del donante son degradadas en péptidos. Estos péptidos se asocian con las moléculas de HLA de clase I del receptor formándose el

complejo péptido-HLA el cual se dirigirá a la superficie celular donde será reconocido por los linfocitos T a través de su receptor específico para el antígeno (TCR). Mientras que en el reconocimiento directo los antígenos de HLA del donante son reconocidos directamente por los linfocitos T del receptor sobre las células presentadoras del donante y no se precisa del procesamiento del antígeno<sup>(1)</sup>.

Existen datos que apuntan que el reconocimiento indirecto es casi tan importante como el directo en trasplante, cuando inicialmente estaba poco considerado<sup>(2)(3)</sup>.

Ahora bien, el reconocimiento antigénico a través del TCR por sí sólo no es suficiente para desencadenar una respuesta. Es necesario lo que algunos autores denominan una segunda señal para que el linfocito se active. Cuando ambas señales tienen lugar, el linfocito T secreta entre otras, interleucina-2 (IL-2), un potente factor de crecimiento autocrino, que induce la proliferación de las células T, su expansión clonal y la producción de diversas citocinas. La IL-2 secretada se une de manera autocrina a su receptor IL-2R (CD25), provocando una señal que causa la transición desde el estado G1 del ciclo celular a la fase de síntesis (fase S), momento que se produce la síntesis de ADN (fase de replicación) y la división celular. En ausencia de esta segunda señal, las células T no son capaces de responder a nuevas exposiciones al antígeno y fracasan en la producción de citocinas. Normalmente esta segunda señal es proporcionada vía CD28. Los ligandos con capacidad de unión a CD28 son CD80 (o B7.1) y CD86 (o B7.2). El CD80 está constitutivamente expresado en células dendríticas y ambos, CD80 y CD86, aumentan su expresión cuando las APC se activan.

Interacciones CD40-CD154 (CD40 Ligando) proporcionan otra importante señal coestimuladora para la activación de las células T. El linfocito T CD8 se activa al unirse al antígeno extraño HLA de clase I, y expresa en su superficie receptores de IL-2.

Posteriormente el linfocito CD8 prolifera por la acción de la IL-2 secretada por los linfocitos T CD4 activados, dando lugar a los linfocitos T con actividad citotóxica, que infiltran el injerto y desempeñan un papel fundamental en la destrucción del mismo.

## **2. EL RECHAZO**

En ausencia de inmunosupresión existen diferentes mecanismos celulares por los cuales el órgano injertado se ve atacado por el sistema inmunitario del receptor. Una vez que se ha producido el reconocimiento de los aloantígenos se desencadenan toda una serie de mecanismos efectores que involucran a diferentes poblaciones celulares: Por un lado nos encontramos la acción citotóxica de los linfocitos T citotóxicos específicos (CTL). Su mecanismo efector puede tener lugar por 2 vías diferentes: 1/ Por secreción de perforinas y granzima B, los cuales inducen la formación de poros en la membrana de la célula diana<sup>(4)</sup>; y 2/ Por interacción del CD95L (Fas Ligando) con la molécula inductora de apoptosis el CD95 (Fas) expresada en la célula diana<sup>(5)</sup>. Ambos mecanismos activan las caspasas, provocando la fragmentación del ADN y la muerte por apoptosis de la célula.

Los mecanismos de citotoxicidad son tan importantes en el rechazo que se ha visto que la elevación de ARNm para Fas-L, perforina y granzima B en las biopsias renales o incluso en orina constituyen muy buenos marcadores de la existencia de rechazo<sup>(6)(7)</sup>.

Otro mecanismo efector es la Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos (ADCC). En presencia de anticuerpos, las células con receptores para el Fc de las inmunoglobulinas (CD16+), los pueden utilizar como elementos de reconocimiento, provocando la lisis de las células diana por una vía independiente del complemento.

Finalmente debe ser considerada la acción citotóxica de las células Natural Killer (NK). El reconocimiento de las células NK lo realizan a través de unos receptores denominados KIR (Killer Inhibitory Receptor), los cuales detectan la ausencia de determinadas secuencias de aminoácidos en los antígenos HLA de las células diana del donante. Su mecanismo efector es parecido al de las CTL. Las células NK juegan un papel importante en la defensa frente a virus que son capaces de evitar la expresión de las moléculas de HLA y por tanto que evaden la respuesta de las CTL<sup>(8)</sup>.

En ausencia de inmunosupresión, el órgano sólido que es rechazado, se caracteriza por tener un infiltrado denso de leucocitos del huésped, el cual provoca la necrosis celular del injerto y/o la trombosis vascular del mismo. En receptores, que previamente no han sido expuestos a aloantígenos del injerto (por transfusiones, trasplantes previos, embarazos), esta respuesta es la llamada de **Rechazo Agudo**. El rechazo agudo en presencia de inmunosupresión, si se produce, normalmente tiene lugar entre la primera y segunda semana después del trasplante. Fundamentalmente es consecuencia de la activación de las células T, que a continuación desencadenan la activación de los diferentes mecanismos efectores. Los actuales protocolos inmunosupresores pueden prevenir o revertir la mayoría de episodios de rechazo agudo. La incidencia del rechazo agudo en transplantados renales esta por debajo del 10% para algunas combinaciones de fármacos. Sin embargo, a pesar que estos agentes pueden limitar el rechazo agudo, el injerto puede verse todavía sometido a un tipo de rechazo más lento el cual puede no manifestarse hasta meses o años después de la ejecución del trasplante: el **Rechazo Crónico**, el cual se caracteriza porque los vasos sanguíneos del injerto se van engrosando y terminan obstruyéndose. Este rechazo puede ser debido a diferentes causas, como a una reacción de rechazo de baja intensidad mediada por células o al depósito de anticuerpos o inmunocomplejos sobre el tejido injertado.

La relación que existe entre el rechazo agudo y el crónico todavía no está del todo clara, sin embargo, incluso cuando los tratamientos inmunosupresores consiguen revertir los episodios de rechazo agudo, la aparición de estos episodios aumenta la probabilidad de que se desarrolle en un futuro el rechazo crónico<sup>(9)</sup>.

Estudios a nivel molecular han revelado la participación de diferentes citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión durante el proceso de rechazo<sup>(10)</sup>. Cuando se produce la infiltración del injerto, la retención de linfocitos, macrófagos y polimorfonucleares en un determinado territorio vascular para su posterior migración a través del endotelio del órgano diana, requiere de la expresión de moléculas de adhesión tanto en los linfocitos como en el endotelio. Cuando los linfocitos se activan aumenta la expresión de LFA-1 y se induce la expresión de VLA4. Al mismo tiempo, disminuye la L-Selectina, lo que permite a los linfocitos que se evadan de los territorios linfáticos y recirculen al torrente sanguíneo. En los endotelios del órgano injertado también se expresan moléculas de adhesión. La inducción de estas moléculas de adhesión viene determinada por la presencia de interleucinas, principalmente: IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-1. Durante el rechazo es frecuente que aumente la expresión de ICAM-1, ligando de LFA-1, VCAM, ligando de VLA4 y E-Selectina. Cuando tiene lugar la migración de los linfocitos al parénquima del órgano injertado también participan las quimiocinas. Las quimiocinas son una familia de proteínas que determinan el reclutamiento de los linfocitos. Recientes observaciones en modelos animales y en biopsias de tejidos humanos han demostrado un aumento en la expresión de algunas quimiocinas en los injertos de órganos sólidos durante el rechazo<sup>(11)(12)</sup>.

Las interacciones que se producen entre los linfocitos y las células endoteliales son por tanto cruciales en la iniciación de una respuesta inmune efectiva, como es el rechazo del aloinjerto. De estas interacciones complejas que involucran a múltiples citocinas, quimiocinas y a sus receptores, habría que destacar dos: 1/ Las interacciones de adhesión entre los linfocitos circulantes y las células del endotelio vascular; y 2/ Las interacciones a nivel molecular que dan lugar a señales funcionales que son esenciales para la activación bi-direccional de los linfocitos T y las células endoteliales.

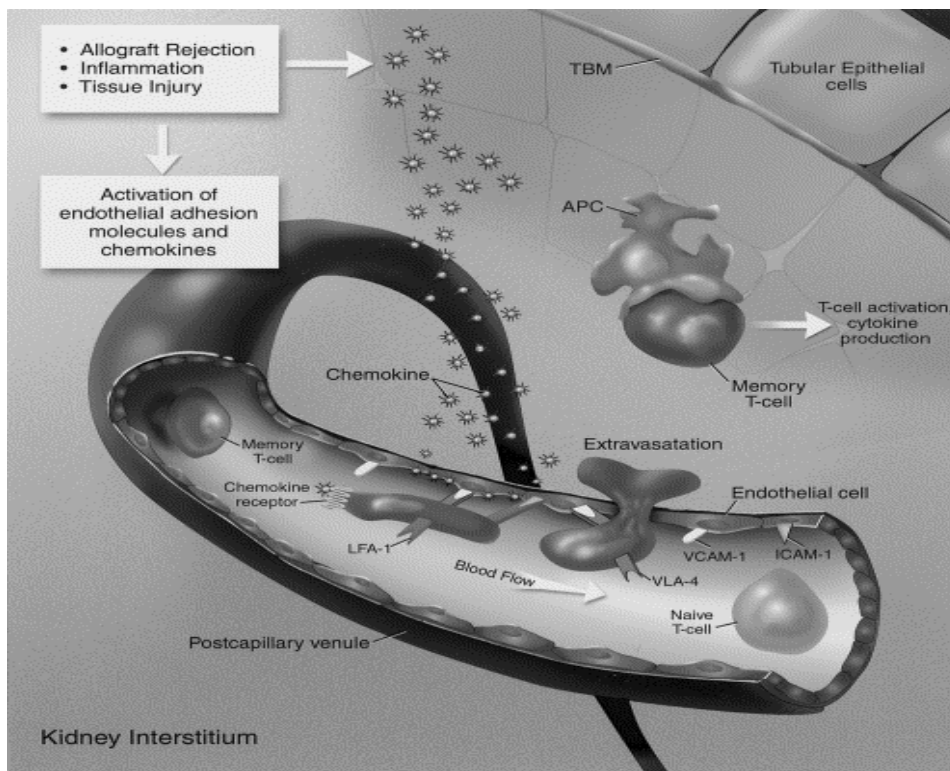


Figura 1. Extravasación de linfocitos T aloreactivos hacia la zona intersticial del riñón durante el rechazo agudo. El proceso de inflamación y daño tisular que provoca el rechazo del aloinjerto provoca a su vez el aumento de expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1; VCAM-1) y quimiocinas. Se produce el reclutamiento y migración y extravasación de los linfocitos.

Existen ensayos que pueden ser utilizados para monitorizar la alorespuesta durante el periodo post-transplante, el desarrollo de anticuerpos donantes específicos y/o paneles reactivos anti-HLA directamente contra los antígenos del injerto así como diversos ensayos celulares. Se ha observado que pacientes que no producen anticuerpos anti-HLA tienen una supervivencia del injerto 5 veces mayor que los que si los producen<sup>(13)</sup>.

Otro tipo de rechazo, es el que se produce con gran rapidez, dentro de las primeras 24h post-transplante, en pacientes que poseen previamente anticuerpos frente los antígenos HLA del injerto: es el **Rechazo Hiperagudo**. Este tipo de rechazo es actualmente muy poco frecuente gracias al exhaustivo control de los anticuerpos anti-HLA que se realiza previamente al transplante. El sistema inmunológico de un individuo puede entrar en contacto con antígenos de HLA de otro individuo (embarazo, transfusión, transplante). En tal caso el receptor desencadena en un 25% de los casos una respuesta con producción de anticuerpos. Esta respuesta es fácilmente monitorizable in vitro mediante el estudio de los anticuerpos frente a panel o PRA (Panel Reacting Antibodies), en el que se realiza una prueba cruzada, entre el suero del receptor y los linfocitos del donante, previa al transplante. La realización de esta prueba ha hecho que la incidencia de dicho rechazo en la actualidad sea mínima. La presencia de estos anticuerpos, capaces de reaccionar contra el donante en el momento del transplante, determinan la aparición del rechazo hiperagudo. La acción que producen es fundamentalmente vascular, en la que se produce la activación de la cascada del complemento. De producirse este tipo de rechazo, el órgano transplantado normalmente es irrecuperable. En caso de que aparezcan anticuerpos una vez ya se ha realizado el transplante se asocia a un rechazo vascular en el que posiblemente interviene el fenómeno de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Este rechazo vascular es poco sensible a los inmunosupresores clásicos.



### **3. LA INMUNOSUPRESION**

El objetivo de administrar fármacos inmunosupresores es evitar el rechazo agudo y crónico del órgano transplantado. La inmunosupresión lleva siempre asociada un factor de riesgo para el receptor, ya que afecta a la capacidad de defensa de éste frente a las infecciones y al desarrollo de tumores. Por esto unas de las claves que hacen que un transplante sea exitoso es una correcta modulación de la inmunosupresión, de modo que se mantenga un equilibrio entre el riesgo de aparición de rechazo y la aparición de infecciones.

La inmunosupresión debe adaptarse a las distintas fases post-transplante. Así, en la fase inicial o de inducción, en que la capacidad de respuesta del receptor es máxima, las dosis requeridas de los diferentes inmunosupresores son máximas. Una vez superadas las primeras semanas disminuye la inmunoreactividad y se entra en una fase de mantenimiento, pudiéndose entonces disminuir las dosis de inmunosupresión al mínimo necesario. El problema está en establecer cual es la dosis mínima necesaria para cada individuo. Un punto muy importante a tener en cuenta son los efectos secundarios de los distintos inmunosupresores, los cuales se deben valorar en el momento de elegir el mejor inmunosupresor para un receptor determinado.

### 3.1 INTERACCION DE LOS INMUNOSUPRESORES CON LA ALORESPUESTA

El inmunosupresor ideal debe cumplir 2 requisitos: 1/ Evitar la expansión clonal de los linfocitos sin afectar a otras células; 2/ Bloquear procesos característicos de los linfocitos pero no de otras células.

La respuesta inmunológica es específica, es decir, depende de clonas linfocitarias con receptores específicos para un determinado antígeno. La capacidad de desarrollar o no una respuesta de rechazo depende de la capacidad de que un linfocito con un determinado receptor pueda proliferar y expandirse, dando lugar a una clona más o menos amplia de células con el mismo receptor que su progenitora. La expansión clonal esta mediada por factores autocrinos. El más representativo de ellos es la IL-2, secretada por las células CD4+ TH1, la cual es esencial para la expansión de los linfocitos citotóxicos CD8+.

La expansión clonal requiere de la duplicación celular y, por tanto, requiere de la duplicación del ADN.

Los estudios que se han llevado a cabo en el conocimiento de la inmunobiología del rechazo han permitido conocer los mecanismos de actuación de los fármacos y, al mismo tiempo, conocer cuales son los puntos clave de la respuesta inmune cuyo bloqueo es más efectivo para evitar el rechazo.

Dentro del proceso de expansión clonal de los linfocitos destacan 3 puntos:

1/ La transmisión de la señal TCR específica tras el reconocimiento del antígeno

2/ La transmisión al núcleo de señales: IL2-IL2R; IL4-IL4R; IL10-IL10R;

IFN $\gamma$ -IFN $\gamma$ R1; TNF $\alpha$ -TNF $\alpha$ R1/R2...

3/ La duplicación del ADN

Existen diversos criterios de clasificación de los diferentes agentes inmunosupresores que se usan en la actualidad. Si consideramos el punto de bloqueo del proceso de expansión clonal linfocitaria nos encontramos con la siguiente clasificación:

**Tabla 1**

<b>MECANISMO</b>	<b>INMUNOSUPRESOR</b>
Bloqueando la transmisión al núcleo de la señal TCR específica	Ciclosporina A (CsA) Tacrolimus (TRL)
Bloqueando la transmisión de la señal producida por la interacción entre las interleucinas y su receptor (ej. IL2-IL2R)	Sirolimus (SRL)
Bloqueando la duplicación de ADN	Micofenolato Mofetil (MMF)
Actuando sobre la inflamación Inhibidores de la síntesis de IL-1	Corticoesteroides

No entrare a explicar todos los mecanismos de acción de los diferentes inmunosupresores que se están utilizando, porque tampoco es el objetivo de esta tesis. Me centrare en aquellos fármacos inmunosupresores que si han sido objeto de estudio en esta tesis: Inhibidores de la Calcineurina (Ciclosporina A y Tacrolimus) y el Micofenolato Mofetil, y haré referencia al Sirolimus por su reciente utilización en las terapias inmunosupresoras.

### **Inhibidores de la Calcineurina: Ciclosporina A (CsA) y Tacrolimus (TRL)**

La activación de la señal TCR específica activa una serie de proteínas del citoplasma, que una vez activadas se desplazan al núcleo. Estas proteínas en estado activo se unen a la zona promotora de determinados genes activando la producción de ARNm de determinadas interleucinas. Este ARNm se traducirá a proteína en los ribosomas. Las interleucinas son excretadas e inician una nueva cascada de señales en las células a través de los receptores adecuados.

Cuando se produce la activación linfocitaria se libera desde el retículo endoplasmático calcio, aumentando por tanto su concentración intracelular, activándose una serie de proteínas sensibles al calcio como la calmodulina. La calmodulina se une a una serina-treonina fosfatasa calcio-calmodulina dependiente llamada Calcineurina (o PP2B).

La calcineurina es una fosfatasa heterodimérica formada por la asociación de 2 subunidades: la subunidad Reguladora de 19kDa (Calcineurina B), donde se une el calcio; y la subunidad Catalítica de 60kDa (Calcineurina A) que contiene el dominio catalítico, el dominio de unión a la subunidad reguladora, el dominio de unión a calmodulina y el dominio autoinhibidor<sup>(14)</sup>.

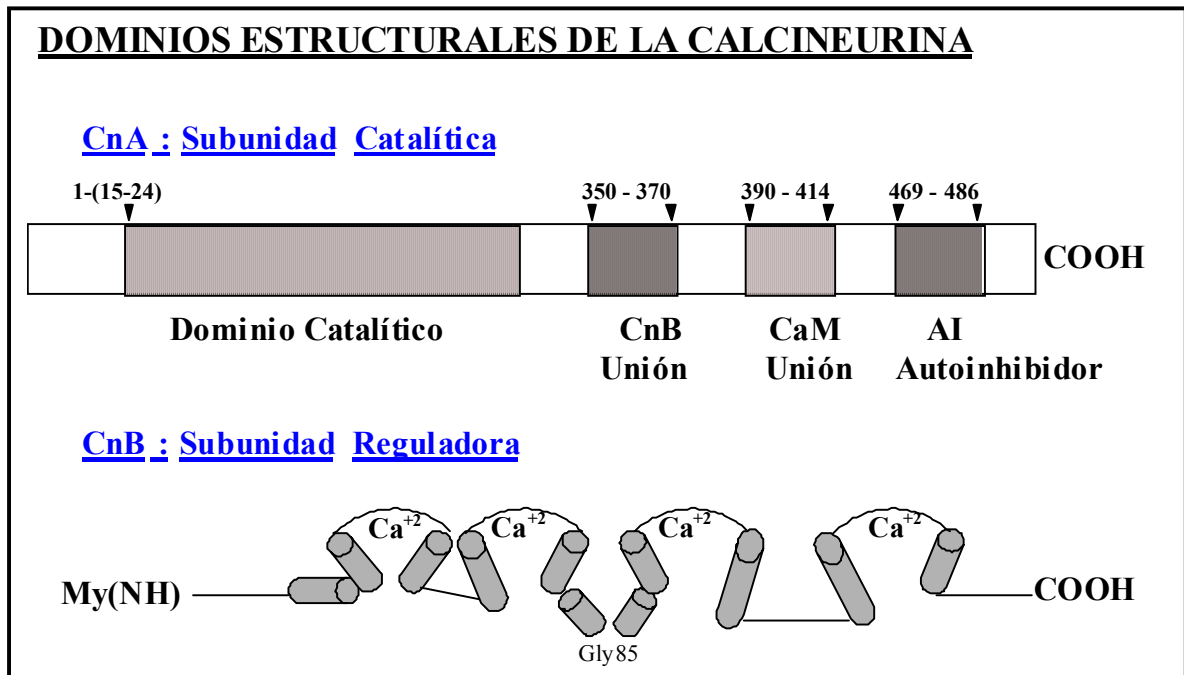


Figura 2. Dominios estructurales de la fosfatasa calcineurina. La parte superior representa la subunidad A (CnA), con los 4 dominios. La parte inferior representa la subunidad B (CnB) con los puntos de unión a calcio.

El principal papel que desempeña la calcineurina en la activación de las células T involucra la regulación de los factores de transcripción nuclear de las células T: los NFAT<sup>(15)</sup>. Los NFAT son una familia de factores de transcripción que incluye a 5 miembros, 4 de ellos (NFAT1, NFAT2, NFAT3, NFAT4) están regulados por la calcineurina, mientras que el NFAT5 está regulado por shock osmótico<sup>(16)</sup>. Una revisión realizada por Crabtree en 1999 y publicada en el Cell<sup>(17)</sup> ponía de manifiesto que estas proteínas NFAT vienen reguladas por procesos reversibles y cíclicos de desfosforilación y refosforilación. En su forma fosforilada estos factores son inactivos y se localizan preferentemente en el citoplasma del linfocito, mientras que en estado desfosforilado se dirigen al núcleo donde se unen con su otra subunidad nuclear siendo capaces de activar la expresión de genes específicos para la

síntesis de ARNm y ADN de las nuevas linfocinas como IL-2, IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$ , GM-CSF, IL-3, IL-13, TNF- $\alpha$ .

Cuando se produce una estimulación a través de los receptores unidos a fosfolipasa C (PLC) se produce una movilización de calcio. El inositol trifosfato (IP3) actúa sobre los receptores específicos del retículo endoplasmático estimulando la liberación de calcio. Paralelo se abre en la membrana un canal que da lugar a un flujo continuo de calcio hacia el citoplasma del linfocito activado. Una elevada concentración de calcio en el citoplasma activa a la fosfatasa calcineurina. Concretamente, un incremento significativo del calcio intracelular activa a la calmodulina y a la subunidad B de la calcineurina, de manera que esta se une a la subunidad A, liberándose su dominio autoinhibidor y abriéndose el lugar activo de la fosfatasa hasta esos momentos inaccesible. Una vez defosforila a los NFAT estos pueden migrar al núcleo e iniciar su actividad transcripcional. La actividad de la fosfatasa calcineurina es necesaria de una forma continuada para mantener los factores NFAT en el núcleo en un estado con gran afinidad hacia el ADN<sup>(18)</sup>. El papel que la calcineurina desempeña en el núcleo es el de proteger a los NFAT defosforilados de la acción de las quinasas, en especial de la glucógeno sintetasa kinasa (GSK) el cual tiene capacidad de refosforilar a los NFAT, y favorecer por tanto su expulsión de nuevo hacia el citoplasma inactivándolos.

La IL-2 se secreta y su receptor específico IL-2R (CD25) se expresa en la superficie de las células T colaboradoras y citotóxicas. La IL-2 se une a su receptor produciendo una señal que causa la transición desde el estado G1 a la fase de síntesis S, del ciclo celular, momento en el que se sintetiza el ADN, fase de replicación que da lugar a la expansión clonal de los linfocitos.

En la actualidad dentro de la terapia inmunosupresora para la prevención del rechazo del injerto se están utilizando 2 fármacos con capacidad de inhibir la actividad de la fosfatasa calcineurina: Ciclosporina A (CsA) y Tacrolimus (TRL).

La CsA fue descubierta por Borel en 1972. Cuando se empezó a utilizar clínicamente se mejoró sustancialmente la supervivencia del transplante.

#### Mecanismo de acción de la CsA

La CsA es un inmunosupresor, que tras su administración, se almacena en más de un 70% en los hematíes. Su metabolismo se produce principalmente a través del sistema hepático del citocromo P450 (CYP450) (Más del 80% a través del CYP3A4), llegándose a obtener hasta 30 metabolitos diferentes por hidrosilación, demetilación, sulfatación..., gran parte de ellos se obtienen de la metabolización que sufren a su vez los metabolitos principales de la CsA. De estos 30 metabolitos entre un 10-20% presentan actividad inmunosupresora. La CsA también es sustrato de la glicoproteína P intestinal (P-gp), producto del gen MDR (multidrug resistance), la cual actúa como una bomba de expulsión del fármaco del compartimento citoplasmático, disminuyendo su concentración en las células y por tanto disminuyendo su capacidad de acción<sup>(19)(20)</sup>. Por lo que no sorprende que debido a la participación tanto de la vía del CYP450 como de la P-gp en la metabolización de la CsA exista una cierta variación interindividual tras su administración.

La CsA es un profármaco ya que necesita de una proteína intermedia citoplasmática, la ciclofilina, para poder actuar. Liu y colaboradores<sup>(21)</sup> describieron que es el complejo CsA-ciclofilina, y no la ciclofilina sola, el que tiene capacidad de asociarse con la calcineurina inhibiendo su actividad fosfatasa. En consecuencia se inhibe la desfosforilación de los

factores de transcripción nuclear (NFAT) de la célula T activadas, impidiendo su translocación al núcleo y por tanto bloqueando la transcripción del ARNm necesaria para la síntesis de nuevas interleucinas como la IL-2. El resultado final es la inhibición de la proliferación. Este es un bloqueo con alta especificidad para los linfocitos T.

Se ha descrito que la CsA además de inhibir la proliferación linfocitaria, también provoca una disminución en la expresión de moléculas de adhesión (VCAM, E-Selectina) en células endoteliales, las cuales son las primeras dianas en el proceso de rechazo<sup>(22)</sup>. Se ha observado que la CsA inhibe la síntesis de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , 2 citocinas que juegan un papel importante en el reclutamiento y activación del sistema inmunitario durante el proceso de rechazo. Todo ello contribuye a que la CsA sea un fármaco eficaz en la prevención del rechazo. Sin embargo los efectos secundarios más importantes son la toxicidad sobre el riñón (nefrotoxicidad) y sobre el sistema nervioso central. La mayoría de ellos son leves y reversibles disminuyendo la dosis de CsA. Otros son impredecibles y no previsibles, debido a la diferente susceptibilidad personal, pero la complicación más importante sigue siendo la toxicidad renal.

El Tacrolimus (TRL) o FK506 fue descubierto en 1984, aunque no se empezó a utilizar clínicamente hasta 1989, primero como alternativa a la CsA, en los rechazos crónicos, y posteriormente como un inmunosupresor<sup>(23)(24)</sup>.



### Mecanismo de acción del TRL

Su mecanismo de acción es similar a de la CsA, pero entre 10 a 50 veces más potente. Una explicación que se da a este hecho es que la afinidad que tienen el TRL por su inmunofilina es mucho más fuerte que la que tiene la CsA por la suya<sup>(25)</sup>. Se han descrito hasta 9 metabolitos derivados fundamentalmente del sistema hepático del citocromo P450, principalmente del CYP3A4 y del CYP3A5<sup>(26)</sup>. El TRL, como ocurre con la CsA, también es sustrato de la proteína P-gp<sup>(19)</sup>. Su eliminación es básicamente a través de la bilis.

Al igual que la CsA, es un profármaco ya que para que actúe se tiene que unir a una inmunofilina presente en el citoplasma, que es la FKBP-12 (FK-Binding Protein). Es entonces cuando tiene capacidad de asociarse con la calcineurina, inhibiendo su actividad fosfatasa de la misma manera que lo hace la CsA. La toxicidad asociada a TRL es similar a la de la CsA. Los efectos secundarios más importantes son la nefrotoxicidad, la toxicidad neurológica y la hiperglucemia.

Otro fármaco de más reciente uso en las terapias inmunosupresoras es el Sirolimus, cuyo mecanismo de acción se centra en otro punto básico de la alorespuesta.

### Sirolimus

El Sirolimus o Rapamicina, fue introducida para su uso clínico a finales de los 90. Su metabolismo al igual que ocurre con los inhibidores de la calcineurina descritos anteriormente, está mediado por el sistema hepático e intestinal del CYP450 (CYP3A4/5).

Se han identificado más de 10 metabolitos, algunos de ellos con una muy baja actividad inmunosupresora “in vitro”<sup>(27)</sup>.

Actúa al nivel de la transmisión al núcleo de la señal generada por la unión de la IL-2 con su receptor (IL-2R) determina el inicio de la duplicación del ADN<sup>(28)(29)</sup>. El TOR es una proteína necesaria para transmitir la señal proporcionada por la unión de IL-2 con IL-2R. Activa la kinasa P70S6, la cual es responsable, de una forma indirecta, de la síntesis de proteínas necesarias para que el ciclo celular progrese. También se ha descrito que el sirolimus inhibe la degradación de p27<sup>kip1</sup>, un inhibidor de las ciclinas dependientes de quinasa (CDK), lo que conlleva que el ciclo celular se detenga en G1<sup>(30)</sup>. Al igual que la CsA y el TRL debe unirse a una inmunofilina presente en el citoplasma para que desencadene su mecanismo de acción. Esta inmunofilina es la FK-Binding Protein, la misma que la del TRL. A pesar de compartir la misma inmunofilina con el TRL, no tiene ningún efecto inhibitorio sobre calcineurina. Una vez formado el complejo inmunosupresor-inmunofilina secuestra a la proteína TOR y evita que la señal IL-2-IL2R llegue al núcleo y por tanto que se inicie la duplicación del ADN. Los efectos del sirolimus no están limitados a la señal IL-2-IL2R, sino que también es capaz de inhibir otras señales inducidas por otras interleucinas como IL-4, IL-12<sup>(31)</sup>, IL-7<sup>(32)</sup> o IL-15<sup>(33)</sup>.

Sus efectos tóxicos son totalmente diferentes a los producidos por los inhibidores de la calcineurina, no es nefrotóxica, sin embargo es mielosupresiva<sup>(34)</sup>. Se ha descrito que provoca un aumento de los niveles de lípidos en sangre (hiperlipidemia), en especial lipoproteínas de baja densidad (LDL), colesterol y triglicéridos. Esta hiperlipidemia es dosis dependiente y se puede revertir en 1 o 2 meses tras suspender el tratamiento con sirolimus<sup>(35)(36)</sup>.

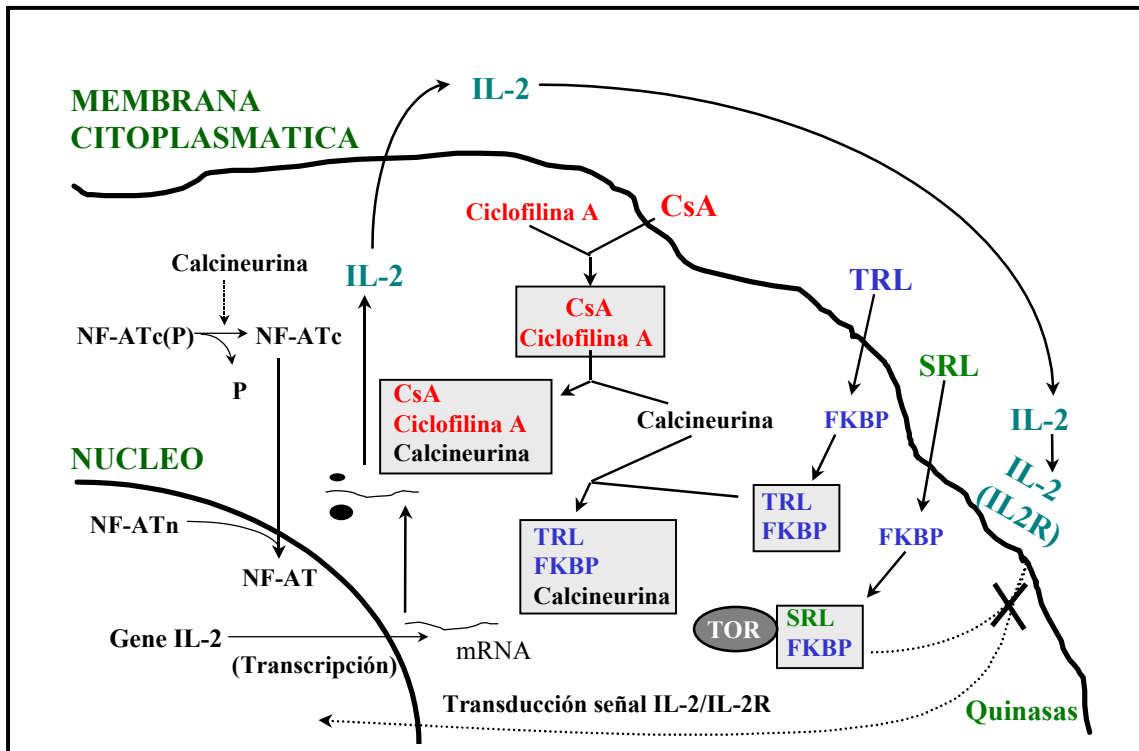


Figura 3. Mecanismo de acción de los inmunosupresores: Ciclosporina A (CsA), Tacrolimus (TRL) y Sirolimus (SRL)

Finalmente otro inmunosupresor cuya introducción en la terapia inmunosupresora ha aportado importantes avances en la prevención del rechazo es el Micofenolato Mofetil.

### Micofenolato Mofetil (MMF)

El MMF se introdujo en la terapia inmunosupresora a finales de los 90. Clásicamente para inhibir de forma directa la duplicación de ADN se utilizaba un análogo de las purinas, la azatioprina, sin embargo, este mecanismo afectaba también a otras células, especialmente polimorfonucleares. Actualmente el MMF se utiliza como alternativa a la azatioprina.

### Mecanismo de acción del MMF

El MMF es un profármaco, el cual una vez que es hidrolizado por la acción que realizan las esterasas se obtiene su principal metabolito activo que es el Acido Micofenólico (MPA), el cual se almacena en más de un 99% en el compartimento del plasma unido a albúmina<sup>(37)(38)</sup>. Se producen otros metabolitos como el MPAG (Mycophenloic acid-glucuronide), el cual se obtiene tras la acción del UDP-glucuronosyl transferasa sobre el MPA. Existe una cierta controversia si este metabolito es o no es activo, aunque hay más datos que apuntan a que se trata de un metabolito inactivo<sup>(39)</sup>. También se han descrito otros 3 metabolitos más del MPA: el M1 (7-O-Glucoside conjugate), el M-2 (Acyl glucuronide conjugate) y el M-3. El M-3, el cual es un metabolito activo, sólo se encuentra a concentraciones muy bajas (trazas) en el plasma. Es el único metabolito del MPA que deriva de la ruta hepática del sistema del citocromo P450, concretamente del CYP3A4<sup>(40)</sup>. El MMF es un fármaco que presenta recirculación enterohepática, de ahí que en ocasiones se detecte un segundo pico de absorción tras las 6-12h de su administración. El MPA fundamentalmente se elimina a través del intestino por las heces mientras que el MPAG es a través de la orina.

El MPA es un potente inhibidor de la inosin monofosfato dehidrogenasa (IMPDH), una enzima clave en la síntesis de novo de guanosin nucleótidos (GTP), a partir de xantina-monofosfato (XMP)<sup>(41)</sup>. Los linfocitos dependen más que otras células de la síntesis de novo de purinas ya que carecen de vía de rescate. La inhibición del MPA sobre la enzima IMPDH es de manera no competitiva, reversible y muy potente, especialmente en linfocitos activados. Existen 2 isoformas de este enzima la de tipo I o constitutiva que se expresa

fundamentalmente en linfocitos no activados, y la de tipo II o inducible la cual se expresa fundamentalmente en los linfocitos activados. Se ha visto que el MPA es 5 veces más eficaz inhibiendo la de tipo II que la de tipo I, por lo que es especialmente eficaz inhibiendo la expansión clonal de los linfocitos activados<sup>(42)</sup>. La depleción de GTP inhibe además la inducción de la ciclina D3, un componente esencial de las ciclinas dependientes de quinasas (CDK) e inhibe la degradación de p27<sup>kip1</sup>, un inhibidor de las CDK, lo que conlleva a la detención del ciclo celular durante la fase de G1<sup>(43)</sup>.

Se ha descrito que el MPA inhibe la glicosilación y la expresión de algunas moléculas de adhesión, provocando la disminución del reclutamiento de linfocitos y monocitos en los puntos de inflamación y rechazo<sup>(44)</sup>.

Los efectos adversos más frecuentes del MMF afectan al tracto gastrointestinal y puede producir leucopenia y anemia. No es mielotóxico, nefrotóxico ni hepatotóxico, siendo los efectos secundarios más habituales las náuseas, vómitos y diarrea.

#### **4. MONITORIZACION DE FARMACOS**

La respuesta terapéutica o tóxica a los fármacos varía de unos pacientes a otros en función de las características del fármaco, de la forma que se administre, de las características del paciente y de su enfermedad y de las posibles interacciones con otros fármacos que se administren simultáneamente. Todos estos factores hacen que la dosis “convencional” o “estándar” pueda ser insuficiente en unos pacientes y tóxica en otros.

Se denomina ventana terapéutica de un fármaco al rango de concentraciones a las cuales se alcanza el efecto farmacológico deseado en ausencia de efectos adversos en la mayoría de pacientes. Y se denomina índice terapéutico a la relación que existe entre la dosis tóxica y

la terapéutica. No es un término absoluto porque varía en función del efecto tóxico que se considere, de los muchos que puede provocar un fármaco. Cuanto mayor sea el índice terapéutico de un fármaco, menor será su riesgo y mayor la tranquilidad con que se puede aumentar la dosis hasta conseguir el efecto terapéutico con la intensidad que se desea<sup>(45)</sup>.

Una dosis considerada estándar, sólo será adecuada para un gran número de pacientes cuando el índice terapéutico del fármaco sea grande, ya que se podrá utilizar dosis altas (eficaces en todos los pacientes) sin que aparezcan efectos tóxicos. El problema surge cuando el índice terapéutico es pequeño, ya que es cuando existe el peligro de que aparezcan efectos tóxicos al aumentar ligeramente las dosis. En estas circunstancias es adecuado realizar una monitorización de los fármacos, la cual consiste en la evaluación de la eficacia y de la toxicidad de los fármacos en la práctica clínica. Su finalidad no es otra que intentar individualizar el tratamiento farmacológico, adaptándolo a las necesidades de cada paciente.

Cuando se monitoriza un fármaco se debe diferenciar entre 2 aspectos: uno es lo que se conoce como **Farmacocinética**, la cual estudia los procesos y factores que determinan la cantidad de fármaco presente en el sitio en que debe ejercer su efecto biológico en cada momento, a partir de la aplicación del fármaco sobre el organismo vivo. Ello requiere el análisis de las concentraciones de fármacos y sus metabolitos en los líquidos orgánicos. El otro aspecto es lo que se conoce como **Farmacodinamia**, la cual evalúa las acciones y los efectos de los fármacos. Dicho con otras palabras, la farmacocinética estudia que le hace el cuerpo al fármaco (absorción, distribución, metabolización, eliminación), mientras que la farmacodinamia estudia que le hace el fármaco al cuerpo (respuesta). El objetivo final es el conocer la interacción del fármaco a nivel molecular, pero no menos importante es conocer

las consecuencias de dicha interacción en las células y los sistemas, y en los grandes procesos de regulación.

La variabilidad en la respuesta a los fármacos depende de múltiples factores que alteran por un lado a los parámetros farmacocinéticos, modificando los niveles plasmáticos, y por otro lado a los parámetros farmacodinámicos, alterando la sensibilidad a un determinado nivel.

#### 4.1 FASES DE DESARROLLO DE UN FARMACO: DETERMINACION DE LA DOSIS ESTANDAR

El desarrollo de un nuevo fármaco se inicia en la Fase 0 de evaluación pre-clínica, continúa en las fases I, II y III de evaluación clínica pre-comercialización y finaliza en la fase IV de evaluación clínica post-comercialización. En la actualidad se pide al nuevo fármaco que, además, de ser eficaz y seguro, aporte algo a los tratamientos ya existentes como: mayor eficacia, menor riesgo, mejor cumplimiento terapéutico, menor probabilidad de errores, mayor facilidad de dosificación o mayor comodidad de administración.

Cada fase del desarrollo debe alcanzar unos objetivos:

##### **(a) Fase 0 o Pre-Clínica**

Su objetivo es estudiar las acciones farmacológicas del nuevo fármaco, con el fin de definir su índice terapéutico. Se suelen realizar en varios modelos animales, y se debe destacar la dificultad que existe en extrapolar los datos de las especies animales a la humana.

**(b) Fase I**

Su objetivo es verificar la seguridad del nuevo fármaco en el ser humano y establecer un intervalo de dosis seguras. Además se estudian aspectos farmacocinéticos como biodisponibilidad, cinética de eliminación y tiempo que tarda en alcanzarse el nivel estable, necesarios para establecer una pauta de administración en posteriores ensayos clínicos. Se realizan en voluntarios adultos sanos, con su consentimiento escrito.

**(c) Fase II**

Su objetivo es demostrar la eficacia del nuevo fármaco, delimitar un intervalo de dosis terapéuticas y la variabilidad individual dentro de ese intervalo, verificar la seguridad de dichas dosis y valorar la relación eficacia-toxicidad. Al igual que en la Fase I se necesita el consentimiento informado.

**(d) Fase III**

Su objetivo es verificar la eficacia y la seguridad del nuevo fármaco a corto y largo plazo, en un número mayor de pacientes (entre 100 y 1000) y en condiciones clínico-terapéuticas más próximas a las de la población en que se utilizará en el futuro. Además se compara el nuevo fármaco con otros tratamientos en uso y se analizan otros datos como el número de tomas al día y necesidad de controles analíticos.

**(e) Fase IV Post-comercialización**

Las fases de pre-comercialización incluyen un número realmente pequeño de pacientes, insuficiente para definir las reacciones adversas poco frecuentes durante un tiempo relativamente corto. Por ello, el objetivo de la Fase IV es vigilar la aparición de



reacciones adversas que no se hayan detectado en las fases de pre-comercialización debido a su baja frecuencia o que se requieran un tiempo de exposición prolongado para su aparición, así como los efectos teratogénicos y las interacciones.

La relación que se establece entre los niveles de un fármaco y los efectos terapéuticos o tóxicos del mismo, se puede ajustar a una curva sigmoidea: a partir de un determinado nivel comienzan a observarse los efectos, aumentando con los niveles hasta llegar a un límite por encima del cual no se consigue mayor eficacia o, incluso, puede llegar a disminuir. El intervalo terapéutico se define como el intervalo de niveles de un fármaco en que la mayor parte de los pacientes tienen una buena respuesta sin toxicidad. Por debajo de este intervalo será frecuente que el tratamiento sea ineficaz, mientras que por encima de éste será frecuente que se observen efectos tóxicos. Sin embargo, esto es válido para la mayoría de la población pero habrá pacientes que podrán responder a niveles por debajo de este intervalo y otros precisaran niveles por encima de éste.

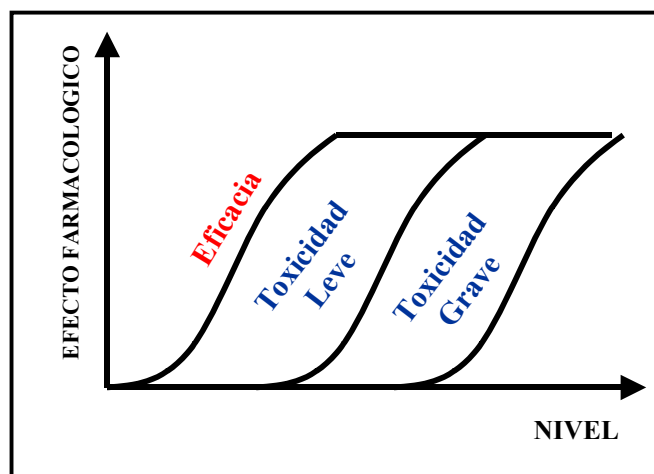


Figura 4. Relación nivel-efecto versus eficacia-toxicidad

La existencia de diversos factores que pueden alterar la relación nivel-efecto hace que el intervalo terapéutico se deba interpretar de una forma flexible. Es por ello que lo que se acaba buscando en una monitorización individualizada en la medida de lo posible.

## **5. MONITORIZACION DE LOS FARMACOS INMUNOSUPRESORES**

La administración de inmunosupresores es imprescindible para mantener los aloinjertos libres de rechazo. Su utilización en el trasplante requiere tratamientos indefinidos, cuyo fracaso implica la lesión del injerto de consecuencias inmediatas o diferidas. El difícil equilibrio entre los efectos terapéuticos y yatrogénicos de los inmunosupresores, así como la cronicidad en su uso y alto precio de su fracaso (en ocasiones la vida del paciente) han extendido el uso de la farmacocinética para evitar tanto el exceso como el defecto en los niveles sanguíneos obtenidos. La necesidad de reducir al máximo los efectos secundarios de la medicación inmunosupresora obliga a determinar la dosis mínima eficaz de inmunosupresión para cada paciente. De hecho se debe siempre buscar un equilibrio de modo que se evite por un lado estadios de inmunosupresión excesiva, lo cual favorece a la aparición de infecciones oportunistas, y por otro lado estadios de inmunosupresión insuficientes, lo cual favorece la aparición de rechazo.

La eficacia de los inmunosupresores depende de múltiples factores: Proceso de absorción; Metabolización del profármaco al fármaco activo y de éste a metabolitos inactivos (o activos); Existencia o no de metabolitos activos y la estabilidad de los mismos; Niveles de proteínas transportadoras y factores que modifiquen la disociación y los niveles de fármaco libre; La existencia o no de ciclo enterohepático; Biodisponibilidad intracelular, que depende a su vez de las moléculas que determinan la entrada o salida del fármaco de la

célula. Dado todos estos factores, parece evidente que una misma dosis, e incluso un mismo nivel sanguíneo de fármaco, pueda tener una eficacia variable de un paciente a otro.

La búsqueda de la dosis mínima eficaz no es fácil y el precio en rechazos agudos que se paga por la política de ensayo y error produce una cierta intranquilidad al clínico. Muy especialmente por las consecuencias que estos rechazos agudos puedan tener en la incidencia de rechazo crónico mucho más difícil de controlar.

Existen diferentes aproximaciones para evaluar si las pautas de dosificación de los inmunosupresores son adecuadas:

- 1/ Evaluar la respuesta clínica.
- 2/ Evaluar propiedades farmacocinéticas del fármaco
- 3/ Evaluar propiedades farmacodinámicas del fármaco, lo cual implica la medición del efecto biológico del fármaco.

La monitorización de los fármacos inmunosupresores basada en la cuantificación de los niveles sanguíneos (Farmacocinética) permite prevenir efectos adversos (especialmente toxicidad). Los parámetros farmacocinéticos: Concentración mínima (C<sub>min</sub>); Concentración máxima (C<sub>máx</sub>); Tiempo máximo (T<sub>máx</sub>); y Area bajo la curva (AUC) son de gran utilidad ya que permiten conocer: la absorción de las drogas, su distribución, su metabolización, las rutas de excreción e interacciones con otros fármacos. Sin embargo, no cuantifican el efecto biológico sobre las células del sistema inmunitario “in vivo” y tampoco evidencian toda la variabilidad interindividual existente. Por lo que parece oportuno evaluar otras estrategias complementarias que logren reflejar el nivel de inmunosupresión alcanzado “in vivo” con un determinado tratamiento.

La aparición de tratamientos alternativos a los clásicos (Ciclosporina A y corticoides), tales como el Micofenolato Mofetil, el Tacrolimus o el Sirolimus, hace plantearse la

posibilidad de que algunos tratamientos sean más adecuados que otros, para un determinado receptor. Es importante poder llegar a esta adecuación sin tener que recurrir al ensayo y error en las dosis, tanteando o no la aparición del rechazo.

Una vez se determinan unas pautas llamadas “convencionales” o “estándares” en la dosificación y en los niveles, a través de los diferentes estudios de Fase I, II, III y IV que se realizan sobre un fármaco concreto, es lógico pensar que estas dosis o estos niveles se determinan para cubrir un porcentaje elevado de la población, pero también es cierto que un porcentaje de esta población podría obtener idénticos resultados con dosis o niveles inferiores. En la práctica de la clínica rutinaria en ocasiones utilizando estas dosis de fármaco estándar aparecen efectos indeseables (efectos adversos), lo que hace que el clínico se vea obligado a disminuir la dosis. En esta situación es cuando se plantea la duda de en que enfermos se cumplen los objetivos terapéuticos y en cuales no. Si se dispusiera de parámetros que permitieran evaluar el grado real de inmunosupresión alcanzado en cada individuo serían de gran utilidad a la hora de ajustar las dosis.

La farmacodinámica se está configurando, en los últimos años, como un complemento esencial de la farmacocinética. Ambas se complementan ya que una nos define el destino del fármaco mientras que la otra nos define su efecto.

### 5.1 MONITORIZACION FARMACOCINETICA DE LOS INMUNOSUPRESORES

La utilidad de determinar las concentraciones o niveles sanguíneos de los inmunosupresores se basa en el hecho de que el efecto farmacológico está muy relacionado con las concentraciones del fármaco en su lugar de acción, y del hecho de que éstas dependen más de las concentraciones en sangre que de las dosis administradas.

Normalmente existe en la mayoría de los casos muy mala correlación entre la dosis administrada y las concentraciones obtenidas, lo cual pone de manifiesto que la monitorización de los fármacos inmunosupresores es una necesidad para el ajuste de las dosis en cada paciente.

La biodisponibilidad de un fármaco indica la cantidad de este fármaco inalterado que accede a la circulación sistémica y está disponible para alcanzar su diana específica y producir su efecto. La cantidad absorbida suele valorarse mediante lo que se denomina área bajo la curva (AUC) de las concentraciones sanguíneas o plásmaticas, la cual viene determinada por el valor del área que delimita, por su parte inferior la curva de niveles de un fármaco, y la velocidad de absorción.

De todos los parámetros farmacocinéticos el valor de la AUC es el que presenta una mejor correlación con el efecto que el fármaco puede producir. Sin embargo su monitorización también presenta inconvenientes ya que se necesitan un número muy elevado de muestras (de 8 a 10 puntos durante el intervalo de dosificación) y también representa un elevado coste. Por ello usualmente se realiza la monitorización en un solo punto: predosis matinal o concentración mínima ( $C_{min}$ ) una vez que se alcanza lo que se conoce como el estado equilibrio estacionario.

Actualmente los márgenes terapéuticos y el ajuste de dosis se basan no sólo del tipo de transplante y del tiempo post-transplante sino también en la medicación inmunosupresora concomitante. Lo que se pretende es llegar a obtener concentraciones de cada fármaco sean las adecuadas para alcanzar un grado de inmunosupresión óptimo en cada paciente con un mínimo de toxicidad.

Esta mayor exigencia en la monitorización farmacocinética de los fármacos inmunosupresores ha permitido observar que la  $C_{min}$  presenta en la mejor de las situaciones una correlación entre aceptable y buena con el valor de la AUC. En los fármacos que presentan ciclo enterohepático (como el MMF), no se establece una buena correlación entre la  $C_{min}$  y el valor de la AUC y, por ello, se han evaluado nuevas estrategias de monitorización que aporten mejor información sobre el efecto farmacológico. Un ejemplo de ello es en el caso de CsA se ha demostrado, a través de estudios multicéntricos, que la monitorización de un sólo punto a las 2 horas post-administración matinal tiene mayor utilidad clínica<sup>(46)</sup>. Otra estrategia que se propone es para algunos fármacos, como el MMF, es evaluar perfiles de absorción rápidos (AUC simplificadas: de 0 a 4 horas post-dosis)<sup>(47)</sup>.

Ahora bien como ya se ha comentado anteriormente a pesar de estas nuevas tendencias en la monitorización farmacocinética de los inmunosupresores lo que implican una mejora en el ajuste de las dosis, la situación ideal de monitorización es aquella que combina la monitorización farmacocinética y la farmacodinámica por ser la que aporta mayor información sobre el grado de inmunosupresión que se alcanza en los pacientes.

## 5.2 ESTRATEGIAS DE EVALUACION DE LOS EFECTOS FARMACODINAMICOS

La monitorización farmacodinámica implica la medición del efecto biológico del fármaco en su lugar de acción (diana específica). La teórica ventaja de la monitorización farmacodinámica es que tiene en cuenta las diferencias interindividuales de susceptibilidad hacia un determinado fármaco.

En los últimos años se están desarrollando diversas metodologías con el fin de conocer los efectos farmacodinámicos de los inmunosupresores, lo cual ha favorecido al conocimiento de los mecanismos de acción de dichos fármacos<sup>(48)</sup>.

Se han propuesto diferentes estrategias de abordaje para evaluar los efectos farmacodinámicos:

1. Evaluar la actividad de las enzimas diana de cada inmunosupresor

**Tabla 2**

<b>FARMACO INMUNOSUPRESOR</b>	<b>ENZIMA DIANA</b>
CICLOSPORINA A (CsA)	Fosfatasa Calcineurina
TACROLIMUS (TRL)	Fosfatasa Calcineurina
MICOFENOLATO MOFETIL (MMF)	Inosin Monofosfato Dehidrogenasa (IMPDH)
SIROLIMUS (SRL)	Kinasa P70S6

2. Evaluar algún mediador implicado en el mecanismo de acción de cada inmunosupresor

**Tabla 3**

<b>FARMACO INMUNOSUPRESOR</b>	<b>MEDIADOR IMPLICADO</b>
CICLOSPORINA A (CsA)	Síntesis de IL-2, IFN- $\gamma$ , Translocación al núcleo del NFAT citoplasmático
TACROLIMUS (TRL)	Síntesis de IL-2, IFN- $\gamma$ , Translocación al núcleo del NFAT citoplasmático
MICOFENOLATO MOFETIL (MMF)	Duplicación del ADN (Proliferación)
SIROLIMUS (SRL)	Duplicación del ADN (Proliferación)

### 3. Evaluar marcadores colaterales inducidos por los inmunosupresores

Expresión de antígenos linfocitarios (CD25, CD71)

La utilización de la actividad de la enzima diana putativo o de otros marcadores dependerá tanto de razones de facilidad logística de determinación, como de su correlación con el devenir de los hallazgos clínicos, bien sea en la relación del receptor con el injerto (rechazos), como en la del receptor con el inmunosupresor (efectos adversos).

Como aproximación a la monitorización farmacodinámica de la CsA y del TRL se ha propuesto la medición de la actividad calcineurina en linfocitos de sangre periférica<sup>(49)</sup> y en sangre total<sup>(50)</sup> y la producción de citocinas (IL-2 e IFN- $\gamma$ )<sup>(51)</sup>.



Halloran y colaboradores demostraron que existía una correlación entre la inhibición de la actividad calcineurina con el pico de concentración máxima de fármaco en sangre (alrededor de las 2 horas). En un estudio más reciente con transplantados renales tratados con CsA se observó una disminución significativa de la proporción de linfocitos que producían IL-2 a 2 horas post-dosis en comparación con la pre-dosis<sup>(52)</sup>. Por lo que estos parámetros parecen ser buenos candidatos para la monitorización del efecto real que realizan dichos fármacos.

Respecto al MMF, los primeros estudios de monitorización farmacodinámica se han centrado en la medición de la actividad de la enzima IMPDH. Se estableció una correlación inversa entre la actividad de dicho enzima y los niveles plasmáticos de MPA. Alrededor de la primera hora post-dosis (pico de niveles plasmáticos) se alcanza unas inhibiciones de la actividad IMPDH del 40%<sup>(53)</sup>. A pesar de que se ha demostrado una correlación entre la actividad IMPDH y los niveles de MPA, existe una no despreciable variabilidad interindividual en ambos parámetros. Por lo que se está tendiendo a desarrollar ensayos en los que se evalúa la capacidad proliferativa de los linfocitos T, tras estimularlos con mitógenos, o la expresión de receptores de factores de crecimiento de la superficie celular (IL-2R, transferrin, TNF- $\alpha$ ), o la expresión de moléculas de adhesión (LFA-1, ICAM-1), como alternativa a la determinación de la actividad IMPDH.

En relación al Sirolimus no existen estudios publicados en los que se evalúen la actividad kinasa P70S6, en pacientes tratados con Sirolimus. Existen estudios “in vitro” en los que se evalúa la incorporación de <sup>3</sup>H-Timidina en cultivos de proliferación con sangre total

estimulada con mitógenos a los que se les adiciona Sirolimus, sólo o en combinación con otros inmunosupresores<sup>(54)(55)</sup>. Este método se ha utilizado para monitorizar dicho fármaco en ratas. Los estudios “in vivo” demuestran que la administración de Sirolimus suprime la activación linfocitaria, pero no existen datos que correlacionen la actividad kinasa P70S6 y la eficacia la Sirolimus para evitar el rechazo.

Al monitorizar desde un punto de vista farmacodinámico un fármaco, la mejor aproximación, a priori, es la evaluación del efecto que realiza éste sobre su diana específica, pero en ocasiones puede no ser la opción más óptima, ya sea por problemas técnicos o bien porque no se haya llegado a demostrar una buena correlación con la clínica o incluso con los parámetros farmacocinéticos. Entonces se tiene que recurrir a algún paso intermedio del mecanismo de acción o incluso a la consecuencia final que tenga ese fármaco. En cada situación se tendrá que valorar cual es la mejor opción que nos permita evaluar de forma más eficaz el efecto biológico real que realiza el fármaco.

**HIPOTESIS DE TRABAJO**

## **HIPOTESIS**

La determinación de la actividad residual de la enzima diana putativo de un fármaco en los linfocitos de un enfermo tratado con inmunosupresores, como parámetro farmacodinámico, podría constituir un buen marcador de su impacto sobre es sistema inmunitario, al tiempo que permitiría identificar y estudiar las respuestas anómalas a determinados fármacos o asociaciones.

**OBJETIVOS**

## OBJETIVOS

1/ Establecer parámetros farmacodinámicos que permitan identificar el impacto biológico de dosis o niveles subóptimos de Micofenolato Mofetil (MMF), Ciclosporina A (CsA) y Tacrolimus (TRL) en un receptor concreto.

2/ Dada la tendencia creciente a utilizar terapias inmunosupresoras basadas en la combinación de fármacos, buscar parámetros farmacodinámicos que reflejen la acción biológica conjunta de los diversos fármacos implicados en la terapia.

**TRABAJOS PUBLICADOS**

**1. MONITORIZACION DEL MICOFENOLATO MOFETIL  
EN TRANSPLANTADOS RENALES EN ETAPA DE  
MANTENIMIENTO**

**ASSESSMENT OF MYCOPHENOLIC ACID-INDUCED IMMUNOSUPPRESSION:  
A NEW APPROACH**

**OLGA MILLÁN<sup>1</sup>, FEDERIC OPPENHEIMER<sup>3</sup>, MERCÈ BRUNET<sup>2</sup>, JORDI VILARDELL<sup>3</sup>,  
ISABEL ROJO<sup>1</sup>, JORDI VIVES<sup>1</sup>, JAUME MARTORELL<sup>1,4</sup>**

Servei Immunologia<sup>1</sup>, Toxicologia<sup>2</sup> i Unitat de Transplantament Renal<sup>3</sup>, IDIBAPS,  
Hospital Clinic, 08036 Barcelona, Spain

*Clinical Chemistry (USA) 2000; 46:9; 1376-1383*

**I.F.: 4,371**



## **1.1 JUSTIFICACION DE LOS EXPERIMENTOS Y SINTESIS DE RESULTADOS**

Este estudio surgió del interés por parte del equipo de Transplante Renal del Hospital Clínic de Barcelona de conocer si la administración de Micofenolato Mofetil, a transplantados renales en etapa de mantenimiento, a dosis por debajo de las consideradas estándar producían un efecto biológico detectable.

Para ello se llevo a cabo la monitorización farmacodinámica y farmacocinética del Micofenolato Mofetil en 27 transplantados renales estables tratados con diferentes dosis de MMF: 2g/día (dosis estándar) (n=10); 1.5g/día (dosis subóptima) (n=7) y 1g/día (dosis subóptima) (n=10), además de Ciclosporina A y Prednisona. Como grupos controles se estudiaron a 8 transplantados renales estables que recibían dosis similares de CsA, pero no MMF y un grupo de 8 individuos sanos. La monitorización farmacocinética se realizó en el Laboratorio de Farmacología, Centre de Diagnòstic Biomèdic del Hospital Clínic de Barcelona.

Basándonos en nuestra hipótesis de trabajo, decidimos utilizar como marcador del efecto biológico que realizaba el MMF, en este grupo de estudio, la actividad de la enzima diana del MMF: la IMPDH. En primer lugar se realizaron toda una serie de ensayos “in vitro” con el fin de optimizar la técnica de determinación de la actividad de la IMPDH, testándola tanto en células mononucleares de sangre periférica humanas (hPBMC) como en líneas celulares T humanas, como la denominada CEM, realizando cultivos in vitro en presencia de Acido Micofenólico (MPA) adicionado exógenamente. Una vez teníamos la técnica validada “in vitro” pasamos a determinar el mencionado parámetro en la población de estudio durante el intervalo de dosificación: pre-dosis matinal y a la 1h, 2h, 4h, y 12h post-

dosis. Observamos que el grupo de individuos sanos presentaba una actividad IMPDH estable ( $57.5 \pm 18.2$  dpm/min), mientras que los pacientes transplantados presentaban una elevada variabilidad, sobretodo pre-dosis matinal, tanto los tratados con MMF ( $75.4 \pm 55.2$  dpm/min) como los no tratados con MMF ( $84.7 \pm 94.7$  dpm/min). En el grupo tratado con MMF se observó una distribución bimodal de dicho parámetro: un subgrupo presentaba una actividad IMPDH similar o más baja que la del grupo control ( $< 75$  dpm/min) y otro subgrupo presentaba una actividad IMPDH superior al control ( $> 75$  dpm/min). La variabilidad encontrada tanto en los pacientes tratados con MMF como los no tratados, sumado al hecho de que existía una pobre correlación de este parámetro en las determinaciones pre-dosis (a 0h y 12h) nos hizo considerar que el uso de esta técnica como una técnica de uso habitual para evaluar la eficacia individual del MMF quedaba en entredicho.

Ello nos llevó a plantearnos que nuevas aproximaciones podíamos realizar para evaluar más eficazmente la acción biológica del MMF. El nuevo método tenía que cumplir una serie de requisitos: 1/ Debía presentar una relación directa con la presencia de MPA; 2/ No debía alterarse por la presencia de otros inmunosupresores, ya que cada vez más los transplantados reciben combinaciones de fármacos inmunosupresores en vez de monoterapias y; 3/ Debía presentar una buena correlación en la medición entre las muestras basales de un día respecto al día siguiente.

De entre todos los pasos valorables, desde un punto de vista metodológico, del mecanismo de acción del MMF decidimos centrarnos en los últimos pasos del mismo, es decir, en la inhibición de la proliferación celular. Teniendo en cuenta que el MMF una vez que es metabolizado a MPA, éste se almacena en más de un 99% en el compartimento del plasma,

diseñamos un método basado en la capacidad que tiene el suero de los pacientes de inhibir la proliferación espontánea de una línea celular T humana, denominada CEM. Los resultados se expresan como %CEM, el cual se obtiene del siguiente cociente: Respuesta de CEM= [Proliferación (cpm) en presencia del suero del paciente]x100 / [Proliferación (cpm) en presencia del suero de un individuo sano]. Una mayor capacidad inhibitoria de los sueros de los pacientes implica un menor porcentaje en la respuesta de CEM. (Anexo 1).

Paralelamente diseñamos otros modelos de proliferación como cultivos de hPBMC activadas en presencia de (PHA+IL-2) o (PMA+IL-2). A pesar que ambos modelos presentaron una buena correlación con el modelo de las CEM, optamos por descartarlos. El modelo con (PHA+IL-2) porque se afectaba aproximadamente en un 20% por la presencia de CsA. Y por otro lado el modelo de (PMA+IL-2), a pesar que no se afectaba por la presencia de CsA, nos fue muy difícil medir la actividad IMPDH en este tipo de células. Además de tener en cuenta estas consideraciones, el modelo de las CEM fue el que presentó menos variabilidad.

De la valoración de este parámetro propuesto (%CEM) en ensayos “in vitro” y en la población de estudio observamos que: 1/ sólo era inhibido por los pacientes tratados con MMF; 2/ se detectó una inhibición post-administración de MMF; 3/ no se vio afectado por la presencia de otros inmunosupresores (CsA, corticoides) ni *in vitro* ni *in vivo*; 4/ se trata de un parámetro estable entre las determinaciones pre-dosis; 5/ con dosis superiores a 20mg/Kg/día todos los pacientes presentaron una elevada capacidad inhibitoria durante todo el intervalo de dosificación (%CEM <40%), mientras cuando las dosis de MMF fueron inferiores a 20mg/Kg/día se identificaron 2 grupos de pacientes, uno que mantuvo una elevada capacidad inhibitoria durante todo el intervalo de dosificación y otro que presentó una baja capacidad inhibitoria pre-dosis.

Sólo los pacientes que recibían MMF presentaban inhibiciones de la respuesta de CEM, los no tratados con MMF y los controles sanos presentaron respuestas de CEM alrededor del 100%. Post-dosis se observaron inhibiciones significativas de la respuesta de CEM en los tratados con MMF, que llegaron a ser máximas cuando los niveles de MPA en plasma también eran máximos (1-2h post-dosis), mostrando una estrecha relación entre los niveles de fármaco y su efecto biológico.

## **1.2 CONCLUSIONES**

1/ La técnica de medición de la actividad IMPDH, tal y como esta descrita, presenta una elevada variabilidad en enfermos transplantados, incluso cuando éstos no están no tratados con MMF.

2/ El método propuesto basado en la respuesta de CEM:

2.1 Al trabajar con el suero del paciente simplifica la logística del procedimiento, ya que permite mantener, si es necesario, las muestras congeladas durante largos periodos de tiempo hasta su evaluación.

2.2 No se afecta por la presencia de otros inmunosupresores (CsA, corticoides) ni “in vitro” ni “in vivo”.

2.3 En pacientes tratados con dosis bajas de MMF (1.5g o 1g /día) diferencia 2 subgrupos:

2.3.1 Uno que mantiene una elevada inhibición de la Respuesta de CEM durante todo el intervalo de dosificación.

2.3.2 Y otro que presenta una baja inhibición pre-dosis.

3/ La Respuesta de CEM (%CEM) puede ser un parámetro útil en la monitorización del MMF, especialmente cuando los pacientes son tratados con dosis subóptimas (de 1 o 1.5g/día) (por debajo de las llamadas dosis estándar: 2g/día), ya que es capaz de identificar pacientes que a pesar de presentar niveles plasmáticos de MPA más bajos que los obtenidos cuando se utilizan dosis estándar, presentan una eficacia biológica similar a los que reciben dichas dosis estándar.

# Assessment of Mycophenolic Acid-induced Immunosuppression: A New Approach

OLGA MILLAN,<sup>1</sup> FEDERIC OPPENHEIMER,<sup>3</sup> MERCE BRUNET,<sup>2</sup> JORDI VILARDELL,<sup>3</sup> ISABEL ROJO,<sup>1</sup> JORDI VIVES,<sup>1</sup> and JAUME MARTORELL<sup>1\*</sup>

**Background:** Mycophenolic acid (MPA), a metabolite of mycophenolate mofetil (MMF), is an immunosuppressive agent that inhibits inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH), a key enzyme in the ex novo synthesis of GTP. We measured IMPDH activity in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from MMF-treated patients to evaluate the efficacy of MMF in individual patients.

**Methods:** IMPDH activity was measured by <sup>3</sup>H released from [2,8-<sup>3</sup>H]IMP that had been formed in the cells from added [2,8-<sup>3</sup>H]hypoxanthine in PBMCs of 35 renal transplant recipients treated with cyclosporin A and corticoids plus MMF: 2 g (n = 10), 1.5 g (n = 7), 1 g (n = 10), or 0 g (n = 8) per day. An alternative method, based on the capacity of the patients' sera to inhibit spontaneous proliferation of the CEM cell line, was also analyzed.

**Results:** The IMPDH activity of PBMCs in transplanted patients was highly variable. For the method based on CEM cell line proliferation: (a) cell proliferation was inhibited only in MMF-treated patients; (b) there was a clear postdose increase in inhibition; (c) inhibition was not affected by other immunosuppressants in vitro or in vivo; (d) inhibition from predose to predose sample was correlated; and (e) when the MMF dosage was <20 mg · kg<sup>-1</sup> · day<sup>-1</sup>, two groups of patients were identified, one that maintained a high inhibitory capacity in all dose intervals, and one with periods of low inhibitory capacity.

**Conclusions:** Measurement of the inhibition of CEM cell line proliferation by sera from MMF-treated patients may be useful for evaluating the relative efficacy of MMF treatment in individual patients, especially those receiving low doses of MMF.

© 2000 American Association for Clinical Chemistry

Mycophenolate mofetil (MMF)<sup>4</sup> is an immunosuppressive agent used to prevent rejection. MMF is metabolized to mycophenolic acid (MPA), a potent inhibitor of inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH), a key enzyme in the ex novo synthesis of GTP (1, 2). Lymphocyte clonal expansion is especially dependent on ex novo GTP synthesis. The MPA-induced GTP depletion of lymphocytes inhibits the induction of cyclin D3, a major component of cyclin-dependent kinase, and decreases the degradation of p27<sup>kip1</sup>, a cyclin-dependent kinase inhibitor, thus arresting of the cell cycle in early-to-mid-G<sub>1</sub> phase (3).

MMF has a highly variable absorption profile. MMF is hydrolyzed rapidly by esterases in the intestine and blood to release MPA, which crosses the cell membrane (4); however, >99% of MPA remains in the plasma compartment, binding mainly to albumin (5). MPA is metabolized rapidly (2–4 h), mainly to MPA-glucuronide, a metabolite thought to be inactive (6), although not all authors agree (7). Two other minor metabolites have also been described: the 7-O-glucose conjugate of MPA (M1) and the acyl glucuronide conjugate of MPA (M2) (8). M1, at least, appears to be active.

The monitoring of blood concentrations of immunosuppressants is a well-established practice for calcineurin inhibitors and for MMF (9). The monitoring of blood concentrations helps to ensure minimal concentrations (*c*<sub>min</sub>) and, more particularly, to avoid toxicity, but this monitoring provides only a poor idea of the degree of immunosuppression attained in an individual patient (10). The efficacy of an immunosuppressant probably depends on the interaction between the active form and the target enzyme during the entire dose interval. This interaction depends on a combination of factors such as the absorption pattern, plasma transport proteins, cyto-

<sup>1</sup> Servei Immunologia <sup>2</sup> Toxicologia i <sup>3</sup> Unitat de Transplantament Renal, IDIBAPS, Hospital Clinic, C/Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain.

\*Author for correspondence. Fax 34-934518038; e-mail jmarto@clinic.ub.es. Received February 22, 2000; accepted June 30, 2000.

<sup>4</sup> Nonstandard abbreviations: MMF, mycophenolate mofetil; MPA, mycophenolic acid; IMPDH, inosine monophosphate dehydrogenase; CsA, cyclosporin A; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; NHC, normal healthy control; FCS, fetal calf serum; NHS, normal human serum; PHA, phytohemagglutinin; PMA, phorbol-12-myristate-13-acetate; IL, interleukin; and CI, confidence interval.

plasm binding proteins, the timing of the metabolism of the immunosuppressant, and the activity of metabolites. For these reasons, several methods have been proposed to measure more directly the efficacy of immunosuppressants in individual patients. Some of these methods are based on the measurement of the activity of the putative immunosuppressant's target enzyme. Based on this rationale, some groups have used measurements of calcineurin activity to assess cyclosporin A (CsA) and FK506 efficacy (11, 12).

A similar approach to the measurement of IMPDH activity has been proposed for monitoring MMF efficacy. For this purpose, a method described by Balzarini and De Clercq (13), which has been used to measure IMPDH in CEM cell lines, has been used by some authors to monitor the IMPDH activity in the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) or in whole blood of MMF-treated animals or patients (14–16).

We used the method of Balzarini and De Clercq (13) to measure IMPDH activity in PBMCs of MMF-treated patients. Because of the high variability of this method and some theoretical considerations presented in the *Discussion*, we looked for alternative methods of evaluating MMF efficacy. Here we propose an alternative method based on the ability of the sera of MMF-treated patients to inhibit spontaneous proliferation of the CEM cell line (CEM response). We provide data indicating that this marker is not influenced by other immunosuppressants, is related to the dose received and to the MPA blood concentrations, has good reproducibility, and is relatively easy to measure.

## Materials and Methods

### REAGENTS

RPMI-1640 was obtained from BioWhittaker. Trichloroacetic acid and phosphoric acid were purchased from Merck. [2,8-<sup>3</sup>H]Hypoxanthine (5 mCi) and [methyl-<sup>3</sup>H]thymidine (5 mCi) were obtained from Movarek Biochemicals. Activated charcoal, thrombin, MPA, and dexamethasone were from Sigma. CsA was kindly supplied by Novartis Farmacéutica S.A. (Barcelona, Spain). OptiPhase "HiSafe" 2 was from Wallac Scintillation Products.

MPA and carbamazepine calibrators were obtained from Sigma-Aldrich. Methanol, HPLC-grade acetonitrile, and glacial acetic acid were purchased from Scharlau. C<sub>18</sub> solid-phase extraction columns were from Supelco®.

### SOURCE OF SPECIMENS

Twenty-seven stable renal transplant recipients receiving 1 g (n = 10), 0.75 g (n = 7), or 0.5 g (n = 10) of MMF twice a day took part in the study (MMF+ group). For analysis purposes, the patients were regrouped on the basis of their dose per kg per day: 10–19 mg · kg<sup>-1</sup> · day<sup>-1</sup> (n = 9), 20–29 mg · kg<sup>-1</sup> · day<sup>-1</sup> (n = 12), and >30 mg · kg<sup>-1</sup> · day<sup>-1</sup> (n = 6). The MMF therapy period ranged from 6 to 14 months. The immunosuppressive drug treatment also consisted of CsA and prednisone. The mean (± SD) age of

the patients was 42.5 ± 13.6 years, with a posttransplantation follow-up of 38.5 ± 44.8 months. The control group (MMF-) included eight transplanted patients receiving similar doses of CsA and corticoids, but not MMF, and eight normal healthy controls (NHCs).

To study IMPDH activity, blood samples were collected at the following times: before administration of the dose and 1, 2, 4, and 12 h after administration. All samples were collected in tubes containing heparin as anticoagulant. At the same time, blood was collected in tubes without anticoagulant to obtain sera. To investigate the relationship between plasma MPA concentrations and their biological effect, the inhibition of IMPDH activity was measured in isolated lymphocytes from blood samples at times 0 (predose) and 1, 2, 4, and 12 h after administration.

### ISOLATION AND PURIFICATION OF LYMPHOCYTES

Human PBMCs were obtained from the mononuclear cell layer of the Ficoll-Hypaque gradient. PBMCs were washed twice with phosphate-buffered saline and resuspended with 5 mL of RPMI-1640 containing 100 mL/L heat-inactivated fetal calf serum (FCS). The platelets, monocytes, and residual polymorphonuclear cells were removed by incubation with thrombin (10<sup>3</sup> IU/L) in a 5-mL disposable syringe containing 200 mg of nylon wool for 30 min at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> and 95% humidified air.

The nonadherent cells were collected and centrifuged for 10 min at 400g. The purity of the lymphocytes was >90%.

### CELL LINE

The CEM cell line was obtained from American Type Culture Collection. CEM is a human T-lymphoblastoid cell line obtained from the peripheral blood buffy coat of a 4-year-old Caucasian female with acute lymphoblastic leukemia. We used the subclone, which we called CEM.2b. We provide data showing that this subclone is resistant to corticoids (prednisone and dexamethasone). This clone will hereafter be designated as CEM. The CEM cells were cultured in RPMI-1640 supplemented with 100 mL/L FCS and gentamicin. The cells were grown at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>.

### DETERMINATION OF IMPDH ACTIVITY IN ISOLATED LYMPHOCYTES AND CEM CELLS

The IMPDH activity of intact lymphocytes and CEM cells was measured as described previously (13), with some minor modifications.

The enzyme activity was determined by estimating the <sup>3</sup>H released from [2,8-<sup>3</sup>H]IMP, which formed in the cells from added [2,8-<sup>3</sup>H]hypoxanthine (39.6 Ci/mmol). During the reaction, the <sup>3</sup>H atom located on C-2 of the hypoxanthine ring of IMP is replaced by a hydroxyl group. NAD<sup>+</sup> serves as the electron acceptor and is reduced to NADH.

The purified lymphocytes and CEM cells were resus-

pended in fresh RPMI-1640 without FCS at cell densities of  $2.5 \times 10^9$  and  $2.5 \times 10^8$  cells/L, respectively. A 300- $\mu$ L aliquot of each cell suspension was mixed with 100  $\mu$ L of [2,8- $^3$ H]hypoxanthine (5  $\mu$ Ci) and incubated at 37  $^{\circ}$ C. After 0, 15, 30, and 60 min, 100- $\mu$ L aliquots were removed and mixed with 500  $\mu$ L of a freshly prepared cold suspension of 100 g/L activated charcoal in 50 g/L trichloroacetic acid. After 25 min, the samples were centrifuged at 12 000g for 3 min, and 200  $\mu$ L of the supernatant was analyzed by scintillation counting with a quench-corrected counting program. The amount of  $^3$ H liberated spontaneously was measured and subtracted in each assay. The enzyme activity, determined from the slope of the graph of  $^3$ H release vs time, was expressed as disintegrations per minute per minute (dpm/min).

To validate this technique for measuring IMPDH activity in our hands, we suspended PBMCs (750 000) and CEM (75 000) cells for 4 h in medium culture with normal human serum (NHS; 1:1 final dilution) with externally added MPA in increasing concentrations.

#### MEASURED PLASMA MPA

Plasma MPA concentrations were analyzed by a validated and previously reported HPLC method (17). Briefly, 100  $\mu$ L of carbamazepine solution (20 mg/L in methanol) was added to 0.5 mL of human plasma as an internal standard, and 2 mL of 0.06 mol/L HCl was also added. The mixture was vortex-mixed and loaded in a previously conditioned C<sub>18</sub> solid-phase extraction column. The sample was washed with 1 mL of water and eluted with 1 mL of elution reagent (800 mL/L methanol in 0.1 mol/L acetate buffer, pH 4.0) (18).

Chromatographic analysis of MPA and the internal standard was achieved with a C<sub>18</sub> Novapak HPLC column (4.6 mm  $\times$  25 cm; Waters) connected to a reversed-phase Microguard column (Waters). Chromatography was carried out at 25  $^{\circ}$ C with a flow rate of 1.0 mL/min, and the eluate was monitored at 254 nm by an ultraviolet detector. The isocratic mobile phase was aqueous phosphoric acid (0.5 g/L):acetonitrile (55:45, by volume). The total run time was 12 min. The working range for MPA was 0.1–50 mg/L. The within- and between-run imprecision (CVs) was 4.5–9.7%. The MPA concentration was determined by the ratio of its peak height in relation to that of the internal standard.

#### CALIBRATION METHOD

A stock solution of 1 g/L MPA was made up in methanol in a clean glass tube and stored at  $-20^{\circ}$ C. The MPA working solution (0.1 g/L) was prepared by further dilution of the stock solution (0.1 mL in 9.9 mL of methanol). The assay calibrators were prepared by adding 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 160, and 320  $\mu$ L of the MPA working solution to 1.0-mL aliquots of drug-free plasma to give concentrations of 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, and 32 mg/L MPA. A calibration curve was made once a week. International Mycophenolic Acid Testing Scheme Samples

were also analyzed as external control (external control submitted by H.W. Holt, European Quality Control).

#### PROLIFERATION CULTURES IN THE PRESENCE OF PATIENTS' SERA

CEM cells were resuspended in RPMI-1640 containing 100 mL/L heat-inactivated FCS. Cells ( $2 \times 10^5$ /L) were seeded in 96-well microtiter plates (TPP) and 100- $\mu$ L aliquots of patients' sera were added. [ $^3$ H]Thymidine was added 24 h after sera were added, and incorporated thymidine was measured in a Beckman scintillation counter 24 h later.

Samples of a NHS with increasing concentrations of externally added MPA were incubated with  $2 \times 10^5$  CEM cells (100  $\mu$ L each of the cell suspension and NHS). After 24 h, [ $^3$ H]thymidine was added, and its uptake was measured 24 h later.

In some experiments, normal human PBMCs activated with phytohemagglutinin (PHA) + interleukin-2 (IL-2) or phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) + IL-2 were used as proliferating cells to test the inhibitory capacity of patients' sera. Proliferation was measured by [ $^3$ H]thymidine uptake at 24 h.

#### STATISTICS

Unless specified, all results are expressed as the mean  $\pm$  SD. Statistical differences between groups were tested using a two-way analysis of variance and a paired or unpaired *t*-test, where appropriate, using SPSS statistical software (SPSS Inc.). *P* < 0.05 was considered significant.

### Results

#### IMPDH ACTIVITY MEASUREMENT IN VITRO AND IN VIVO

The measurement of IMPDH activity in our hands was validated; the activity in PBMC and CEM cells was inversely proportional to MPA concentration (Fig. 1)

Because of the good correlation between the MPA concentrations and the IMPDH activity attained in vitro,

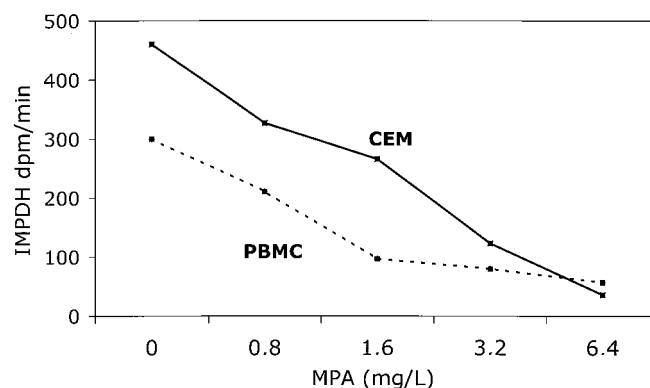


Fig. 1. Measurement of IMPDH activity in PBMCs (750 000) and CEM cells (75 000) incubated 4 h with NHS (1:1 final dilution) containing various concentrations of MPA.

The IMPDH activity was measured using [ $^3$ H]hypoxanthine and is expressed as dpm/min.



the study of transplanted patients was begun. The IMPDH activity of PBMCs from transplanted patients, treated with MMF (n = 27) or not treated with MMF (n = 8), and NHCs (n = 8) was studied. The results showed stable IMPDH activity in the NHCs at 57.5 ± 18.2 dpm/min. On the other hand, predose IMPDH activity in transplanted patients showed a high variability in both groups: 75.4 ± 55.2 dpm/min in the MMF+ group and 84.7 ± 94.7 dpm/min in the MMF- group (Fig. 2).

Although CVs of 5.1% (intraassay) and 9.7% (interassay) were acceptable in any given sample, the correlation between the IMPDH activity measurement in blood samples from predose time (0 h) and new predose time (12 h) in the same transplanted patient was extremely poor (r<sup>2</sup> = 0.18).

The variability of IMPDH activity between patients was very high at 1, 2, 4 and 12 h post dose: 39.8 ± 41.4, 42.7 ± 49.6, 60.8 ± 41.0, 44.7 ± 54.8 dpm/min, respectively.

**CEM PROLIFERATION-BASED APPROACH IN VITRO**

Several models were tested. We finally decided to use the spontaneously proliferating CEM cell line as the target for the antiproliferative capability of sera from MMF-treated patients. As expected, the proliferation of the CEM cells was indirectly related to the MPA added to NHS (Fig. 3). In contrast, the proliferation of CEM cells was not affected by NHS with externally added CsA or prednisone alone or in combination (Fig. 3A). Neither CsA nor prednisone modified the inhibition induced by MPA (Fig. 3B). Similar results were obtained with dexamethasone (data not shown).

**CEM PROLIFERATION-BASED APPROACH IN VIVO**

Spontaneous CEM cell proliferation in the presence of patients' sera at a 1:1 dilution was tested. The results for patients' sera were expressed as follows: CEM response = [CEM (cpm) in patients' sera] × 100/[CEM (cpm) in

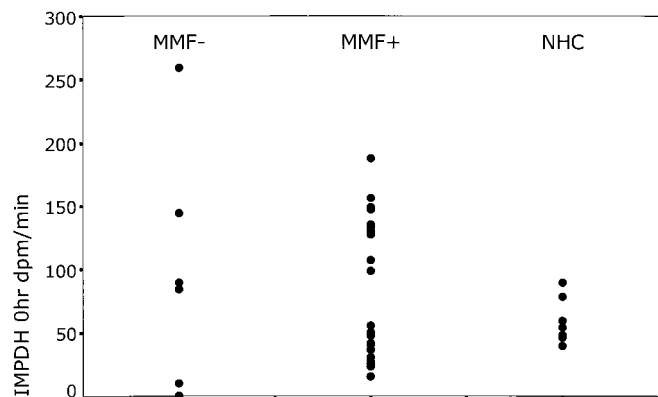


Fig. 2. IMPDH activity of PBMCs (750 000) from transplanted patients, treated with MMF (n = 27; MMF+), not treated with MMF (n = 8; MMF-), and NHCs (n = 8).

The IMPDH activity was measured using [<sup>3</sup>H]hypoxanthine and expressed as dpm/min.

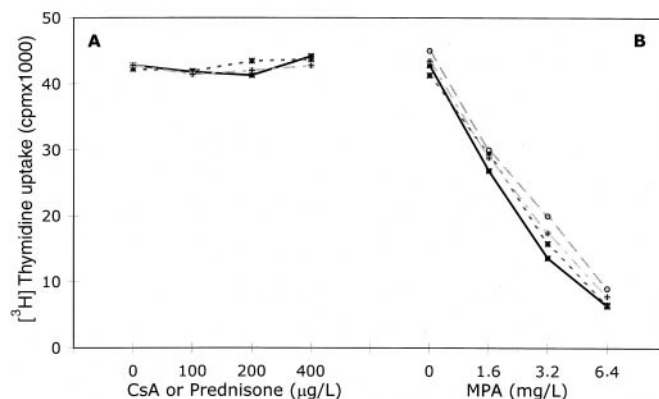


Fig. 3. Effect of various immunosuppressants on CEM response in vitro.

(A), CEM cells were cultured in the presence of NHS (1:1 dilution) with externally added CsA (0–400 µg/L; ■) or prednisone (0–400 µg/L; ●) or CsA (0–400 µg/L) + prednisone (200 µg/L; ◇) for 24 h. (B), CEM cells were cultured in the presence of NHS (1:1 dilution) with increasing concentrations of MPA (0–6.4 mg/L; ○), MPA + CsA (0–400 µg/L; ■), prednisone (0–400 µg/L; ●), or CsA (0–400 µg/L) + prednisone (200 µg/L; ◇). After 24 h, [<sup>3</sup>H]thymidine was added, and its uptake was measured 24 h later. Results are expressed as [<sup>3</sup>H]thymidine uptake in cpm × 1000.

NHS]. The greater inhibitory capacities of the patients' sera implied a lower percentage of CEM response. Results indicated that sera from the MMF- group had no inhibitory effect on CEM proliferation. The predose sera inhibited the CEM response to below 40% in all cases when the dose was >19 mg/kg. In the MMF+ (10–19 mg/kg) group, six of nine patients [67%; 95% confidence interval (95% CI), 35–99%] had a predose CEM response below 40%; in three of nine (33%; 95% CI, 1–65%), it was between 40% and 80% (Fig. 4).

The ability of postdose sera at 1, 2, 4, and 12 h to inhibit CEM proliferation was analyzed in the MMF- and MMF+ groups. As expected, it was not possible to demonstrate that CEM response was different at 1, 2, 4, and 12 h compared with 0 h in the MMF- group; in contrast, a significant inhibition of CEM response was

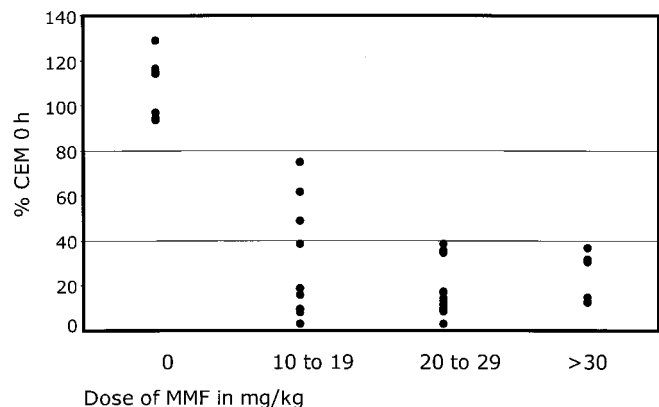


Fig. 4. Effect of MMF dosage on CEM response in vivo.

CEM cells were cultured with predose patients' sera at a 1:1 final dilution for 24 h. [<sup>3</sup>H]Thymidine was then added, and its uptake was measured 24 h later. The results are expressed as the percentage of cpm compared with CEM cells cultured with NHS.

seen in the MMF+ group during the posttreatment period (Fig. 5). The CEM response was significantly lower at 1 h ( $5.1\% \pm 12.5\%$ ;  $P < 0.001$ ), 2 h ( $7.8\% \pm 14.8\%$ ;  $P < 0.001$ ), and 4 h ( $11.3\% \pm 12.0\%$ ;  $P < 0.001$ ) compared with 0 h ( $23.5\% \pm 18.0\%$ ). No difference was seen between 0 and 12 h. The postdose individual profile of each patient is presented in Fig. 6, grouped for clarity purposes according to the predose CEM response:  $<20\%$  (patients with high predose inhibition; Fig. 6A),  $>20\%$  but  $<40\%$  (patients with medium predose inhibition; Fig. 6B), and  $>40\%$  (patients with low predose inhibition; Fig. 6C). A clear postdose inhibition of CEM response occurred at 1 and 2 h in all but one of the patients. At 12 h, CEM response returned to values similar to predose values. Only one of the patients presented no inhibition at 1 and 2 h post dose (Fig. 6B). This patient deserves special mention because his MPA concentrations were abnormally low ( $<2$  mg/L) at 0, 1, and 2 h, and he had an abnormal MPA peak concentration, 12.3 mg/L, at 4 h. This peak correlated with the peak CEM response inhibition.

Generally speaking, the MMF+ group reached peak MPA concentrations and CEM inhibition at 1 and 2 h, as can be seen in Fig. 7.

The correlation of CEM response from predose measurement to predose measurement (0 and 12 h) was quite good ( $r^2 = 0.94$ ). The results obtained by the method using normal human PBMCs activated with PHA + IL-2 or PMA + IL-2 were very similar to those obtained with CEM cells. In fact, the correlation coefficient between CEM response and PMA + IL-2 PBMC response with the predose sera was 0.83, and the correlation coefficient between CEM response and PHA + IL-2 PBMC response was 0.81.

To assess whether CEM response could be predicted by MPA blood concentrations, the capacity of sera to inhibit CEM proliferation at 12 h was correlated with

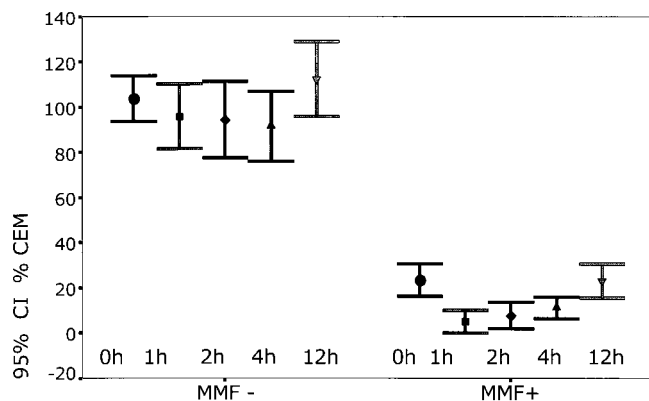


Fig. 5. Ability of patients' sera to inhibit CEM response.

CEM cells were cultured for 24 h in the presence of predose sera and sera collected 1, 2, 4, and 12 h postdose from patients treated with MMF (MMF+) and patients not treated with MMF (MMF-). [ $^3$ H]Thymidine was then added, and its uptake was measured 24 h later. The results are expressed as the percentage of cpm compared with CEM cells cultured with NHS.

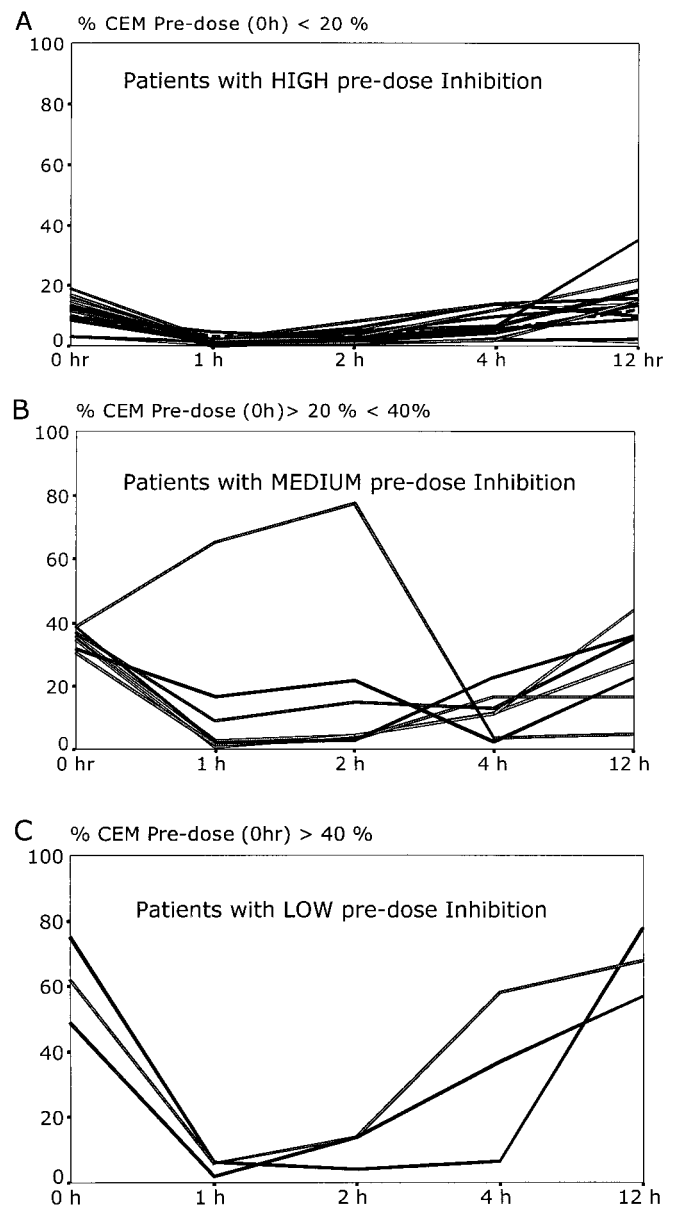


Fig. 6. Analysis of the postdose individual profile of each patient, grouped according to the predose CEM response.

(A), CEM response  $<20\%$  (patients with high predose inhibition); (B), CEM response  $>20\%$  but  $<40\%$  (patients with medium predose inhibition); (C), CEM response  $>40\%$  (patients with low predose inhibition). CEM cells were cultured 24 h with patients' postdose sera (1, 2, 4, and 12 h). [ $^3$ H]Thymidine was then added, and its uptake was measured 24 h later. Results are expressed as the percentage of cpm compared with CEM cells cultured with NHS.

MPA blood concentrations of the MMF+ group. When MPA blood concentrations were  $>3$  mg/L, 11 of 12 patients (92%; 95% CI, 77–100%) had a CEM response below 20%. On the other hand, when MPA concentrations were  $<3$  mg/L, the patients were distributed into two groups: 6 of 15 patients (40%; 95% CI, 15–65%) had a CEM response above 20%, and 9 of 15 patients (60%; 95% CI, 35–85%) had a CEM response below 20% (Fig. 8).

To provide further support for the hypothesis that the inhibitory capacity of sera from MMF-treated patients on

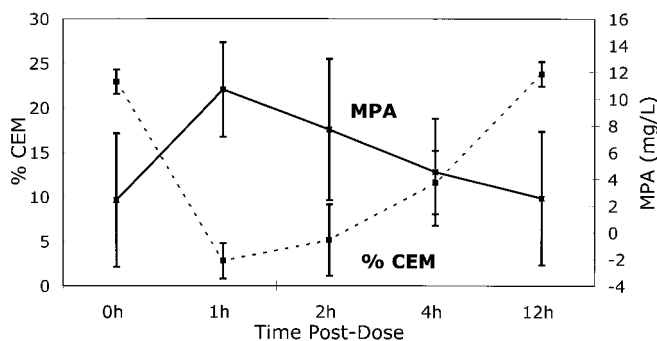


Fig. 7. Correlation between MPA concentrations and CEM response in the MMF-treated patients.

Results are expressed as the percentage of cpm compared with CEM cells cultured with NHS (left y axis) and mg/L MPA (right y axis).

CEM proliferation is related to IMPDH inhibition, CEM cells were cultured for 4 h with patients' sera (1:1, by volume) collected predose and 1 h post dose. The IMPDH activity of those CEM cells was measured 4 h later (Fig. 9). The results were expressed as: [IMPDH activity (dpm/min) of CEM in patients' sera]  $\times$  100/[IMPDH activity (dpm/min) of CEM in NHS]. The greater inhibitory capacities of patients' sera implied lower IMPDH measurements in the CEM. The sera from the MMF+ group at 0 h, and especially at 1 h post dose, inhibited the IMPDH activity of the CEM cells as expected. Sera from MMF- patients did not inhibit CEM IMPDH activity. Sera from the MMF+ group had a stronger inhibitory effect on CEM IMPDH compared with the MMF- group:  $97.5\% \pm 3.8\%$  vs  $73.4\% \pm 29.4\%$  at 0 h ( $P = 0.001$ ), and  $94.8\% \pm 9.6$  vs  $56.1\% \pm 33.9\%$  at 1 h ( $P < 0.001$ ).

The inhibitory capacity was different in the MMF+ group at 0 and 1 h ( $P = 0.02$ , *t*-test for paired samples). As expected, no difference could be detected between 0 and 1 h in the MMF- group ( $P = 0.4$ ).

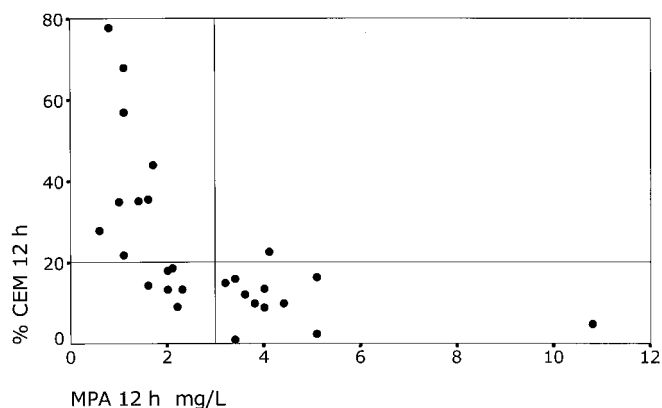


Fig. 8. Correlation between the capacity of patients' sera to inhibit CEM proliferation at 12 h (%CEM 12 h), measured as described in *Materials and Methods*, and MPA blood concentrations (12 h) measured by HPLC.

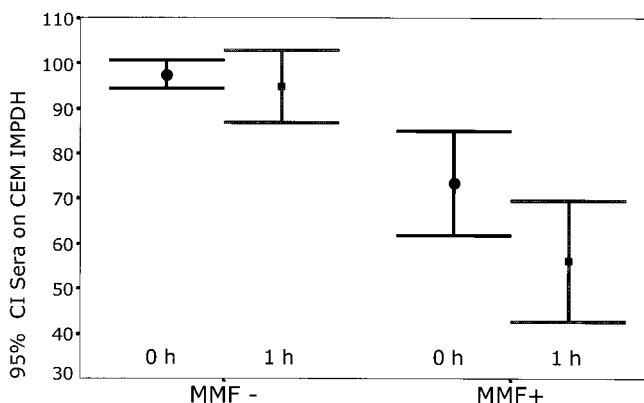


Fig. 9. IMPDH activity in CEM cells cultured with patients' sera.

CEM cells were cultured for 4 h with patients' sera (1:1 final dilution) collected predose and 1 h postdose from patients treated with MMF (MMF+) and patients not treated with MMF (MMF-). IMPDH activity was measured using [ $^3\text{H}$ ]hypoxanthine. Results are expressed as the percentage of IMPDH activity compared with CEM cells cultured with NHS.

## Discussion

The results presented here confirm previous reports (14, 19) indicating that the measurement of IMPDH activity in the PBMCs of MMF-treated patients is feasible using the technique described by Balzarini and De Clercq (13). Langman et al. (19) found no difference in IMPDH activity in PBMCs between MMF-treated patients and controls. A difference was found only when IMPDH activity was measured in whole blood. In our data, high variability existed between transplanted patients, especially in the non-MMF-treated group, and from predose sample to predose sample in the same patient. In our opinion, this variability and the previously published data of Langman et al. (19) jeopardize the routine use of this technique in the measurement of MMF efficacy in individual patients.

Because of the high variability detected in the patients and the poor stability of the IMPDH activity in individual patients, we considered a new approach. We here propose another method based on the capacity of serum to inhibit proliferation of the CEM cell line. We show here that this method (a) has a direct relationship with externally added MPA in NHS; (b) is not altered by the presence of other immunosuppressants such as CsA or prednisone; and (c) has a good correlation from predose sample to predose sample. Furthermore, the CEM response identifies a subgroup of patients who have less inhibitory capacity in the low-dose MMF group ( $10\text{--}19 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ ). It also identifies a group of patients who despite having MPA blood concentrations  $<3 \text{ mg/L}$ , have a good capacity to inhibit clonal expansion in vitro.

As far as we know, only two groups had published data concerning the measurement of IMPDH in MMF-treated patients (14, 15), probably because of difficulties in the implementation of this technique. Our results indicate that the measurement of IMPDH activity has a high variability in transplanted patients, even without

MMF treatment, and has poor stability from predose sample to predose sample.

From a theoretical point of view, the direct measurement of IMPDH in PBMCs or in whole blood as an indicator of MMF efficacy has some possible drawbacks: (a) The majority of PBMCs are resting lymphocytes that contain mainly IMPDH-I. In contrast, activated lymphocytes contain mainly IMPDH-II (20–22), which is four times more sensitive to MPA than IMPDH-I (23). (b) The activated lymphocytes are only a very small proportion of PBMCs, but they are the relevant ones for rejection. (c) Ninety-nine percent of MPA is retained in the plasma compartment, mainly bound to albumin (5, 6), and <1% is located inside the mononuclear cell fraction. On the basis of these considerations, it can be hypothesized that clinical MMF efficacy is related mainly to the capacity of the plasma to maintain a constant release of “free” MPA (or an active metabolite) to activated lymphocytes. The IMPDH activity of nonactivated cells can create a background noise that jeopardizes the utility of this marker because of the poor sensitivity to MPA of IMPDH-I and to the irrelevance of IMPDH-I to rejection in this majority population.

The method we propose here has its base in the capacity of serum to inhibit CEM proliferation. We have shown that results obtained with this method directly relate to the MPA externally added to the sera and that the method is not affected by other immunosuppressants such as CsA or corticoids, even at doses as high as 400  $\mu\text{g/L}$ . This means that the method does not measure the overall concentration of immunosuppressants in the patient but has the advantage of differentiating the role of MPA when it is used in combination with others drugs. We also tested other models such as (PHA + IL-2)- or (PMA + IL-2)-activated PBMCs. Although both have a good correlation with CEM response, in general terms (PHA + IL-2)-activated PBMCs were partially affected (~20% inhibition) by *in vitro* exogenously added CsA at 200  $\mu\text{g/L}$ . (PMA + IL-2)-activated PBMCs, on the other hand, were not affected by CsA, but it was not possible to measure IMPDH activity in these cells. Apart from these considerations, the CEM model presents less variability than the others. For all of these reasons, we chose the CEM response method. The use of the same target cell for all patients has the disadvantage of not measuring patient variability in the last intracellular steps, but it reduces the technical variability, allowing a better comparison between patients under different immunosuppression regimes while measuring the ability of an active form of the drug to be released from plasma proteins in a form able to cross the cell membrane and interact with the target enzyme, having the desired effect on lymphocytes.

Data from the sera of the MMF– group of patients showed no significant inhibition of CEM response, confirming that this marker is not affected by other immunosuppressants *in vivo*. Some patients had values >100% because the proliferation was always referred to a stan-

dard serum and those patients had proliferations higher than that found in the standard serum. On the other hand, a clear inhibition was seen in the sera of the MMF+ group, both predose and postdose.

The predose sera values indicated that the sera of patients receiving >20 mg/kg have a inhibitory effect on CEM response during the entire dose interval, maintaining a CEM response below 40% in all cases. In contrast, the patients receiving <20 mg/kg could be divided into two groups: 67% with a CEM response below 40% and 33% with a response above 40%. We do not know whether 40% indicates a sufficient concentration of immunosuppression to control rejection, but we can hypothesize that in relative terms those patients with a low capacity to inhibit CEM response in predose intervals are probably less immunosuppressed than those with a high inhibitory capacity during the entire dose interval.

Results for 1- and 2-h postdose sera indicate that the inhibitory effects of sera from all but one patient on the CEM response increased after the MMF dose, maintaining CEM response below 20% in 25 of 27 cases, indicating a clear postdose effect. The patient whose serum did not inhibit the cell response also had an abnormal blood concentration pattern, with low MPA concentrations at 1 and 2 h and a peak MPA concentration at 4 h. Individual patient data also indicated that patients with a low inhibitory capacity at 0 h had a similar response at 12 h. These data were confirmed by the good correlation coefficient ( $r^2 = 0.94$ ) between both predose samples (0 and 12 h).

Patients with MPA concentrations >3 mg/L correlated in almost all cases (11 of 12; 92%) with a predose CEM response below 20%. In patients with MPA concentrations <3 mg/L, CEM response was distributed almost equally between below 20% (60% of patients) and above 20% (40% of patients). These data indicate that although high MPA concentrations are an indicator of good inhibition of CEM response, low concentrations can be just as efficient as high concentrations in some, but not all, patients. The variability in MPA metabolism, the activity of MPA metabolites, or MPA binding could be the reason. Measurement of CEM response could be a good method for identifying patients with a high capacity to inhibit cell proliferation although with low MPA concentrations.

Sera from the MMF+ group but not from the MMF– group inhibited the IMPDH activity of the CEM cell, and these results seem to favor the hypothesis that the effects seen in the patients' sera are certainly related to the MPA putative target enzyme and not to any other phenomena. It can be argued that the inhibition of IMPDH activity is not complete and that a residual 50% activity remains in the CEM cells at the same time (1 h) that the CEM response is highly inhibited. In our opinion, this could be only a methodological problem related to the number of CEM cells used (75 000), the small volume of serum used (100  $\mu\text{L}$ ), or the short incubation time (4 h). Higher inhibition could probably be seen by reducing the number

of target cells or increasing the incubation time to 24 h (as in proliferation assays).

A hypothetical interference in the technique we propose could be produced by the presence of anti-HLA antibodies reacting with CEM cells. In our group of patients, only four had panel-reacting antibodies, and three of four had a predose CEM response above 40%, indicating that these antibodies had no inhibitory effect in our study. A possible explanation for these data could be the fact that human complement is relatively inefficient in killing human cells. For this reason, rabbit complement is needed in the panel-reacting antibody test to kill panel cells. Despite this, we cannot rule out the possibility that some antibodies from hypersensitized patients could create an interference via CEM-reacting anti-HLA antibodies.

On the basis of the data presented here, we hypothesize that the ability of sera from MMF-treated patients to inhibit CEM response could be useful for evaluating the efficacy of MMF treatment in individual patients. We cannot yet predict which level of CEM response suppression will correlate with rejection-free kidney survival, but an approach can be proposed in relative terms. For this reason, we postulate that those patients maintaining a predose CEM response above 40% have a level of immunosuppression relatively lower than the ones who have a predose CEM response below 40%. For this reason, the MMF dose should be increased in these patients to attain a relative immunosuppression equivalent to the one found in the rest of the MMF-treated patients. Moreover, those patients who are able to maintain a predose CEM response below 20% with low doses of MPA could be considered, relatively speaking, as being as well suppressed as patients receiving higher doses, at least as far as the sensitivity of the technique can predict. However, the above statement must obviously be confirmed through correlation with rejection episode data in wider studies.

Putative optimal doses of MMF often have to be reduced on the basis of individual side effects. In these cases, it becomes necessary to evaluate the individual efficacy of these "suboptimal" doses. We postulate that measurement of the predose capacity of serum to inhibit CEM response could be helpful in this task.

This study was partially supported by a Roche grant and by a grant from "Fundació Catalana de Trasplantament".

### References

- Allison AC, Eugui EM. Immunosuppressive and other effects of mycophenolic acid and an ester prodrug, mycophenolate mofetil. *Immunol Rev* 1993;136:5-28.
- Ransom TJ. Mechanism of action of mycophenolate mofetil. *Ther Drug Monit* 1995;17:681-4.
- Laliberté J, Yee A, Xiong Y, Mitchell BS. Effects of guanine nucleotide depletion on cell cycle progression in human T lymphocytes. *Blood* 1998;91:2896-904.
- Allison AC, Eugui EM. Purine metabolism and immunosuppressive effects of mycophenolate mofetil (MMF). *Clin Transplant* 1996;10:77-84.
- Nowak I, Shaw LM. Mycophenolic acid binding to human serum albumin: characterization and relation to pharmacodynamics. *Clin Chem* 1995;41:1011-7.
- Shaw LM, Nowak I. Mycophenolic acid: measurement and relationship to pharmacologic effects. *Ther Drug Monit* 1995;17:685-9.
- Griesmacher A, Weigel G, Seebacher G, Müller MM. IMP-dehydrogenase inhibition in human lymphocytes and lymphoblasts by mycophenolic acid and mycophenolic acid glucuronide. *Clin Chem* 1997;43:2312-7.
- Schütz E, Shipkova M, Armstrong VW, Wieland E, Oellerich M. Identification of a pharmacologically active metabolite of mycophenolic acid in plasma of transplant recipients treated with mycophenolate mofetil. *Clin Chem* 1999;45:419-21.
- Shaw LM, Nicholls A, Hale M, Armstrong VW, Oellerich M, Yatscuff R, et al. Therapeutic monitoring of mycophenolic acid: a consensus panel report. *Clin Biochem* 1998;31:317-22.
- Batiuk TD, Urmson J, Vincent D, Yatscuff RW, Halloran PF. Quantitating immunosuppression. *Transplantation* 1996;61:1618-24.
- Fruman DA, Klee CB, Bierer BE, Burakoff SJ. Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK506 and cyclosporine A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:3686-90.
- Batiuk TD, Pazderka F, Enns J, DeCastro L, Halloran PF. Cyclosporine inhibition of calcineurin activity in human leukocytes in vivo is rapidly reversible. *J Clin Invest* 1995;96:1254-60.
- Balzarini J, De Clercq E. Assay method for monitoring the inhibitory effects of antimetabolites on the activity of inosinate dehydrogenase in intact human CEM lymphocytes. *Biochem J* 1992;287:785-90.
- Langman LJ, LeGatt DF, Halloran PF, Yatscuff RW. Pharmacodynamic assessment of mycophenolic acid-induced immunosuppression in renal transplant recipients. *Transplantation* 1996;62:666-72.
- Sanquer S, Breil M, Baron C, Dahamane D, Asrier A, Lang P. Induction of inosine monophosphate dehydrogenase activity after long-term treatment with mycophenolate mofetil. *Clin Pharmacol Ther* 1999;65:640-8.
- Langman LJ, Shapiro JAM, Lakey JRT, LeGatt DF, Kneteman NM, Yatscuff RW. Pharmacodynamic assessment of mycophenolic acid-induced immunosuppression by measurement of inosine monophosphate dehydrogenase activity in a canine model. *Transplantation* 1996;61:87-92.
- Brunet M, Oppenheimer F, Martorell J, Vilardell J, Carreno MC, Carrillo M, et al. Mycophenolic acid monitoring: Evaluation of the EMIT<sup>®</sup>MPA immunoassay in kidney and lung transplantation. *Transplant Proc* 1999;31:2275-6.
- Li S, Yatscuff RW. Improved high-performance liquid chromatographic assay for the measurement of mycophenolic acid in human plasma. *Transplant Proc* 1996;26:938-40.
- Langman LJ, LeGatt DF, Yatscuff RW. Pharmacodynamic assessment of mycophenolic acid-induced immunosuppression by measuring IMP dehydrogenase activity. *Clin Chem* 1995;41:295-9.
- Dayton JS, Lindsten T, Thompson CB, Mitchell BS. Effects of human T lymphocyte activation on inosine monophosphate dehydrogenase expression. *J Immunol* 1994;152:984-91.
- Gu JJ, Spychala J, Mitchell BS. Regulation of the human inosine monophosphate dehydrogenase type I gene. *J Biol Chem* 1997;272:4458-66.
- Zimmermann AG, Wright KL, Ting JPY, Mitchell BS. Regulation of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase type II gene expression in human T cells. *J Biol Chem* 1997;272:22913-23.
- Allison AC, Kowalski WJ, Muller CD, Eugui EM. Mechanism of action of mycophenolic acid. *Ann N Y Acad Sci* 1993;696:63-87.

**2. MONITORIZACION DE LOS INHIBIDORES DE LA  
CALCINEURINA EN TERAPIAS COMBINADAS  
CON MMF EN TRANSPLANTADOS RENALES  
EN ETAPA DE MANTENIMIENTO**

**A PHARMACODYNAMIC APPROACH TO IMMUNOSUPPRESSIVE  
THERAPIES USING CALCINEURIN INHIBITORS AND MMF**

**OLGA MILLÁN<sup>1</sup>, MERCÈ BRUNET<sup>2</sup>, JOSEP M<sup>a</sup> CAMPISTOL<sup>3</sup>, ANA FAURA<sup>3</sup>, ISABEL  
ROJO<sup>1</sup>, ELENA VIDAL<sup>2</sup>, OLGA JIMÉNEZ<sup>2</sup>, JORDI VIVES<sup>1</sup>, FEDERIC OPPENHEIMER<sup>3</sup>,  
JAUME MARTORELL<sup>1</sup>**

Institut Clinic d'Infeccions i Immunologia (ICII)<sup>1</sup>, Servei de Toxicologia<sup>2</sup>, Unitat de  
Trasplantament Renal<sup>3</sup>, IDIBAPS, Hospital Clinic, 08036 Barcelona, Spain

*Clinical Chemistry (USA) 2003; 49:11;1891-1899*

**I.F.: 4,788**

## **2.1 JUSTIFICACION DE LOS EXPERIMENTOS Y SINTESIS DE RESULTADOS**

En este trabajo se ha evaluado la correlación existente entre la Actividad calcineurina (aCN), producción IL-2 e IFN- $\gamma$  (como parámetros farmacodinámicos) y la Cmin, C2h, Cmax y AUC (como parámetros farmacocinéticos) en una población de transplantados renales en etapa de mantenimiento, pertenecientes a la Unidad de Transplante Renal del Hospital Clínic de Barcelona, tratados con terapias inmunosupresoras basadas en la administración de inhibidores de la fosfatasa calcineurina (iCN: CsA, TRL) en presencia y en ausencia de MMF. La monitorización farmacocinética se realizó en el Laboratorio de Farmacología, Centre de Diagnòstic Biomèdic del Hospital Clínic de Barcelona.

Nuestros principales objetivos se centraron en determinar si la evaluación “in vitro” de la actividad de la enzima diana de los inmunosupresores CsA y TRL, la fosfatasa calcineurina, reflejaba la acción biológica de dichos fármacos, o bien si por el contrario como sucedió en el caso del MMF, debíamos buscar métodos alternativos. Y buscar algún parámetro que fuera capaz de reflejar la acción biológica que realizaban conjuntamente los fármacos implicados en las terapias combinadas estudiadas.

De un total de 65 transplantados renales: 16 recibían CsA, 10 recibían TRL, 14 recibían CsA+MMF, 13 recibían TRL+MMF y 12 MMF; además recibían corticoides. Como grupo control 12 individuos sanos (NHC).

Decidimos medir la actividad calcineurina en lisados de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en vez de determinarla en lisados de sangre total. Los principales motivos se centraron en que nuestro principal interés era evaluar el impacto del fármaco en la actividad enzimática dentro del linfocito, ya que éstos son los principales productores de las citocinas relevantes cuando se produce la alorespuesta. Desde nuestro punto de vista, si

la determinación se llevara a cabo en sangre total, como otros autores proponen, presentaría algunos inconvenientes: En primer lugar la aCN de los linfocitos sólo representa el 10% de la aCN total presente en sangre. Por tanto si utilizamos sangre total la mayor parte de la aCN que valoraríamos no sería la que juega un papel importante en la alorespuesta. Y en segundo lugar como la técnica implica un paso en el que se lisan las células, si se utilizara sangre total, la CsA o en TRL, que in vivo se almacena en los hematíes y no esta al alcance de los linfocitos, quedaría a disposición de éstos, y por tanto se generaría una situación muy diferente a la que se da fisiológicamente. Es por ello que consideramos más correcto primero purificar las PBMC y a continuación realizar el lisado celular, ya que de esta manera sólo valoramos la inhibición de la aCN que se deriva de la presencia de la CsA o TRL intralinfocitaria.

Sin embargo para valorar la producción de citocinas (IL-2, IFN- $\gamma$ ) si que optamos por utilizar como matriz celular sangre total, ya que nos basamos en una técnica descrita por Stein y colaboradores, la cual permite mantener el microambiente linfocitario de forma intacta durante todo el tiempo del ensayo, evitándose cambios en las concentraciones intracelulares de CsA o TRL y por tanto manteniéndose, dentro de un orden, unas condiciones bastante próximas a las fisiológicas.

En primer lugar pusimos a punto las técnicas de evaluación de los parámetros farmacodinámicos “in vitro”. La valoración de la aCN de hecho implica 3 técnicas diferentes: 1/ Obtención del lisado celular; 2/ Marcaje con  $^{32}\text{P}$ -ATP del péptido que actuara como sustrato en el ensayo fosfatasa; 3/ Finalmente la reacción propiamente de actividad fosfatasa. Respecto la obtención del lisado celular, tras realizar una purificación de las PBMC por gradiente de Ficoll a partir de sangre periférica, nos percatamos que una vez



obtenidos estos lisados debían almacenarse en nitrógeno líquido, y no a  $-20^{\circ}\text{C}$  o  $-80^{\circ}\text{C}$ , y un máximo de 15 días, ya que pasado este periodo, se observaba un decaimiento significativo de la actividad enzimática de la calcineurina. Por otro lado como la inclusión de muestras de los pacientes no se podía realizar en 15 días, no podíamos determinar la aCN de todas las muestras con un solo marcaje del sustrato, lo que provocó tener que realizar los marcajes según nos iban llegando las muestras. Al realizar los diferentes marcajes nos dimos cuenta de la necesidad de introducir algún valor interno de referencia que permitiera por un lado minimizar la variabilidad entre marcajes, ya que se utilizan diferentes lotes de radioisótopo, y por otro lado la variabilidad debida al decaimiento que el isótopo  $^{32}\text{P}$  presenta ( $t_{1/2}=15$  días), lo que hace que la actividad total del péptido transcurridos 15 días desde la realización del marcaje pase a ser la mitad en relación al primer día. Hay autores que expresan los resultados de aCN en cuentas por minuto (cpm), lo cual es correcto siempre y cuando todas las muestras se procesaran a la vez y con un mismo péptido marcado. Pero esta no es la situación en la que nos encontrábamos y menos si tenemos en cuenta que esta técnica se podría plantear como un método de monitorización a largo plazo (diferentes marcajes, recepción de muestras en días diferentes). Lo cual nos llevo a planteamos 2 posibilidades nuevas:

1/ Expresar los resultados respecto las cpm liberadas por la actividad de las fosfatasas totales (%P.T). El inconveniente es que no todas las fosfatasas decaen con la misma intensidad y ocurre igual en todas las muestras, por tanto, lo que haríamos sería introducir un nuevo factor de variabilidad.

2/ Expresar los resultados respecto las cpm liberadas por una fosfatasa exógena muy potente, como la fosfatasa alcalina (%P.A.) considerándola la máxima defosforilación del péptido marcado que podemos esperar y por tanto expresando los resultados como un porcentaje respecto dicha fosfatasa. (Anexo 2)

Esta es a nuestro juicio una de las aportaciones significativas de esta tesis ya que hemos adaptado la técnica de medición de la actividad calcineurina, que inicialmente estaba descrita para evaluar todas las muestras en un mismo día de ensayo y con un mismo marcaje, a poder realizarla con muestras recogidas en periodos de tiempo muy amplios ya que la introducción en el ensayo de la fosfatasa alcalina permite procesar las diferentes muestras con marcajes realizados en diferentes días sin que el decaimiento de la radiactividad afecte.

Cuando se diseñó el estudio nos planteamos que puntos dentro del intervalo de dosificación eran lo más adecuados para llevar a cabo la valoración de los parámetros farmacodinámicos. Evidentemente por la complejidad de la técnica de aCN no podíamos abordar un número muy elevado, por lo que decidimos hacer las determinaciones farmacodinámicas pre-dosis matinal y 2h post-dosis. Optamos por este punto post-dosis porque en el caso del ajuste de dosis de la CsA existe una tendencia cada vez más generalizada a monitorizarla en este punto. A partir de estudios multicéntricos se ha demostrado que la concentración a 2h (C<sub>2h</sub>) se correlaciona muy bien con la AUC y la C<sub>max</sub>, por lo que la monitorización en este único punto cada vez tiene una mayor utilidad clínica. Por todo ello nos pareció adecuado elegir también este punto para realizar las determinaciones farmacodinámicas, sobretodo teniendo en cuenta que uno de nuestros objetivos era establecer correlaciones entre los parámetros farmacodinámicos y farmacocinéticos.

Teniendo en cuenta todas estas consideraciones pasamos a evaluar “in vivo” todos estos parámetros con la población anteriormente descrita.

Los resultados que obtuvimos indicaron que no existían diferencias entre la aCN entre los grupos que recibían monoterapias con iCN respecto los que recibían terapias combinadas de iCN y MMF. Todos los grupos tratados con iCN presentaron una inhibición de la aCN estadísticamente significativa respecto al grupo control de individuos no tratados (NHC) ( $P < 0.01$ ). En cambio observamos un incremento de la inhibición de la producción de IL-2 cuando los pacientes recibían conjuntamente iCN+MMF respecto a los que sólo recibían iCN. Las diferencias entre estos dos grupos llegaron a ser estadísticamente significativas ( $P < 0.001$ ).

Respecto la producción de IFN- $\gamma$ , en primer lugar hay que señalar que se trata de un parámetro muy variable en esta población. No encontramos diferencias entre los pacientes tratados sólo con iCN y el grupo control a tiempo pre-dosis, en cambio todos los grupos tratados con iCN presentaron una clara inhibición 2h post-dosis respecto al grupo control.

El perfil farmacocinético fue el esperado teniendo en cuenta las dosis administradas de inmunosupresor a cada paciente.

Respecto las correlaciones entre los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos cabe destacar las existentes entre AUC y C2h con la aCN, seguida por la producción de IL-2. En general, IFN- $\gamma$  presenta unas correlaciones pobres con los parámetros farmacocinéticos, especialmente entre la producción de IFN- $\gamma$  y la Cmin. Existe una muy buena correlación entre la aCN a 0h y 2h tanto en el grupo tratado con CsA como el tratado con TRL y en el caso del primer grupo también presenta una buena correlación entre la producción de IL-2 a 0h y 2h.

## **2.2 CONCLUSIONES**

1/ La evaluación de la actividad calcineurina puede ser de ayuda en el seguimiento del efecto que los inhibidores de la calcineurina (CsA y TRL) realizan sobre el sistema inmunitario, incluso cuando éstos se administran en combinación con MMF.

2/ La medición de la actividad calcineurina en terapias basadas en la combinación de inhibidores de la calcineurina y MMF no refleja el efecto adicional que el MMF realiza sobre el sistema inmunitario.

3/ La producción “in vitro” de IL-2, sin embargo, es un parámetro que si refleja el efecto que los inhibidores de la calcineurina y el MMF realizan conjuntamente sobre el sistema inmunitario.

4/ La producción “in vitro” de IFN- $\gamma$ , es un parámetro cuya utilidad en el seguimiento farmacodinámico de este tipo de población no ha quedado demostrada.

# Pharmacodynamic Approach to Immunosuppressive Therapies Using Calcineurin Inhibitors and Mycophenolate Mofetil

OLGA MILLÁN,<sup>1</sup> MERCÈ BRUNET,<sup>2</sup> JOSEP M. CAMPISTOL,<sup>3</sup> ANA FAURA,<sup>3</sup> ISABEL ROJO,<sup>1</sup>  
ELENA VIDAL,<sup>2</sup> OLGA JIMÉNEZ,<sup>2</sup> JORDI VIVES,<sup>1</sup> FEDERIC OPPENHEIMER,<sup>3</sup> and  
JAUME MARTORELL<sup>1\*</sup>

**Background:** Graft survival depends on adequate immunosuppression. To evaluate the effect on the immune system of immunosuppressive therapies using calcineurin inhibitors (CNIs), several pharmacodynamic indices have been proposed to complement pharmacokinetic data. In this preliminary study we compared some of these parameters during combined immunosuppressant therapies.

**Methods:** We treated 65 stable renal transplant recipients with cyclosporin A (CsA; n = 16), tacrolimus (TRL; n = 10); CsA + mycophenolate mofetil (MMF; n = 14); TRL + MMF (n = 13), and MMF (n = 12). Twelve nontreated healthy controls were also included. Calcineurin activity (CNA) in peripheral blood mononuclear cells was measured using <sup>32</sup>P-labeled peptide. Interleukin-2 (IL-2) and interferon- $\gamma$  production in phytohemagglutinin-activated whole blood were measured at 0 and 2 h postdose. The areas under the curves,  $c_{\min}$ ,  $c_{\max}$ , and concentration at 2 h ( $c_{2h}$ ) were also measured.

**Results:** We found no differences in CNA between groups receiving CNIs alone or combined with MMF [median (25th–75th percentiles)]: CsA<sub>2hr</sub> 3.87 (3.00–6.85)% alkaline phosphatase (AP); CsA+MMF<sub>2hr</sub> 3.90 (1.78–5.19)% AP; TRL<sub>2hr</sub> 5.68 (3.02–16.00)% AP; TRL+MMF<sub>2hr</sub> 11.80 (4.05–14.63)% AP. In vitro IL-2 production was significantly lower in the groups receiving combined therapy than in groups receiving CNIs alone [median (25th–75th percentiles)]: CsA<sub>2hr</sub> 276.52 (190.41–385.25) ng/L; CsA+MMF<sub>2hr</sub> 166.48 (81.06–377.01) ng/L ( $P < 0.001$ );

TRL<sub>2hr</sub> 249.34 (127.48–363.50) ng/L; TRL+ MMF<sub>2hr</sub> 122.13 (51.02–180.00) ng/L ( $P < 0.001$ ). The correlations ( $r$ ) between  $c_{2h}$  and CNA 2 h postdose were as follows: CsA,  $r = -0.74$ ; CsA+MMF,  $r = -0.84$ ; TRL,  $r = -0.70$ ; TRL+MMF,  $r = -0.70$  ( $P < 0.001$  in all cases).

**Conclusions:** The measurement of CNA may be of help in following the effect on the immune system of CNI treatments, even in combined therapies, but does not reflect the additional effect of MMF. In contrast, IL-2 in vitro production reflects the effect of both MMF and CNIs.

© 2003 American Association for Clinical Chemistry

Current standard immunosuppressive therapy protocols are generally highly effective in preventing acute rejection. However, long-term immunosuppressive treatment has substantial adverse effects, and its efficacy in preventing chronic rejection is poor. For this reason there is growing interest in evaluating the efficacy and safety of lower toxicity immunosuppressive therapies such as combinations of calcineurin inhibitors (CNIs)<sup>4</sup> at low doses and antimetabolites such as mycophenolate mofetil (MMF).

The measurement of blood concentrations of immunosuppressants provides only an indirect evaluation of the degree of immunosuppression attained in an individual patient (1, 2) When combined treatments are used, the biological impact may be higher than that predicted by the individual blood concentrations of each immunosup-

<sup>1</sup> Servei Immunologia, <sup>2</sup> Servei de Toxicologia, and <sup>3</sup> Unitat de Trasplantament Renal, IDIBAPS, Hospital Clínic de Barcelona, 08036 Barcelona, Spain.

\*Address correspondence to this author at: Hospital Clínic Servei Immunologia, C/Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. Fax 34-934518038; e-mail jmarto@clinic.ub.es.

Received May 9, 2003; accepted August 1, 2003.

Previously published online at DOI: 10.1373/clinchem.2003.021725

<sup>4</sup> Nonstandard abbreviations: CNI, calcineurin inhibitor; MMF, mycophenolate mofetil; CNA, calcineurin activity; PD, pharmacodynamic; CsA, cyclosporin A; TRL, tacrolimus; IL, interleukin; IFN, interferon; FKBP, FK-binding protein; PK, pharmacokinetic; AUC, area under the curve; NHC, healthy control; DTT, dithiothreitol; PHA, phytohemagglutinin; TFA, trifluoroacetic acid; AP, alkaline phosphatase; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; and MPA, mycophenolic acid.

pressant. Thus the measurement of several markers has been proposed to assess the impact of immunosuppressants on the immune systems of individual patients. Various approaches have been proposed for the pharmacodynamic (PD) monitoring of immunosuppressants: One is evaluation of the activity of the specific target enzyme, such as calcineurin activity (CNA) for cyclosporin A (CsA) and tacrolimus (TRL) (3–5), inosine monophosphate dehydrogenase for MMF (6–8), and P70S6 kinase activity for sirolimus (1, 9). A second approach is the evaluation of an intermediate step in the action mechanism: for example, the measurement of interleukin-2 (IL-2) and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) production in vitro in whole blood for CsA and TRL (10), and DNA duplication for MMF and sirolimus (7, 11). A third possibility is the measurement of collateral markers modified by the presence of the immunosuppressant, such as the T-lymphocyte surface antigens CD25, CD71, and CD154 (12, 13).

CsA and TRL are widely used to prevent rejection in allotransplantation. Both drugs have the same target: the serine/threonine phosphatase calcineurin (CN), or PP2B. One important substrate of this phosphatase is the nuclear factor of activated T cells. Nuclear factor of activated T cells remains in the cytoplasm when it is inactive. It is activated by dephosphorylation effected by CN and migrates to the nucleus, where it participates in the induction of the transcription of genes necessary for lymphocyte expansion, such as IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-3, and tumor necrosis factor- $\alpha$  (14). To inhibit CNA, CsA and TRL must bind to the immunophilins present in the cytoplasm of T lymphocytes: cyclophilins in the case of CsA and FK-binding proteins (FKBPs) in the case of TRL. CsA-cyclophilin (CsA-cyclophilin A) and TRL-FKBP (TRL-FKBP12) complexes inhibit ~80–90% of CNA (15–17).

To our knowledge, no data on the correlation between CNA and IL-2 or IFN- $\gamma$  production have been reported in stable renal patients receiving CsA or TRL alone or in combined therapy with MMF.

The aims of this study were (a) to determine the correlation between the pharmacokinetic (PK) parameters [ $c_{\min}$ ,  $c_{\max}$ ,  $c_{2\text{hr}}$  and area under the curve (AUC)] for CsA and TRL and the different PD indices proposed (CNA and IL-2 and IFN- $\gamma$  production), and (b) to assess the importance of combined therapies on the measurement of CNA and IL-2 and IFN- $\gamma$  production. Establishing additional PD indices to measure the biological impact of immunosuppressants can be of help in the introduction of new immunosuppressant combinations, in the introduction of lower-than-standard doses, and in the study of individual variability in certain special cases.

### Patients and Methods

#### PATIENTS

This was a nonrandomized (non-placebo-controlled) trial. The study was approved by the Institutional Ethical Review Board of Hospital Clínic of Barcelona, and informed consent was obtained from all participants. Sixty-

five stable renal transplant patients (39 males) were included in the study. The mean (SD) age was 58 (14) years, with a mean time since renal transplantation of 56 (14) months. Patients were divided into five groups according to their maintenance immunosuppression treatment: CsA monotherapy (n = 16), TRL monotherapy (n = 10), CsA+MMF (n = 14), TRL+MMF (n = 13), and MMF monotherapy (n = 12). The immunosuppressive drug treatment also included corticoids. All patients were stable, with acceptable renal function [mean serum creatinine 16.0 (4.5) mg/L], and with no episodes of acute rejection in the previous 6 months. No patient had clinical symptoms of nephrotoxicity. Immunosuppressive therapy had been used for more than 7 years in the CsA monotherapy group and for more than 5 years in the other groups. The mean (SD) doses were as follows: CsA monotherapy, 2.60 (0.90) mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>  $\cdot$  day<sup>-1</sup>; TRL monotherapy, 0.08 (0.02) mg<sup>-1</sup>  $\cdot$  day<sup>-1</sup>; MMF monotherapy, 2.00 g/day; CsA+MMF therapy, 1.93 (0.50) mg<sup>-1</sup>  $\cdot$  day<sup>-1</sup> and 2.00 g/day, respectively; and for TRL+MMF, 0.09 (0.04) mg<sup>-1</sup>  $\cdot$  day<sup>-1</sup> and 1.00 g/day, respectively.

We recruited 12 healthy individuals [NHC; mean age 43 (8) years] as a control group for basal determinations.

#### REAGENTS

Protein kinase (3':5'-cyclic AMP-dependent, from bovine heart); okadaic acid; the protease inhibitors aprotinin, leupeptin, and soybean trypsin; phenylmethylsulfonyl fluoride; dithiothreitol (DTT), MES; Tris; phytohemagglutinin (PHA); and trifluoroacetic acid (TFA) were purchased from Sigma. Acetonitrile was provided by Scharlau. CN substrate was obtained from Neosystem S.A. (Groupe SNPE) and [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (10 Ci/L) was purchased from Nuclear Ibérica S.A. C<sub>18</sub> solid-phase extraction columns (Sep-Pak) were from Supelco®. AG50W-X8, 100–200 mesh, cation-exchange resin was obtained from Bio-Rad Laboratories. Alkaline phosphatase (AP; 20 U/ $\mu$ L) was from Boehringer Mannheim. OptiPhase "HiSafe" 2 was from Wallac Scintillation Products. CsA and TRL were kindly supplied by Novartis Farmacéutica S.A. (Barcelona, Spain) and Fujisawa Pharmaceutical Co, Ltd. (Osaka, Japan), respectively. Trichloroacetic acid and K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> were provided by Merck. Human IL-2 and human IFN- $\gamma$  immunoassays were obtained from Immunotech.

#### CELL PREPARATION

Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from the mononuclear cell layer of the Ficoll-Hypaque gradient. The remaining red blood cells were lysed during a short incubation period (10 s) in water followed by addition of an equal volume of phosphate-buffered saline (2 $\times$  concentrate). Washed and pelleted PBMCs (6  $\times$  10<sup>6</sup>) were lysed with 0.3 mL of hypotonic lysis buffer containing protease inhibitors [50 mmol/L Tris (pH 7.5), 0.1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L DTT, 50 mg/L phenylmethylsulfonyl

fluoride, 50 mg/L soybean trypsin, 5 mg/L leupeptin, and 5 mg/L aprotinin]. Lysis was facilitated by three rounds of freezing in liquid nitrogen followed by thawing at 30 °C. Cellular debris was sedimented by centrifugation at 4 °C for 10 min at 12 000g, and the clear supernatant was frozen and stored for at most 2 weeks in liquid nitrogen without significant loss of CN activity (18).

#### PHOSPHORYLATION OF SYNTHETIC PEPTIDE

A 19-amino-acid peptide derived from cAMP-dependent kinase regulatory subunit type II was phosphorylated *in vitro* and used as a substrate to measure CNA. The 19-amino-acid peptide (19mer) sequence was Asp-Leu-Asp-Val-Pro-Ile-Pro-Gly-Arg-Phe-Asp-Arg-Arg-Val-Ser-Val-Ala-Ala-Glu. The lyophilized peptide was dissolved in water to a concentration of 3.30 mmol/L. Phosphorylation of the serine residue with [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP was performed with the catalytic subunit of cAMP-dependent kinase. The kinase reaction contained 50  $\mu$ L of buffer A [40 mmol/L MES (pH 6.5), 0.40 mmol/L EGTA, 0.80 mmol/L EDTA, 4 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.10 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, and 0.10 g/L bovine serum albumin], 12  $\mu$ L of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (10 Ci/L), 9  $\mu$ L of 3.30 mmol/L peptide, 19  $\mu$ L of H<sub>2</sub>O, and 10  $\mu$ L of 160 mg/L protein kinase. After the reaction mixture had incubated for 1 h at 30 °C, we added 900  $\mu$ L of H<sub>2</sub>O.

The phosphorylated peptide was purified by Sep-Pak C<sub>18</sub> chromatography. Columns were prepared using syringes to apply 3 mL of 300 mL/L acetonitrile in 1 g/L TFA followed by 5 mL of 1.0 g/L TFA. The contents of the kinase reaction were then slowly applied to the column. The column was washed with 400 mL of TFA to remove unincorporated ATP. The peptide was then eluted by addition of five 0.5-mL volumes of 300 mL/L acetonitrile in 1.0 g/L TFA. The radiolabeled peptide fractions were pooled and evaporated under argon gas, resuspended with 2 mL of buffer 1 [20 mmol/L Tris-HCl (pH 8), 100 mmol/L NaCl, 6 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.10 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 0.50 mmol/L DTT, and 0.10 g/L bovine serum albumin], and stored at -20 °C (18).

The interassay CV for peptide labeling was 23% and was assessed by phosphorylating the synthetic peptide on different days with the same batch of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP and protein kinase. The intraassay CV of the phosphorylation assay was 5.6% and was assessed by performing five replicates of the phosphorylation assay on the same day.

#### PHOSPHATASE ASSAY (CNA MEASUREMENT)

CNA was measured in treated patients and in the NHC group in the morning predose and 2 h postdose.

Hypotonic lysates of PBMCs were evaluated for their ability to dephosphorylate a <sup>32</sup>P-serine-labeled 19-amino-acid peptide substrate (19mer) in the presence of okadaic acid, a phosphatase type 1 and 2A inhibitor, as described previously by Fruman et al. (18). Background phosphatase

activity (CsA- and okadaic acid-resistant activity) was determined and subtracted from each sample, with the assay performed in the presence and absence of excess added CsA or TRL. The remaining phosphatase activity was taken as CNA (PP2B).

Assays were performed in a final volume of 60  $\mu$ L, in four different tubes. In all tubes we added 20  $\mu$ L of PBMC lysates and 20  $\mu$ L of <sup>32</sup>P-labeled phosphopeptide (final concentration, 5  $\mu$ mol/L) as substrate. In addition, in tube 1 we added 20  $\mu$ L of buffer 1, in tube 2 we added 20  $\mu$ L of buffer 2 (buffer 1 containing 500 nmol/L okadaic acid), in tube 3 we added 20  $\mu$ L of buffer 3 (buffer 2 containing 10  $\mu$ mol/L CsA), and in tube 4 we added 20  $\mu$ L of buffer 4 (buffer 2 containing 100  $\mu$ g/L TRL). Buffer 4 has not been described before and was added to better evaluate samples from patients treated with TRL. We found no significant differences between buffers 3 and 4. The results were expressed in relationship to classic buffer 3. In addition, we measured the total activity of the substrate by counting 20  $\mu$ L in a Beckman scintillation counter on the day of the assay, by measuring the spontaneous release via incubation of the substrate without lysate, and the capacity of AP (20 U) to dephosphorylate the substrate (maximum dephosphorylation).

The mixture was incubated for 30 min at 30 °C, and the reaction was stopped by the addition of 0.8 mL of 100 mmol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> containing 50 g/L trichloroacetic acid. We then added 200  $\mu$ L of cation-exchange resin (AG50W-X8, 100–200 mesh) and shook the suspension for 30 min at room temperature.

Cation-exchange resin was prepared in a batch procedure as follows. We suspended 2 g of dry resin in 50 mL of water. After settling, the water was decanted and replaced with 5 mL of 1 mol/L NaOH. After mixing and settling, the supernatant was decanted completely and replaced with 10 mL of 1 mol/L HCl. After mixing and settling, the supernatant was again decanted, and the resin was washed with 20 mL of water. After removal of this supernatant, the resin was suspended in 2.2 mL of water and stored at 4 °C.

After the incubation, we centrifuged for 2 min at 12 000g. The released inorganic phosphate contained in the supernatant (500  $\mu$ L) was measured by scintillation counting (18).

The initial results indicated the need to introduce an internal value to minimize the variability among different batches of <sup>32</sup>P-labeled peptide and the radioactive decay. The internal value was defined as the capacity of AP to dephosphorylate the synthetic peptide, and it was considered to be the maximum dephosphorylation that could be observed with the peptide batch in use. The internal value was introduced in all remaining experiments. The results for CNA were expressed as: percentage of AP = 100 (cpm released by the sample)/cpm released by the AP). CsA-resistant phosphatase values (standard method) or TRL-resistant phosphatase values (buffer 4) were subtracted

from the phosphatase activity in presence of okadaic acid and CNA (PP2B) was expressed as percentage of AP.

The interassay and intraassay CVs for measurement of CNA were 8% and 5%, respectively. CNA was assessed by individuals who were blinded to the treatment allocation of the patient.

#### MEASUREMENT OF IL-2 AND IFN- $\gamma$ PRODUCTION

IL-2 and IFN- $\gamma$  production was measured in treated patients and in the NHC group in the morning predose and 2 h postdose. IL-2 and IFN- $\gamma$  production was assessed by individuals who were blinded to the treatment allocation of the patient.

We measured the IL-2 and IFN- $\gamma$  production in 950  $\mu$ L of whole blood incubated with 50  $\mu$ L of PHA (1 g/L) and shaken for 5 h at 37 °C. At the end of the incubation, the samples were centrifuged in an Eppendorf microcentrifuge for 2 min, and the supernatant was removed and stored at -80 °C until assayed. IL-2 and IFN- $\gamma$  concentrations were measured by ELISA. The detection limits were 3 ng/L for IL-2 and 80 IU/L for IFN- $\gamma$  (10).

#### MEASUREMENT OF BLOOD CONCENTRATIONS OF CsA AND TRL

CsA concentrations in whole blood were determined by Emit,<sup>®</sup> with a specific monoclonal antibody, on a Cobas Mira automated analyzer (Dade-Behring) as described previously (19). TRL monitoring was carried out by MEIA assay with an IMx analyzer (Abbott) (20). Blood samples for determining the CsA and TRL blood concentration-time curve AUCs were drawn predose ( $c_{\min}$ ) and at 1, 2, 4, 6, 8, 10, and 12 h after the morning dose from stable, treated renal patients. AUCs were calculated by the linear trapezoidal rule.

#### MEASUREMENT OF PLASMA CONCENTRATIONS OF MYCOPHENOLIC ACID

Plasma concentrations of mycophenolic acid (MPA) were analyzed by a validated HPLC-ultraviolet detection method described elsewhere (21, 22). The total run time was 12 min. The working range for MPA was 0.10–50 mg/L, and the within- and between-run CVs ranged from 4.5% to 9.7%.

International CsA, TRL, and MPA Testing Scheme Samples were also analyzed as external controls (from D.W. Holt, European Quality Control, London, UK).

#### STATISTICS

Unless specified, all results are expressed as the median and the 25th–75th percentiles or the confidence interval. In some graphs, the 25th and 75th percentiles are shown. Statistical differences between groups were assessed using the nonparametric Mann–Whitney test. Differences are indicated on the graphs with an asterisk. Correlations between variables were assessed by another nonparametric test, the Spearman test ( $\rho$ ), with SPSS statistical software (SPSS Inc.).  $P < 0.05$  was considered significant.

### Results

#### PK PROFILES OF THE TREATED PATIENTS

The PK parameters studied were  $c_{\min}$ ,  $c_{2\text{h}}$ ,  $c_{\max}$ , and AUC. The results were as expected according to doses received. Note that MMF doses in the TRL+MMF group were lower than for the other groups; as a consequence, the PK parameters are also reduced (Table 1).

#### CNA MEASUREMENTS IN VITRO

Measurement of CNA was validated in vitro. PBMCs from healthy donors were cultured in the presence of

**Table 1. PK profiles of treated patients.**

Group	n	Dose <sup>a</sup>	$c_{\min}$ <sup>b</sup>	$c_{2\text{h}}$ <sup>b</sup>	$c_{\max}$ <sup>b</sup>	AUC <sup>c</sup>
CsA	16	2.60 (0.90) (1.69–3.33)	93.00 (89.60–126.80)	481.00 (345.30–572.70)	570.00 (448.60–761.80)	2642.00 (2555.50–3251.20)
CsA+MMF	14					
CsA		1.93 (0.50) (1.54–2.69)	61.50 (25.00–99.00)	494.50 (95.00–758.00)	693.00 (513.0–1215.0)	ND <sup>d</sup>
MMF		2.00 (0.50–3.00)	2.80 (0.71–6.00)	10.30 (1.80–21.90)	14.40 (2.40–18.40)	ND
TRL	10	0.08 (0.02) (0.06–0.12)	10.80 (6.40–13.50)	21.90 (9.50–34.40)	21.90 (10.10–37.20)	188.80 (99.30–240.30)
TRL+MMF	13					
TRL		0.09 (0.04) (0.03–0.17)	9.15 (3.00–12.40)	13.50 (5.10–25.20)	16.90 (5.30–25.80)	137.90 (57.30–192.00)
MMF		1.00 (0.50–1.00)	1.74 (0.30–4.87)	2.81 (0.45–7.38)	9.40 (3.1–16.00)	29.60 (11.73–65.50)
MMF	12	2.00 (1.40–2.10)	3.10 (0.37–7.20)	5.62 (3.10–6.50)	26.50 (2.60–52.30)	48.00 (28.60–80.70)

<sup>a</sup> Doses for CsA and TRL are the mean (SD) and 95% confidence interval, in  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ . Doses for MMF are the mean and 95% confidence interval, in g/day.

<sup>b</sup>  $c_{\min}$ ,  $c_{2\text{h}}$ , and  $c_{\max}$  values are the median (95% confidence interval) in  $\mu\text{g}/\text{L}$  for CsA and TRL and  $\text{mg}/\text{L}$  MPA.

<sup>c</sup> AUC values are the median (95% confidence interval) in  $\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{L}$  for CsA and TRL and  $\text{mg} \cdot \text{h}/\text{L}$  for MPA.

<sup>d</sup> ND, not done.



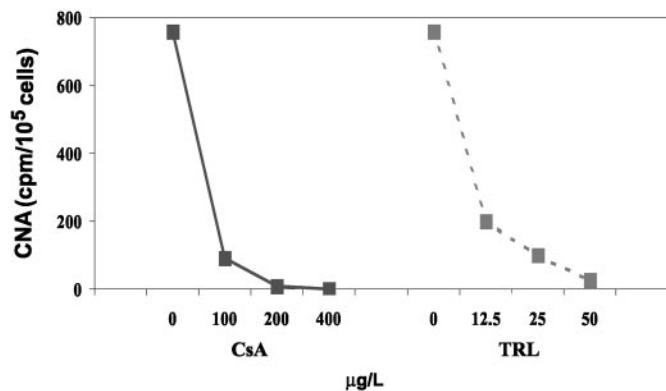


Fig. 1. Measurement of CNA in PBMCs ( $6 \times 10^6$ ) from healthy volunteer, cultured in vitro for 24 h with CsA (0–400  $\mu\text{g/L}$ ) or TRL (0–50  $\mu\text{g/L}$ ).

After 24 h cells were disrupted with hypotonic buffer and the CNA was evaluated. The results are expressed as cpm/ $10^5$  cells.

increasing concentrations of CsA (0–400  $\mu\text{g/L}$ ) or TRL (0–50  $\mu\text{g/L}$ ). After 24 h, cells were lysed, and the CNA was evaluated. The results obtained showed inhibitions >75% when the CsA concentration in cultures was >100  $\mu\text{g/L}$  and the concentration of TRL was >12.50  $\mu\text{g/L}$  (Fig. 1). Inhibitory concentrations may differ in vivo because of a clear difference between the free fraction of the immunosuppressant in biological fluids and in culture medium.

#### CNA MEASUREMENTS IN PATIENTS

CNA was evaluated at 0 and 2 h postdose in the PBMCs of stable renal transplanted patients treated with CsA, TRL, MMF, CsA+MMF, and TRL+MMF (Fig. 2).

The median (25th–75th percentiles) CNA was 37.45 (21.32–56.15)% AP in the NHC group and 24.20 (17.72–35.58)% AP in the MMF group. These values were significantly lower in the CsA group than in NHC or MMF group, both predose [0 h; 6.42 (5.47–10.01)% AP] and 2 h postdose [3.87 (3.00–6.85)% AP;  $P < 0.01$ ; Fig. 2A]. We observed similar values in the CsA+MMF group at 0 h [6.41 (4.88–12.22)% AP] and 2 h [3.90 (1.78–5.19)% AP; Fig. 2A]. The CNA was significantly lower in the TRL group than in the NHC and MMF groups [0 h, 8.66 (6.14–23.94)% AP; 2 h, 5.68 (3.02–16.00)% AP;  $P < 0.01$ ; Fig. 2B] and the TRL+MMF group [0 h, 18.53 (7.63–26.62)%

AP; 2 h, 11.80 (4.06–14.63)% AP;  $P < 0.01$ ], although TRL patients displayed more variability than CsA patients. We found no significant differences in CNA between patients treated with CNIs alone and those treated with CNIs+MMF (Fig. 2).

#### IL-2 AND IFN- $\gamma$ PRODUCTION IN WHOLE BLOOD FROM PATIENTS

IL-2 and IFN- $\gamma$  production after in vitro stimulation of whole blood with PHA was evaluated in the study groups (Figs. 3 and 4). Results showed considerable variability in IL-2 production in the NHC and MMF groups. IL-2 production was lower 2 h postdose in all groups other than the NHC group (Fig. 3). The production of IL-2 postdose in the CsA or TRL+MMF groups [median (25th–75th percentiles), 166.48 (81.06–377.01) ng/L and 122.13 (51.02–180.00) ng/L, respectively] was lower than in the CsA- or TRL-alone groups [median (25th–75th percentiles), 276.52 (190.41–385.25) ng/L ( $P < 0.001$ ) and 249.34 (127.48–363.50) ng/L ( $P < 0.001$ ) respectively; Fig. 3].

We observed no predose differences in IFN- $\gamma$  production between the control group and patients treated only with CNIs [median (25th–75th percentiles), 22.39 (9.78–34.34) IU/mL vs 29.25 (25.55–31.90) IU/mL]. Postdose, blood from the CsA, TRL, and TRL+MMF groups showed clear inhibition compared with blood from the NHC group (Fig. 4).

#### PD AND PK CORRELATIONS

The correlation between the classic PK parameters and PD indices was studied with the nonparametric Spearman test ( $\rho$ ).  $P < 0.05$  was considered significant (Table 2).

There was a significant inverse correlation ( $r > 0.7$ ) between CNA 2 h postdose and the AUC for all groups studied and for CNA 2 h postdose and  $c_{2\text{h}}$ , especially in the CsA and CsA+MMF groups.

IL-2 production 2 h postdose and  $c_{2\text{h}}$  also were significantly inversely correlated in the CsA, CsA+MMF, and TRL+MMF groups, as were IL-2 production 2 h postdose and AUC in the TRL+MMF group.

There was no correlation between IFN- $\gamma$  and  $c_{\text{min}}$  in any group. In contrast, IFN- $\gamma$  production was signifi-

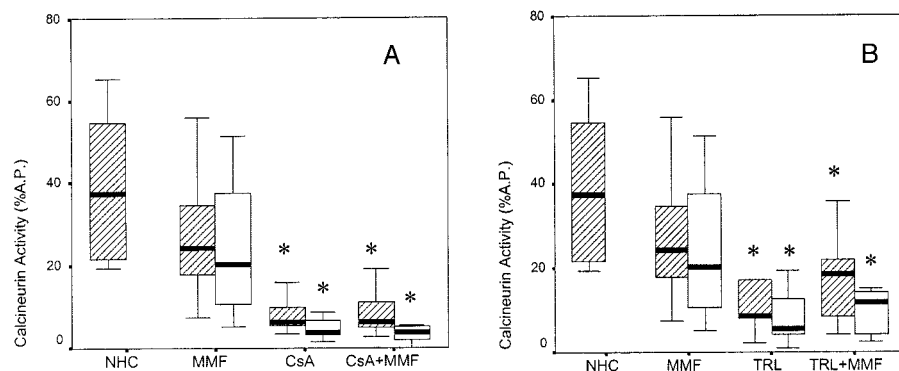
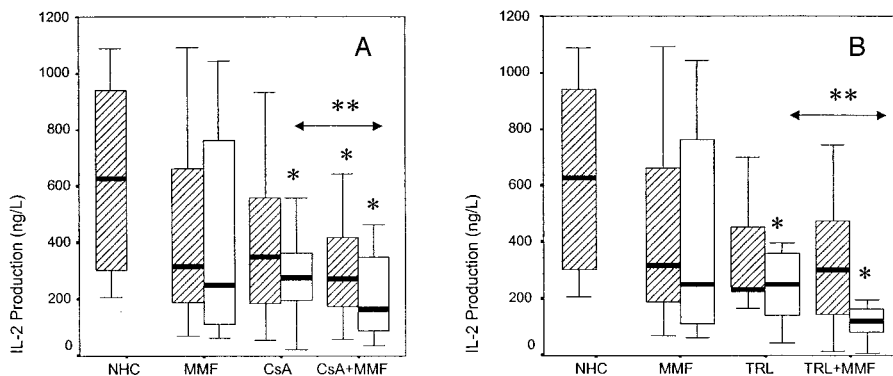


Fig. 2. CNA in transplanted patients treated with CsA ( $n = 16$ ), MMF ( $n = 12$ ), CsA+MMF ( $n = 14$ ), TRL ( $n = 10$ ), and TRL+MMF ( $n = 13$ ) and in NHCs ( $n = 12$ ).

Quartiles 25 and 75 (boxes) and values <1.5 interquartile range (error bars) are shown.  $\square$ , 0 h predose;  $\square$ , 2 h postdose. \*,  $P < 0.05$  compared with the NHC group. The results are expressed as % AP.

Fig. 3. IL-2 production in whole blood stimulated in vitro with PHA (1 g/L) for 5 h at 37 °C with shaking.

▨, 0 h predose; □, 2 h postdose. \*,  $P < 0.05$  compared with the NHC group; \*\*,  $P < 0.05$  between CNI-alone and CNI+MMF groups. Quartiles 25 and 75 (boxes) and values  $< 1.5$  interquartile range (error bars) are shown. The results are expressed as ng/L.



cantly inversely correlated with  $c_{2h}$  and AUC in the CsA group (Table 2).

To identify the redundancy among PD indicators, we studied the correlations between the pharmacodynamics at different times and the various PD indicators (Table 3). We found a strong correlation between CNA 0 h predose and CNA 2 h postdose in all groups ( $r = 0.93$ – $0.96$ ). We also found a significant correlation between IL-2 production 0 h predose and IL-2 production 2 h postdose in the CsA groups ( $r = 0.92$ – $0.96$ ) and the TRL groups ( $r = 0.75$ – $0.82$ ; Table 3).

### Discussion

This study was designed to evaluate the potential usefulness of different PD assays, initially described for the evaluation of CsA treatment, in the evaluation of TRL treatment and of combined therapies with MMF.

This study included PD markers such as CNA in PBMCs and IL-2 and IFN- $\gamma$  production in whole blood along with classic PK parameters, and compared them in stable renal transplant patients treated with CsA or TRL alone or in combination with MMF.

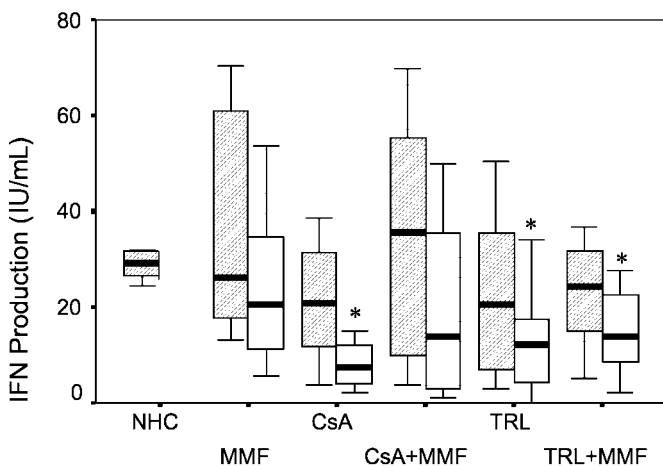


Fig. 4. IFN- $\gamma$  production in whole blood of transplanted patients and NHCs, stimulated in vitro with PHA (1 g/L).

▨, predose; □, 2 h postdose. \*,  $P < 0.05$  compared with the NHC group. Quartiles 25 and 75 (box) and values  $< 1.5$  interquartile range (error bars) are shown. The results are expressed as IU/mL.

We decided to measure CNA in PBMCs and not in whole blood, as other authors have done (23), for several reasons: Our main interest was the impact of the drug on enzyme activity inside the lymphocytes, which are the main producers of relevant interleukins involved in the alloresponse. This impact probably depends on the equilibrium between uptake, cyclophilin binding, P-glycoprotein-dependent excretion, and probably other factors re-

Table 2. Correlations between PD indices and PK parameters.<sup>a</sup>

	Group			
	CsA	CsA+MMF	TRL	TRL+MMF
CNA at 0 h vs $c_{min}$				
$r$	-0.675	-0.811	-0.580	-0.579
$P$	<0.001	<0.001	0.006	0.002
CNA at 2 h vs $c_{2h}$				
$r$	-0.735	-0.842	-0.699	-0.692
$P$	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
CNA at 2 h vs AUC				
$r$	-0.754	ND <sup>b</sup>	-0.803	-0.836
$P$	<0.001	ND	<0.001	<0.001
IL-2 at 0 h vs $c_{min}$				
$r$	-0.492	-0.564	-0.537	-0.553
$P$	0.011	0.005	0.018	0.006
IL-2 at 2 h vs $c_{2h}$				
$r$	-0.701	-0.784	-0.571	-0.806
$P$	<0.001	<0.001	0.011	<0.001
IL-2 at 2 h vs AUC				
$r$	-0.681	ND	-0.656	-0.772
$P$	<0.001	ND	0.004	<0.001
IFN- $\gamma$ at 0 h vs $c_{min}$				
$r$	-0.246	-0.013	-0.296	-0.394
$P$	0.235	0.952	0.233	0.086
IFN- $\gamma$ at 2 h vs $c_{2h}$				
$r$	-0.725	-0.399	-0.456	-0.618
$P$	<0.001	0.050	0.050	0.004
IFN- $\gamma$ at 2 h vs AUC				
$r$	-0.737	ND	-0.619	-0.607
$P$	<0.001	ND	0.010	0.006

<sup>a</sup> A nonparametric Spearman test ( $\rho$ ) was applied.

<sup>b</sup> ND, not done.

**Table 3. Correlations between PD indices.<sup>a</sup>**

	Group			
	CsA	CsA+MMF	TRL	TRL+MMF
CNA at 0 h vs CNA at 2 h				
<i>r</i>	0.930	0.936	0.962	0.940
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
IL-2 at 0 h vs IL-2 at 2 h				
<i>r</i>	0.918	0.958	0.747	0.824
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
IFN- $\gamma$ $\alpha$ T 0 h vs IFN- $\gamma$ at 2 h				
<i>r</i>	0.674	0.819	0.884	0.827
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
CNA at 2 h vs IL-2 at 2 h				
<i>r</i>	0.426	0.792	0.709	0.518
<i>P</i>	0.030	<0.001	0.001	0.011
CNA at 2 h vs IFN- $\gamma$ at 2 h				
<i>r</i>	0.525	0.299	0.454	0.456
<i>P</i>	0.007	0.166	0.050	0.043
IL-2 at 2 h vs IFN- $\gamma$ at 2 h				
<i>r</i>	0.618	0.545	0.402	0.565
<i>P</i>	0.001	0.011	0.110	0.012

<sup>a</sup> A nonparametric Spearman test (*p*) was applied.

lated to each cell type. In our opinion the use of whole blood to measure CNA has two drawbacks: (a) the CN of lymphocytes represents only a small part (<10%) of the whole-blood CN (23), and thus the greater part of the CNA measured when whole blood is used is not relevant; and (b) more importantly, the technique involves a cell disruption step in which the CsA or TRL stored in red blood cells becomes available for lymphocyte CN. In vivo, only intralymphocytic CNIs are available for lymphocyte CN; therefore, the measurement of CNA in whole blood does not reflect the real impact of inhibitors on the immune system.

However, to evaluate IL-2 and IFN- $\gamma$  production, we decided to use whole blood because with the technique described by Stein et al. (10) the lymphocyte microenvironment was maintained throughout the assay time (5 h at 37 °C), and intracellular concentrations changes in CNIs were avoided.

The profile chosen to evaluate PD indices was predose and 2 h postdose for all groups. Although the CsA peak is reached 1 h after drug administration, it is generally agreed that CsA concentrations at 2 h ( $c_{2h}$ ) correlate better with AUC,  $c_{max}$ , and clinical impact. In fact,  $c_{2h}$  values are currently used to adjust CsA concentrations in clinical practice (24, 25). In addition, Caruso et al. (23) showed that the nadir of CNA in PBMCs was at 3 h postdose and that CNA values were very similar at 1, 2, 3, and 5 h postdose. Those authors noted that there was a delay between  $c_{max}$  and the nadir of CNA in PBMCs.

Our results confirm previous reports (4, 5) that measurement of CNA in the PBMCs of patients treated with CsA is feasible with the technique described by Fruman et al. (18). Our findings are similar to those reported by

Batiuk et al. (5), Kung et al. (26), and Halloran et al. (27), who did not observe complete inhibition of CNA in vivo in CsA- and TRL-treated groups.

The inhibition of CNA observed in the CsA and TRL groups compared with the NHC group (83% and 77%, respectively, at 0 h; 90% and 85% at 2 h postdose) was higher than in previous reports. This is probably attributable to our decision to express the CNA results as percentages of the capacity of an AP to release <sup>32</sup>P from the synthetic peptide, which in our opinion increases the stability of this marker by minimizing the variability attributable to differences in the batches of <sup>32</sup>P-labeled peptides and radioactivity decay between assays.

The variability of CNA in TRL-treated patients was higher than in those receiving CsA. Some authors attribute this variability to the fact that the CsA-cyclophilin complex has better accessibility to the active site of the synthetic peptide used (27). Others account for these differences by pointing to the existence of a limiting factor, the active immunophilins present in the lymphocytes; it appears that active FKBP have a greater limiting effect than active cyclophilins (26). In addition, by working with disrupted cells we introduced conditions that are different from those in intact cells, above all in the distribution of certain immunophilins in the various compartments in the lymphocyte. In other words, we may have altered the probability of the formation of the immunosuppressant-immunophilin active complex (CsA-cyclophilin and TRL-FKBP). However, when we used a buffer with TRL in the phosphatase assay (buffer 4; described in *Materials and Methods*) there was no significant change in the results.

In combined therapies with CNIs and MMF, the CNA measurement does not directly reflect the additional immunosuppressive effect of MMF. The measurement of IL-2 production, in contrast, seems to reflect the effect provided by the presence of MMF in CNI therapies, especially postdose. In the NHC group, IL-2 production was highly variable. Variability in the CNI-treated groups was lower, especially postdose. Because of the short in vitro culture time used, IL-2 production depended on the number of preactivated cells present in vivo in each individual. The decrease in variability in the CNI-treated patients postdose indicates that the variability in the number of preactivated cells present in the patients does not disqualify IL-2 production as an indicator of the CNI effect. However, it is likely that longer in vitro incubation times could reduce this variability.

The CNA in patients receiving monotherapy with MMF was not statistically different from that in the NHC control, but it was higher than in patients treated with CNIs.

The decrease in IL-2 production in patients receiving MMF in addition to CNIs in comparison with those receiving CNI alone was probably attributable to the inhibitory effect of MMF on clonal expansion of activated lymphocytes. The decrease in the number of active lymphocytes.

phocytes, rather than a direct effect of MMF on CNA or in the production of IL-2 and IFN- $\gamma$ , was probably responsible for the decrease in production.

IFN- $\gamma$  production is highly variable in this population. There was a lack of correlation between  $c_{\min}$  and IFN- $\gamma$  at 0 h, indicating that IFN- $\gamma$  is not a useful marker for these studies.

IL-2 production was lower in the CsA+MMF group than in the CsA-alone group at 2 h. These differences can not be explained by differences in the CsA concentrations: there was no significant differences in CsA dose [1.93 (0.50) vs 2.60 (0.90)  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ , respectively]. We found only small difference in the  $c_{\min}$  values [median (25th–75th percentiles), 61.50 (39.50–92.50) vs 93.00 (80.75–128.25)  $\mu\text{g}/\text{L}$ , respectively], and some differences in the  $c_{\max}$  were not statistically significant. No differences were evident in the CsA concentrations at 2 h postdose [median (25th–75th percentiles), 494.50 (251.00–654.25) and 481.00 (318.75–561.75)  $\mu\text{g}/\text{L}$ , respectively]; therefore, the presence of MMF seems to be responsible for the additional inhibitory effect on IL-2 production seen at 2 h in the CsA+MMF group.

IL-2 production was lower in the TRL+MMF group than in the TRL-alone group at 2 h. Those differences cannot be explained by differences in the TRL concentrations: neither the doses nor  $c_{\min}$  showed significant differences. The  $c_{2\text{h}}$  was even lower in the TRL+MMF group than in the TRL-alone group [median (25th–75th percentiles), 13.50 (11.70–17.10) and 21.90 (10.35–33.15)  $\mu\text{g}/\text{L}$ , respectively]; therefore, the presence of MMF seems to be responsible for the additional inhibitory effect on IL-2 production seen at 2 h in the TRL+MMF group as well.

These two results suggest that the addition of MMF to CNI therapies increases the inhibition of IL-2 production, although it does not directly affect CNA. The reason could be that reducing the clonal expansion of activated T cells reduces the number of cells ready to produce IL-2 in our *in vitro* assay.

Several strategies have been proposed in the past to monitor the pharmacodynamics of CNI immunosuppressants. Here we compared some of them in monotherapy and combined therapies to identify the most useful ones to monitor the biological impact of new combinations of immunosuppressants, different doses from those considered standard, or the study of problematic patients.

In our study, the PD indicator with the best correlation with AUC and  $c_{2\text{h}}$  was CNA, followed by IL-2 production. In general, IFN- $\gamma$  had the poorest correlation with PK parameters; the correlation was particularly poor between IFN- $\gamma_{0\text{h}}$  and  $c_{\min}$ . IL-2 production, however, seems to reflect the additional immunosuppressive effect introduced by MMF in combined therapies. This additional effect was not detected by CNA determination.

There was a very good correlation with CNA at 0 and 2 h for both CsA and TRL and with IL-2 at 0 and 2 h, especially for CsA.

In conclusion, the measurement of CNA may be a good predictor of the immunosuppression caused by CsA or TRL monotherapies, whereas IL-2 production is potentially more useful for monitoring combined therapies comprising CNIs and MMF.

This study was partially supported by grants from the Fundació Catalana de Trasplantament, Fundació Marató TV3 (003210), and FIS 00/872.

## References

1. Yatscoff RW, Aspeslet LJ, Gallant HL. Pharmacodynamic monitoring of immunosuppressive drugs. *Clin Chem* 1998;44:428–32.
2. Dambin C, Klupp J, Morris RE. Pharmacodynamics of immunosuppressive drugs. *Curr Opin Immunol* 2000;12:557–62.
3. Fruman DA, Klee CB, Bierer BE, Burakoff S. Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK506 and cyclosporin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:3686–90.
4. Batiuk TD, Pazderka F, Enns J, DeCastro L, Halloran PF. Cyclosporine inhibition of calcineurin activity in human leukocytes *in vivo* is rapidly reversible. *J Clin Invest* 1995;96:1254–60.
5. Batiuk TD, Pazderka F, Halloran PF. Calcineurin activity is only partially inhibited in leukocytes of cyclosporine-treated patients. *Transplantation* 1995;59:1400–4.
6. Langman LJ, LeGatt DF, Yatscoff RW. Pharmacodynamic assessment of mycophenolic acid-induced immunosuppression by measuring IMP dehydrogenase activity. *Clin Chem* 1995;41:295–9.
7. Millán O, Oppenheimer F, Brunet M, Vilardell J, Rojo I, Vives J, et al. Assessment of mycophenolic acid-induced immunosuppression: a new approach. *Clin Chem* 2000;46:1376–83.
8. Sanquer S, Breil M, Baron C, Dhamane D, Astier A, Lang P. Induction of inosine monophosphate dehydrogenase activity after long-term treatment with mycophenolate mofetil. *Clin Pharmacol Ther* 1999;65:640–8.
9. Gallant HL, Yatscoff RW. P70 S6 kinase assay: a pharmacodynamic monitoring strategy for rapamycin; assay development. *Transplant Proc* 1996;28:3058–61.
10. Stein CM, Murray JJ, Wood AJJ. Inhibition of stimulated interleukin-2 production in whole blood: a practical measure of cyclosporine effect. *Clin Chem* 1999;45:1477–84.
11. Ferron GM, Pyszczynski NA, Jusko WJ. Gender-related assessment of cyclosporine/prednisolone/sirolimus interactions in three human lymphocyte proliferation assays. *Transplantation* 1998;65:1203–9.
12. Van Gelder T, Klupp J, Kavanau K, Morris RE. Novel mechanisms of action of mycophenolic acid (MPA): inhibition of expression of CD28 and CD154 costimulatory molecules and induction of apoptosis *in vivo* in humans after treatment with mycophenolate mofetil (MMF) [Abstract]. *Transplantation* 2000;69:S393.
13. Barten MJ, Gummert JF, Van Gelder T, Shorthouse R, Morris RE. Assessment of mechanisms of action of immunosuppressive drugs using novel whole blood assays. *Transplant Proc* 2001;33:2119–20.
14. Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 1997;15:707–47.
15. Baksh S, Burakoff SJ. The role of calcineurin in lymphocyte activation. *Semin Immunol* 2000;12:405–15.
16. Schreiber SL. Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science* 1991;251:283–7.
17. Fruman DA, Burakoff SJ, Bierer BE. Immunophilins in protein folding and immunosuppression. *FASEB J* 1994;8:391–400.
18. Fruman DA, Pai SY, Klee CB, Burakoff SJ, Bierer BE. Measurement

- of calcineurin phosphatase activity in cell extracts. *Methods* 1996;9:146–54.
19. Beresini MH, Davalian D, Alexandre S, Toton-Quinn R, Barnett B, Cerelli MJ, et al. Evaluation of EMIT® cyclosporine assay for use with whole blood. *Clin Chem* 1993;39:2235–41.
  20. Brunet M, Pou L, Manzanares C, Palacios G, Corbella J. Multi-center comparison of first-and second-generation IMx tacrolimus microparticle enzyme immunoassays in liver and kidney transplantation. *Ther Drug Monit* 1998;20:676–9.
  21. Brunet M, Martorell J, Oppenheimer F, Vilardell J, Millán O, Carrillo M, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolic acid in stable renal transplant recipients treated with low doses of mycophenolate mofetil. *Transplant Int* 2000;13:S301–5.
  22. Li S, Yatscoff RW. Improved high-performance liquid chromatographic assay for the measurement of mycophenolic acid in human plasma. *Transplant Proc* 1996;26:938–40.
  23. Caruso R, Perico N, Cattaneo D, Piccinini G, Bonazzola S, Remuzzi G, et al. Whole-blood calcineurin activity is not predicted by cyclosporine blood concentration in renal transplant recipients. *Clin Chem* 2001;47:1679–87.
  24. Levy GA. C2 monitoring strategy for optimising cyclosporin immunosuppression from the Neoral formulation. *BioDrugs* 2001;15:279–90.
  25. Nashan B, Cole E, Levy G, Thervet E. Clinical validation studies of Neoral C2 monitoring: a review. *Transplantation* 2002;73:S3–11.
  26. Kung L, Halloran PF. Immunophilins may limit calcineurin inhibition by cyclosporine and tacrolimus at high drug concentrations. *Transplantation* 2000;70:327–35.
  27. Halloran PF, Kung L, Noujaim J. Calcineurin and the biological effect of cyclosporine and tacrolimus. *Transplant Proc* 1998;30:2167–70.

**DATOS EN PRENSA**

**1. MONITORIZACION DEL MICOFENOLATO MOFETIL  
EN PACIENTES VIH POSITIVOS**

**PHARMACOKINETICS AND PHARMACODYNAMICS OF LOW DOSE  
MYCOPHENOLATE MOFETIL IN HIV INFECTED PATIENTS TREATED WITH  
ABACAVIR, EFAVIRENZ AND NELFINAVIR**

**OLGA MILLÁN<sup>1</sup>, MERCÈ BRUNET<sup>2</sup>, JAUME MARTORELL<sup>1</sup>, FELIPE GARCÍA<sup>3</sup>, ELENA VIDAL<sup>2</sup>, ISABEL ROJO<sup>1</sup>, MONTSERRAT PLANA<sup>1</sup>, TERESA GALLART<sup>1</sup>, TOMAS PUMAROLA<sup>4</sup>, JOSE M MIRÓ<sup>3</sup>, JOSE M GATELL<sup>3</sup>.**

Institut Clinic Infeccions i Immunologia (ICII), Servei Immunologia<sup>1</sup>, Toxicologia<sup>2</sup>, Infeccions<sup>3</sup>, Microbiologia<sup>4</sup>, IDIBAPS, Hospital Clinic, 08036 Barcelona, Spain

*Accepted in Clinical Pharmacokinetics (New Zealand) (In press)*

**I.F.: 4,204**

## **1.1 JUSTIFICACION DE LOS EXPERIMENTOS Y SINTESIS DE RESULTADOS**

Dado que recientemente se ha descrito que el Micofenolato Mofetil puede inhibir la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), se está empezando a introducir este fármaco en la terapia que reciben los pacientes infectados por este virus.

El estudio que hemos realizado con pacientes infectados por el VIH se les administró además de la terapia antiretroviral (HAART) dosis bajas de MMF (0.5g/día). En líneas generales, cuando se administran dosis bajas de un fármaco se detecta cierto grado de variabilidad interindividual en términos de eficacia. Las dosis convencionales o estándares utilizadas en los ensayos clínicos se diseñan para que sean eficaces para la mayoría de la población, pero cuando esta se reducen no se sabe que efecto se puede esperar en un individuo concreto. Es por ello que con este tipo de población estudiada era imprescindible monitorizar tanto desde un punto de vista farmacocinético como farmacodinámico el MMF con el fin de llegar a conocer cual es el impacto real de estas bajas dosis.

En este estudio, dada la experiencia que teníamos en la determinación de la actividad IMPDH en transplantados renales, la cual puso de manifiesto la elevada variabilidad del mencionado parámetro, y el hecho de que con este tipo de pacientes consideramos que si trabajábamos con sus linfocitos aislados podríamos estar introduciendo un nuevo factor de variabilidad, causado por las alteraciones intrínsecas presentes en los linfocitos por la propia infección por el virus, decidimos evaluar la Respuesta de CEM como parámetro que reflejara el impacto biológico que el MMF estaba realizando sobre el sistema inmunitario.

Creemos que se puede llegar a establecer una relación entre el parámetro Respuesta de CEM y la eficacia antiretroviral si consideramos los siguientes puntos: 1/ "In vivo" tanto la



proliferación como la síntesis de ADN viral dependiente de la transcriptasa inversa dependen principalmente de la maquinaria linfocitaria. “In vitro” la proliferación de la línea celular CEM depende totalmente de la duplicación del ADN; 2/ A diferencia de lo que ocurre con otros tipos celulares, la síntesis de ADN de los linfocitos y de las líneas celulares linfocitarias dependen de manera muy acusada de la disponibilidad de guanosin trifosfato (GTP) que se produce a partir de xantina monofosfato (XMP). En este paso la enzima IMPDH juega un papel esencial, y no hay que olvidar que dicho enzima es inhibido muy eficazmente por el metabolito activo del MMF: el MPA; 3/ Las células CEM son células linfocitarias que presentan una síntesis de ADN espontánea, dependiente de IMPDH. La inhibición de esta síntesis por parte de los sueros de los pacientes tratados con MMF creemos que refleja, de alguna manera, la capacidad del MMF de interferir en la maquinaria linfocitaria para sintetizar ADN “in vivo”, y en consecuencia la capacidad de interferir en la síntesis de ADN viral, y por tanto indirectamente refleja la capacidad de replicación del virus. Este razonamiento parece, en vista de los resultados obtenidos, que puede ser correcto en el sentido que una menor capacidad de inhibición de la proliferación de la línea celular CEM es más frecuente en los pacientes que aumentan más rápidamente su carga viral tras interrumpir el tratamiento con HAART, a pesar que se debe ampliar el estudio con más pacientes para confirmar este hecho.

La población de estudio consistió en 17 pacientes infectados por el VIH tratados con terapia antiretroviral (HAART), durante un año. Tras el año, 6 (ya que 2 de ellos no completaron el estudio) pacientes se mantuvieron con HAART y los 9 restantes además se les administró el MMF a bajas dosis. Todos presentaban niveles de carga viral indetectable tras recibir un año de terapia HAART (<5copias/ml). Tras 4 meses se les retiró HAART y se mantuvo el MMF en aquellos pacientes que lo recibían. Se evaluó los niveles plasmáticos de MPA y la

respuesta de CEM a los 7, 28, 120 y 150 días del inicio de la terapia con MMF (a día 150 llevaban 30 días sin HAART).

Respecto los parámetros farmacocinéticos no se observaron diferencias significativas entre  $C_{min}$ ,  $T_{max}$ , AUC o  $C_{máx}$  entre los diferentes días de estudio. Y sólo existió una débil correlación significativa entre AUC y los niveles a 2h y 4h post-dosis.

La respuesta de CEM no se vio afectada por la terapia HAART. Las máximas inhibiciones de la respuesta de CEM se observaron a 1h, 2h post-dosis coincidiendo con los máximos niveles de MPA en plasma. Entre 4 y 12h tendieron a recuperarse, incluso en algún caso a 12h llegó a ser superior a la pre-dosis aunque siempre ésta fue inferior a la respuesta obtenida pre-tratamiento.

Tras 12 meses con HAART todos los pacientes tenían niveles plasmáticos de carga viral indetectables a día 0 y 120. (<5copias/ml), 30 días después de retirar la terapia con HAART (día 150):

- 3/9 del grupo que siguió con MMF presentaron niveles de carga viral detectables (>200 copias/ml), mientras que los otros 6 se mantuvieron por debajo de los niveles detectables.
- Todos los pacientes del grupo que no tomaron MMF (6/6) también presentaron niveles de carga viral detectables (>200 copias/ml).

Buscamos, entre los parámetros evaluados, si existía algún marcador diferencial entre los pacientes que habían rebotado en la carga viral de los que no lo hicieron. No se observaron diferencias significativas en  $C_{min}$ ;  $C_{max}$  y AUC entre los que rebotaron en la carga viral y los que no lo hicieron. El único parámetro que marcó diferencia entre los pacientes que

rebotaron respecto los que no fue la Respuesta de CEM. La %CEM a 0h fue mayor en los pacientes del grupo de MMF que aumentaron su carga viral, es decir, aquellos pacientes que no mantenían una respuesta de CEM inhibida durante todo el intervalo de dosificación fueron los que acabaron rebotando en la carga viral.

## **1.2 CONCLUSIONES**

1/ La mayoría de los sueros de los pacientes que recibieron bajas dosis de MMF (0.5g/día) inhibieron la proliferación linfocitaria durante la mayor parte del intervalo de dosificación, a pesar de los bajos niveles de MPA en plasma.

Se identificaron 2 grupos de pacientes:

**1.1** Uno que mantuvo una capacidad inhibitoria de la respuesta CEM por encima del 60% durante todo el intervalo de dosificación (Pre-dosis hasta 12h post dosis)

**1.2** Otro grupo que mantuvo una capacidad inhibitoria de la respuesta de CEM por encima del 60% durante las 4 primeras horas post dosis, disminuyendo esta capacidad por debajo del 60% a partir de las 4h post dosis.

Lo que nos hace postular que el primer grupo mantuvo una deplección de pool de guanosin nucleótidos y un control de la respuesta proliferativa de manera más constante que el segundo grupo.

2/ Los pacientes que no mantuvieron durante todo el intervalo de dosificación un control de la respuesta proliferativa son los que presentaron una mayor tendencia a aumentar la carga viral.

3/ El parámetro Respuesta de CEM puede ser útil en la diferenciación, en términos de eficacia biológica, entre los pacientes más sensibles a una dosis concreta de MMF de los menos sensibles, siendo éstos últimos susceptibles a aumentarles la dosis.

**PHARMACOKINETICS AND PHARMACODYNAMICS OF LOW DOSE  
MYCOPHENOLATE MOFETIL IN HIV INFECTED PATIENTS TREATED WITH  
ABACAVIR, EFAVIRENZ AND NELFINAVIR**

Olga Millán<sup>1</sup>, Mercè Brunet<sup>2</sup>, Jaume Martorell<sup>1</sup>, Felipe García<sup>3</sup>, Elena Vidal<sup>2</sup>, Isabel Rojo<sup>1</sup>,  
Montserrat Plana<sup>1</sup>, Teresa Gallart<sup>1</sup>, Tomas Pumarola<sup>4</sup>, Jose M Miró<sup>3</sup>, Jose M Gatell<sup>3</sup>.

From the departments:

Servei Immunologia<sup>1</sup>, Toxicologia<sup>2</sup>, Infeccions<sup>3</sup>, Microbiologia<sup>4</sup>, IDIBAPS, Hospital Clínic  
de Barcelona, 08036 Barcelona, Spain

Running Title :

PK & PD OF MYCOPHENOLATE MOFETIL IN HIV PATIENTS

CORRESPONDING AUTHOR:

Jaume Martorell,

Hospital Clínic de Barcelona, Servei Immunologia

C/ Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain.

E-mail: [jmarto@clinic.ub.es](mailto:jmarto@clinic.ub.es)

Tel- 34-93.454.49.20; Fax- 34-93.451.80.38; Private. Tel. 34-93.423.50.64

ABBREVIATIONS :

AUC	Area under the curve;
GTP	Guanosine triphosphate;
HAART	Highly active antiretroviral therapy;
IMPDH	Inosine Monophosphate Dehydrogenase;
MMF	Mycophenolate Mofetil;
MPA	Mycophenolic Acid;
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells.





## ABSTRACT

**Background:** The use of mycophenolate mofetil (MMF) in combination with highly active antiretroviral therapy (HAART) has been proposed in order to inhibit human immunodeficiency virus (HIV) replication. Due to the low doses involved, pharmacokinetic-pharmacodynamic monitoring is recommended.

**Objective:** The aim of this study was to characterize the pharmacokinetic and pharmacodynamic monitoring of low doses of MMF (0.25 g bid) in HIV infected patients treated with HAART and after programmed discontinuation of HAART, in order to assess whether low doses of this immunosuppressive agent may provide a biological effect.

**Methods:** Mycophenolic acid (MPA) plasma levels (assessed by HPLC) and the capacity of patients' sera to inhibit CEM cell line proliferation (assessed by <sup>3</sup>H-Thymidine uptake) were measured post dose at 0, 20, 40min & 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12hrs, in 9 HIV infected patients treated with a combination of abacavir, nelfinavir and efavirenz (HAART) and MMF 0.25 g/bid at days 7, 28, 120 and 150 (30 days without HAART) after the treatment initiation. A control group of 6 patients was treated with HAART alone.

**Results:** In the 35 post-dose curves analyzed no differences were found in MPA levels between days 7, 28, 120 and 150: AUC: mean value 15.3mg\*hr/L, range: (10.4-24.4); Cmin: mean value 0.60mg/L, range: (0.20-4.67) and Cmax: mean value 2.60mg/L, range: (0.94-7.98). Pre-treatment patients' sera did not inhibit CEM proliferation. Post-treatment patients' sera inhibited CEM proliferation to < 40% in 25/35 curves at 0hrs (6 of 9 patients), in 34/35 curves at 1hr, in 32/35 curves at 2hrs, in 22/35 curves at 4 hrs, and in 8/35 curves at 12hrs. The MPA level versus CEM proliferation inhibition had an EC50 = 0.33 mg/L. Viral load at day 150 was > 200 copies/ml in 6/6 control patients and in 3/9 patients receiving MMF. These 3/9 patients were the only ones repeatedly unable to inhibit pre-dose CEM proliferation to < 40%.

**Conclusions:** MMF pharmacokinetic profiles in HIV patients under HAART are not significantly different from those found in transplanted patients. Sera from the majority of patients receiving low doses of MMF inhibited lymphocyte proliferation during most of the inter-dose interval, despite low MPA plasma levels. For some patients, higher doses may be necessary: the capacity of sera to inhibit CEM proliferation may help to identify these patients.

## INTRODUCTION

Mycophenolate mofetil (MMF) has been reported to inhibit human immunodeficiency virus (HIV) replication by depleting the substrate (guanosine nucleotides) for reverse transcriptase. Therefore, its use in combination with highly active antiretroviral therapy (HAART) has been proposed for the treatment of HIV infected patients<sup>(1)(2)</sup>.

MMF is a pro-drug that is rapidly hydrolyzed by esterase, in the intestine and blood, into mycophenolic acid (MPA)<sup>(3)</sup>. MPA is a potent inhibitor of inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH), a key enzyme in the *ex novo* synthesis of guanosine triphosphate (GTP)<sup>(4)(5)</sup>. In lymphocytes, GTP levels and clonal expansion are especially dependent on the *ex novo* synthesis of GTP. The MPA-induced GTP depletion of lymphocytes inhibits the induction of cyclin D3. Cyclin D3 is a major component of cyclin-dependent kinase (CDK), and decreases the breakdown of p27<sup>kip1</sup>, a CDK inhibitor, resulting in the arrest of the cell cycle in the early to mid-G1 phase<sup>(4)(6)</sup>. It has also been reported that MPA increases the antiviral activity of the guanosine analog inhibitors such as abacavir<sup>(7)</sup>.

MMF is a drug with a highly variable absorption profile. MPA binds to albumin, so it mostly remains outside the intracellular compartment<sup>(5)</sup>. It is metabolized rapidly (2-4 hrs), generally into the inactive metabolite MPA-glucuronide<sup>(8)</sup>. Two other minor metabolites have also been described: the 7-O-glucose conjugate of MPA (M1) and the acyl glucuronide conjugate of MPA (M2)<sup>(9)(10)</sup>.

The pharmacokinetic monitoring of MPA plasma levels in transplanted patients is a common practice in many transplant centers although the relationship between the efficacy and toxicity at specific concentrations has still to be clearly established<sup>(11)(12)</sup>. The monitoring of MPA through plasma levels (C<sub>min</sub>) helps to ensure minimal levels and avoids toxicity. However, this type of monitoring provides only a limited idea of the degree of the biological effect attained in an individual patient, mainly due to the lack of a strong correlation between C<sub>min</sub>

and the area under the curve (AUC)<sup>(13)</sup>. The effect of MPA on IMPDH is rapidly reversed, since the incubation of cells with MPA (up to 8hr) does not modify the future proliferative capacity of those cells<sup>(14)</sup>. For this reason, the efficacy of MPA depends on the interaction between biologically available MPA and some of its active metabolites with the target enzyme throughout the dose interval. At least two minority metabolites, the 7-O-glucose conjugate of MPA (M1) and the acyl glucuronide conjugate of MPA (M2) have been reported to be active<sup>(10)</sup>. This interaction depends on a combination of factors such as the absorption pattern, plasma transport proteins, lymphocyte cytoplasm binding proteins, timing of metabolite synthesis and destruction, activity of metabolites, and entero-hepatic recirculation<sup>(15)</sup>. Many of these parameters vary from patient to patient and may also be affected by other drugs taken simultaneously, as is the case of HIV infected patients who have received antiretroviral drugs<sup>(16)</sup>. Therefore the use of both pharmacodynamic and pharmacokinetic parameters is especially important in these patients. Two different techniques have been used in the past for the pharmacodynamic study of MMF: the measurement of IMPDH activity in whole blood or in lymphocytes; and the capacity of patients' sera to inhibit the spontaneous proliferation of CEM, a human T lymphoblastoid cell line<sup>(17)(18)</sup>.

Little information was available at the beginning of the study to predict the plasma levels that might be obtained with low doses of MMF, or the drug's pharmacodynamic efficacy in HIV infected patients.

Via pharmacokinetic and pharmacodynamic monitoring, this study aimed to assess whether low doses of MMF (0.25 g bid) in HIV infected patients treated with HAART provide a detectable biological effect. Data are presented on post dose MPA plasma levels and on the capacity of post dose patients' sera to inhibit CEM response at 0, 7, 28, 120, and 150 days after the initiation of MMF treatment.

## **PATIENTS AND METHODS**

### *Patients*

Seventeen chronically HIV-1 infected patients in the very early immunological stage (baseline viral load 200-5,000 copies/ml and baseline CD4+ T lymphocytes above 500 cells/mm<sup>3</sup>) were treated with abacavir (300 mg bid) + efavirenz (600 mg qd) + nelfinavir (1250 mg bid) for 12 months. Thereafter, they were randomly assigned (day 0) to receive either HAART + MMF (0.25g bid) (MMF group, n=9) or HAART alone (HAART group, n=8) treatments for an additional 4 months. HAART was then discontinued (day 120) and MMF administration maintained for 30 additional days in the MMF group. The study time started before the morning dose of MMF and finished in the evening, 12 hrs later. MPA plasma concentrations were measured at 0, 20, 40 min and 1, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 hrs. In order to study CEM response, blood samples were collected in tubes without anticoagulant at 0, 1, 2, 4, and 12 hrs after MMF administration. The study was carried out before the beginning of MMF treatment (day 0) and repeated at 7, 28, 120 and 150 (30 days after HAART discontinuation) thereafter. The study was explained in detail to each patient, and all gave written informed consent. The institutional ethical review board of the Hospital Clínic approved the study.

### *Reagents*

RPMI-1640 culture medium was obtained from Bio-Whittaker (Walkersville, USA). OptiPhase “HiSafe” 2 from Wallac Scintillation products (Turku, Finland). Standards of MPA and carbamazepine were obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Methanol, acetonitrile HPLC grade and glacial acetic acid were purchased from Scharlau (La Jota,

Barcelona, Spain).

### *Cell Line*

The CEM cell line was obtained from American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD). The human T lymphoblastoid cell line was obtained from a Caucasian female with acute lymphoblastic leukemia. We used a sub-clone which we designated CEM.2b (hereafter referred to as CEM). CEM cells were cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% FCS and gentamicin. The cells were grown at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

### *Plasma HIV RNA levels*

Plasma HIV RNA levels were determined using the Amplicor HIV-1 Monitor Ultra Sensitive Specimen Preparation Protocol Ultra Direct Assay (Roche Molecular Systems, Inc., Somerville, NJ, USA) with a quantification limit of 20 copies/mL. Samples below the detection limits of this test were re-tested using the method reported by Schockmel<sup>(19)</sup> with a lower limit of detection of 5 HIV-1 RNA copies/ml. Briefly, HIV particles were concentrated from 1.1mL of plasma by ultra-centrifuging the samples at 23,300 rpm (50,000 X g) for 80 min at 4°C (Heraeus Biofuge 28RS). The pelleted virus particles were lysed, precipitated and washed as with the standard assay, but the residual ethanol was removed in a speed-vac centrifuge in order to avoid inhibition of PCR. The dry pellet was re-suspended in 55microL Specimen Diluent, and RT-amplification, hybridization and detection were performed by the standard method. The amount of QS (Quantitation Standard) added to the working lysis buffer was adjusted to obtain the same concentration as in the standard Amplicor PCR reaction. The RNA concentration was calculated by comparing the total HIV-1 optical density (OD at 450 nm) with the total QS OD of the sample, using a correction factor in the formula (1 instead of 40)

because the volumes of the starting sample and the specimen diluent used for re-suspending the precipitated RNA were different from those described in the standard method. The viral load was performed by individuals who were blind to the treatment allocation of the patient.

#### *Measurement of MPA plasma levels*

Plasma concentrations of MPA were analyzed by a validated, previously reported HPLC method, with a minor modification concerning the internal standard used. Briefly, 100µl of carboxy butoxy ether MPA solution (10 mg/L in methanol) were added to 0.2 ml of human plasma for use as an internal standard and 1ml of 80% V/V methanol in 0.1M acetate buffer, pH=4.4. The mixture was vortexed and centrifuged 10 min, 3500 rpm<sup>(20)</sup>.

Chromatographic analysis of MPA and the internal standard was performed with a C-18 Novapak HPLC column (4.6mm x 25cm; Waters Milford, MA) connected to a reverse phase micro-guard column (Waters Milford, MA). Chromatography was carried out at 25°C with a flow rate of 1.0 ml/min, and monitored at an UV wavelength of 215 nm. The isocratic mobile phase was 0.05% aqueous phosphoric acid: acetonitrile at a ratio of 55:45%.

The total run time was 12 min. The working range for MPA was 0.1 to 50 mg/L, and the limit detection was 0.1mg/L of MPA. Within-run and between-run precision ranges, expressed as coefficients of variation, were from 4.5% to 8.6% and from 5.6% to 9.7% respectively. The concentrations of MPA were determined by the ratio of peak height and the internal standard.

*MPA Calibration method:* A stock solution of 1 g/L of MPA was made with methanol in a clean glass tube and stored at -20°C. The MPA working standard (0.1 g/L) was prepared by further dilution of the stock solution (0.1 ml with 9.9 ml methanol). A calibration curve was performed once a week. To obtain the calibrators, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 and 24 mg/L of

MPA: 5.0 ml aliquots of a drug-free plasma were spiked with 12.5, 25, 50, 150, 300, 600 and 1200 µl of the working standard of MPA (0.1 g/L).

International mycophenolic acid testing scheme samples were also analyzed as external controls (European Quality Control, D.W. Holt, Analytical Unit of St George's Hospital Medical School, London, U.K.). SPSS statistical software was used for analysis (SPSS Inc., Chicago, Illinois).

*MPA Pharmacokinetics Analysis:* MPA plasma levels were measured in the 9 HIV infected patients treated with HAART and MMF. The measurements were performed at pre-dose (0 hr) and post dose at 20, 40 min and 1, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 hrs. MPA plasma levels were studied after the initiation of MMF treatment on days 7, 28, 120 and 150 (30 days without HAART). At day 0, the patients did not receive MMF and so no MPA plasma measurements were performed. One of the curves from day 150 was not available for analysis. The AUC values was evaluated with WinNonLin Professional software version 3.1 (Pharsight, Mountain View, USA), using the trapezoidal rule. Individual data for each time period and patient (AUC, Cmin, Cmax, Tmax) were derived directly from the observed data.

### *Proliferation Cultures*

*With Patients' Sera:* Proliferation cultures with patients' sera of 50% v/v final dilution were performed as previously described<sup>(17)</sup>. In brief: Spontaneously dividing CEM cells were re-suspended in RPMI-1640 containing 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (Cell concentration:  $2 \cdot 10^8$  cells/L). 50 µl of this suspension were seeded in 96-well microtiter plates and 50µl of patients' sera were added. The culture was maintained at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> and 24hrs after the beginning of the culture, <sup>3</sup>H-Thymidine, 1.25 µCi/well, in 25µl was added. Proliferation was measured 48hr after the beginning of culture by a standard system: DNA



was recovered by filtering cultures through nitrocellulose filters, using a “Skatron” culture collector. The <sup>3</sup>H-Thymidine incorporated to DNA was measured in a Beckman Scintillation Counter (Fullerton, CA, USA).

The capacity of patients’ sera to inhibit spontaneous proliferation of CEM cell line was tested. Measurements were performed before initiation of MMF treatment (Pre-Treatment), whilst patients were already receiving HAART and at days 7, 28, 120 and 150 (30 days without HAART) of MMF treatment. Samples were taken pre-dose (0 hrs) and 1, 2, 4 and 12 hrs post-dose. The effect of patients’ sera on CEM proliferation was expressed as CEM response and calculated as follows: [CEM response] = [CEM cpm in patients’ sera] \*100/ [CEM cpm in normal healthy human sera]. A lower percentage of CEM response signifies a higher inhibitory capacity of the patients’ sera.

#### *Emax Model*

To establish the pharmacokinetic and pharmacodynamic relationship we applied a single concentration-response curve using the Emax Model.

Pooling the 173 available pairs of data for CEM response inhibition and measurements of MPA plasma levels, a concentration-response curve was estimated. The curve follows the model  $E = (E_{max} * Conc^n) / (EC_{50}^n + Conc^n)$ , E being the drug effect,  $E_{max} = 100$  the maximum drug effect and n the Hill Factor.

## *Statistics*

Unless otherwise specified, the results are expressed as geometric means and ranges. Statistical differences between variables at different time periods were calculated using the ANOVA for repeated measures. Post hoc analysis of the data was performed with the Bonferroni test. The Mann-Whitney Test was used for unrelated samples and the Wilcoxon test for related samples. Correlation between variables was analyzed using the Rho Spearman test. SPSS statistical software was used for analysis (SPSS Inc., Chicago, Illinois). A *P* value < 0.05 was considered significant. Emax model was calculated by using the software ORIGIN version 6.0 (RockWare Inc., USA).

## **RESULTS**

### **PATIENTS' CHARACTERISTICS**

The mean age of the 17 patients (9 males) was  $36 \pm 3$  years. The risk factors for HIV-1 infection were former drug addiction in 4 cases, homosexual transmission in 9 cases and heterosexual transmission in 4 cases. The patients had been diagnosed with HIV-1 infection between 20 and 87 months prior to initiation of anti-retroviral therapy. None had a medical history of a symptomatic primary infection. The  $\log_{10}$  of the mean (SE) baseline viral load was 3.18 (0.1). The mean (SE) count of baseline CD4+ T cells was 702 (52). No side effects directly attributable to MMF were reported. Two patients from the HAART group were lost to follow-up. Only pharmacodynamic studies at day 0 were done in the HAART group. Treatment compliance was determined using the pill counting system, and was found to be higher than 90%. Before taking MMF, the timing of the last doses was recorded for the pharmacokinetic studies; a median time of 12 hrs was recorded (25-75% Inter Quartile Range 11-14).

### **MYCOPHENOLIC ACID PLASMA MEASUREMENTS**

The pharmacokinetic parameters  $C_{min}$ ,  $C_{max}$ ,  $T_{max}$  and AUC are shown in table 1. No statistical differences were found between days 7, 28, 120 and 150 (30 days without HAART) for any of these parameters. The pooled data on plasma levels attained in the 35 curves performed (9 patients\*4 days -1 lost) are also presented in table 1. As expected there was no strong correlation between MPA trough levels and AUC ( $p=0.69$ ,  $R^2=0.07$ ), whereas a significant though weak correlation was found between AUC and MPA plasma level at 2 hrs ( $p<0.001$ ,  $R^2=0.53$ ) at 4 hrs ( $p<0.0005$ ,  $R^2=0.58$ ).

MPA plasma levels were evaluated at the different days of the study (Fig 1). The variability of time to peak levels was similar to that found in transplanted patients. The maximum MPA plasma levels were achieved around the first hour post dose, with a median value of 2.60 mg/l and range: (0.94-7.98).

## PROLIFERATION INHIBITION

Before initiation of MMF treatment the patients' sera had no inhibitory effect on CEM proliferation, the CEM response being 98.2, 92.6-100.0 (Fig. 2 Pre-treatment). Similar results were found in the HAART group (data not shown).

No differences were observed between CEM response on days 7, 28, 120 or 150 (30 days after HAART discontinuation) Fig 2 (days 7-150). Considering the 35 post-dose curves studied, significant inhibition of CEM response was found during MMF treatment at 0 hrs, before the morning dose (mean value: 28.9, range: 4.9-99.0  $P<0.0001$ ) in comparison with the pre-treatment period. After the MMF dose the CEM response decreased even more at 1 hr (mean value: 10.8, range: 3.3-99.5) (0 hr to 1 hr  $P<0.001$ ) and at 2 hrs (mean value: 14.3, range: 6.5-83.7) (0 hr to 2 hrs  $P<0.001$ ) but not at 4 hrs (mean value: 28.9, range:10.4-88.0). CEM response at 12 hrs (mean value: 51.4, range: 15.4-100.0) was even higher than at 0 hr  $P<0.001$ , but below the value obtained before the initiation of MMF treatment.

On the basis of previous results<sup>(17)</sup> we considered that a patient had a good control of the proliferation response in the interval dose if the pre dose CEM response was below 40%. When our transplanted patients received standard doses of MMF (2-3g/day), all presented pre dose % CEM below 40%, but when they received doses below the standard some presented pre dose % CEM above this figure.

Six out of nine HIV patients treated with MMF had pre dose CEM response < 40% on all days (day 7, 28, 120 and 150). Of the other three patients, two had pre dose CEM response > 40% on all days of the study and the other on two of the four days.

#### CORRELATION BETWEEN MPA PLASMA MEASUREMENTS AND CEM PROLIFERATION INHIBITION

To assess whether CEM response can be predicted by MPA blood levels, the capacity of sera to inhibit CEM proliferation at 0, 1, 2, 4 and 12 hrs was correlated with MPA blood levels at the same times (Fig 3A). As expected, MPA blood levels had a significant negative relationship with CEM response ( $P<0.01$  in all cases). The discriminatory power of MPA plasma levels was especially evident at values of 1 mg/L (1 and 2 hr). (Fig 3A). However, for plasma levels below 1 mg/L, which are predominant at 0, 4 and 12 hrs, CEM response varied widely, even in patients with similar MPA plasma levels (0, 4 and 12 hrs) (Fig 3A).

Pooling the 173 available pairs of data for CEM response inhibition and MPA plasma levels a concentration-response curve was estimated (Emax Model) (Fig 3B). The results obtained were  $EC_{50} = 0.33$  mg/L and  $n = 1.08$  (Steepness), ( $p<0.001$  and  $R^2 = 0.31$ ).

#### VIRAL LOAD AND PHARMACOKINETIC AND PHARMACODYNAMIC PARAMETERS

After 1 year of HAART the level of plasma viral load was undetectable at days 0 and 120 of randomization (<5copies/ml ultra-sensitive method, see Patients and Methods). At day 150, the plasma viral load increased above detectable levels in 3/9 patients of the MMF group and in all of the 6 remaining patients from the HAART group ( $P=0.01$ ). An increase in viral load was defined as an increase in excess of 0.5 log times compared with the viral load before

withdrawal of HAART. In our case since all the patients had a viral load <5 copies/ml before discontinuation of therapy the plasma viral load reached 200 copies/ml (detection level for standard PCR Amplicor-Roche) When the 35 post-dose curves obtained from patients in the MMF group were divided into those belonging to patients who had increased viral load at day 150 and those who had not, no differences were observed for C<sub>min</sub>, C<sub>max</sub> or AUC. However, CEM response at 0 hrs was higher in the MMF patients with increased viral load (p<0.001) following discontinuation of HAART. (Fig. 4) These three patients were the only ones with a pre-dose CEM response over 40% in more than one curve (4 out of 4 curves in 2 patients, and 2 out of 4 in the third one).

## **DISCUSSION**

Our data support the notion that the addition of 0.25 g bid of MMF to traditional HAART in HIV infected patients maintains MPA plasma levels of Cmin (mean value: 0.60 mg/L, range: 0.20-4.67) and AUC (mean value: 15.3 mg\*hr/L, range: 10.4-24.4) with no major changes in Cmin, Tmax, Cmax and AUC during MMF treatment or after HAART withdrawal.

MMF pharmacokinetic profiles in HIV patients under HAART do not differ significantly from those found in transplanted patients<sup>(21)</sup>. Those levels can be considered to be below target values in transplanted patients, in which recommended intervals are from 1 to 3.5 mg/L for Cmin and between 30 and 60 mg\*hr/L for AUC <sup>(14)(22)</sup>. Some MMF pharmacokinetic studies have been reported previously, by Margolis et al.<sup>(23)</sup> in a similar though smaller cohort. Our results for trough levels, Cmax and AUC were comparable to the results presented there. Our data also confirm that no significant changes occurred in these parameters throughout the 20 weeks of study.

Nonetheless, the sera of patients from the MMF group had the capacity to inhibit the spontaneous *in vitro* proliferation of a T cell line, at least during part of the inter-dose interval. This may be a sign of the capacity of these sera to inhibit IMPDH and to deplete guanosine nucleotides (GTP) which are necessary for DNA synthesis.

MPA has been shown to inhibit HIV infection both *in vitro* and *in vivo*, and its use in combination with HAART has been proposed<sup>(1)</sup>. The data presented here, indicating that the viral load increases more frequently in the HAART group than in the MMF group, corroborate those findings.

Theoretically, the GTP depletion induced by MPA could participate in the inhibition of viral load: 1) by inhibiting the DNA synthesis dependent on reverse transcriptase activity and in consequence the infection of new lymphocytes, or 2) by reducing the proliferation and in

consequence the number of activated CD4+ lymphocytes which are the major producers of viral particles and the main target for infection of new lymphocytes<sup>(1)</sup>.

Some authors postulate that the effects of MMF on HIV can be achieved without blocking T cell proliferation by an as yet undescribed mechanism<sup>(24)</sup>. Our data indicate that even doses as low as 0.25g/bid can affect lymphocyte proliferation, and for this reason no new mechanism is strictly necessary to explain the antiviral effect. The classical cascade described for MPA, including 1) GTP depletion in lymphocytes by inhibition of ex novo synthesis of GTP, 2) induction of cyclin D3 (a major component of cyclin-dependent kinase), 3) a decrease in degradation of p27<sup>kip1</sup> (a cyclin-dependent kinase inhibitor); and 4) inhibition of pRb phosphorylation and arrest of DNA duplication machinery<sup>(4)</sup>, could also explain the antiviral effect of MMF. In our opinion the arrest of the DNA duplication machinery induced by inhibition of pRb phosphorylation could affect both viral production and reverse transcription. With the aim of designing a timing strategy able to improve the inhibitory effects on replication of the HIV virus whilst minimizing the effect on the immune defense system, we carefully collected pharmacokinetic or pharmacodynamic data on the use of MPA in HIV infected patients undergoing HAART.

Pharmacodynamic evaluation of MMF has been performed in the past by two methods: One is the measurement of IMPDH activity in whole blood or lymphocytes<sup>(25)(26)</sup>, a method that we have used in kidney transplant patients<sup>(17)</sup>. The other is based on the capacity of sera from patients under MMF treatment to inhibit CEM proliferation (CEM response). This inhibition is dependent on IMPDH inhibition<sup>(17)</sup> and has been considered an alternative to the IMPDH activity method, also discussed by other authors<sup>(27)(28)</sup>.

In the present study the CEM proliferation method was used instead of the IMPDH measurement, for 3 reasons: 1) The variability of IMPDH measurement during the inter-dose interval reported by other authors<sup>(26)</sup>; 2) The inter-individual variability of the pre-dose values even in non-treated patients<sup>(17)</sup>; and 3) The variability factor introduced by the intrinsic



alterations of lymphocytes due to HIV infection.

The DNA synthesis of lymphocytes and CEM (a lymphocytic cell line), but not of other cells, is highly dependent on the availability of the GTP produced from XMP by IMPDH. Since IMPDH activity is inhibited by MPA, the inhibition of CEM cell DNA synthesis by patients' sera to an extent reflects the capacity of MPA, or of the active metabolites present in patients' sera, to interfere with *in vivo* lymphocytic DNA synthesis machinery and proliferation. Since HIV reverse transcriptase induced DNA synthesis depends mainly on the lymphocyte machinery it is probable that the reverse transcriptase effect will also be inhibited<sup>(1)(2)(29)(30)</sup>. In addition, the inhibition of lymphocyte proliferation and its effect on the number of available activated lymphocytes may well reduce both the replication rate of the virus and the number of preferential targets for the new infection. Recent data<sup>(23)</sup> indicate that doses of MMF double those used in this study are able to deplete GTP and to decrease plasma HIV RNA viral load.

In a previous paper<sup>(17)</sup> we have shown that the CEM response is not modified *in vitro* or *in vivo* by the presence of immunosuppressants such as corticosteroids or Cyclosporine A. Not even the presence of anti-HLA antibodies seems to affect this test. In order to use CEM response in this study, it was necessary to show that this parameter was not affected by HAART and other drugs taken by HIV infected patients. Our data indicate that CEM response is not altered by drugs taken by the same patients before initiation of MMF administration, (Fig 2 "Pre-treatment"), but is altered 7 days afterwards. CEM response is clearly inhibited at 0, 1, 2 and 4 hrs and this pattern persists with no major differences at day 28, 120 and 150. This is particularly the case for post-dose inhibitory capacity at 1 and 2 hrs (Fig 2).

Considering the 35 sequential post-dose curves studied in the 9 patients, CEM response was maintained below 40% pre-dose in 25 out of 35 events at 0 hrs, at 1 hr 34/35, at 2 hrs 32/35, at 4 hrs 22/35, and at 12 hrs 8/35. There was a surprisingly poor correlation ( $R^2=0.22$ ) between the CEM response results at 0 hrs and those obtained at 12 hrs (taken pre-dose time).

CEM response is lower at 0 hrs (mean value: 28.9, range: 4.9-99.0) than at 12 hrs (mean value: 51.3, range:15.4-100.0)  $p < 0.001$ . This phenomenon was not seen in organ transplant patients, in whom the correlation between 0 hrs and 12 hrs was very good ( $R^2 = 0.94$ )<sup>(17)</sup>. The MPA plasma levels at 0 hrs (Cmin mean value: 0.60, range: 0.20-4.67) in the morning were higher than 12 hrs later in the evening (Cmin of the next dose mean value: 0.36, range:0.20-1.02 mg/L)  $P < 0.0001$ . A possible circadian rhythm effect or an entero-hepatic re-circulation related effect may account for these differences between 0 hrs and 12 hrs. Another explanation may be the interference of efavirenz, taken with the night dose but not the morning dose. Efavirenz has previously been reported to modify the metabolism of other drugs, though at present this is only speculation. Besides, we observed that the correlation between CEM response at 0 hrs and 12 hrs and the correlation between MPA levels at 0 hrs and 12 hrs at day 150 (30 days after HAART discontinuation, so without efavirenz) were also poor. So it seems that drugs taken in HAART do not have a direct effect on the metabolism of MMF and probably the explanation for this phenomenon lies elsewhere.

The data presented in the MPA concentration versus CEM response inhibition curve show an EC<sub>50</sub> of 0.33 mg/L (Fig 3B). This figure also indicates that when plasma levels are over 1 mg/L, CEM response is a poor discriminator of individual variability, since it is below 40% in most cases. In contrast, for plasma levels below 1 mg/L, which are predominant at 0, 4 and 12 hrs (Fig. 3A), CEM response inhibition seems to provide a more potent discriminatory capacity. In general, the correlation between the experimental data and the theoretical model (E<sub>max</sub> model) is acceptable. Nonetheless, for MPA levels between 0.33 and 1.00 mg/L a few points of CEM response inhibition are lower than expected. This could be due to the fact that at those MPA levels the CEM response inhibition parameter, is not sufficiently sensitive. However, the possibility that CEM response reflects the “in vivo” effect better than MPA plasma measurements at these levels cannot be ruled out. In that case changes in the MPA free fraction could be the reason. Of course it should be borne in mind that both parameters

are indirect measurements in a body fluid, and are thus both subject to experimental error, being obtained from different patients with different treatment periods and post dose times; nonetheless, in our opinion the experimental data fit the theoretical model quite well.

The *in vitro* studies indicate that in our model the inhibitory effect of MPA is also reversible. CEM cells and activated peripheral blood mononuclear cells cultured for more than 8 hours *in vitro* with MPA (3 mg/L) maintained their proliferative capacity after MPA removal (data not shown).

The relevant question is: how long should GTP depletion be maintained in order to inhibit viral replication and T cell proliferation? The protocol used in this study maintained the inhibitory capacity of sera on T cell proliferation throughout the dose interval in only one group of patients. A transitory inhibition was observed in another group. The present protocol obtained partial efficacy in terms of short-term viral replication. To improve the viral replication results in future studies, three theoretical possibilities need to be taken into consideration: 1) whether it is necessary to maintain inhibition throughout the dose interval; 2) whether in fact there is no need to maintain inhibition throughout the dose interval, and that a period of proliferation is advisable to allow cellular antiviral immunity to expand; and 3) although a period of proliferation contributes to restoring immunity, the period of proliferation inhibition should be long enough to induce non reversible apoptosis in infected cells.

If maintaining inhibition throughout the dose interval is necessary, two guidelines should be considered. First, the dose should be increased in all patients; according to previous data doses of 0.5 g bid (>20 mg/Kg/day) of MMF seem to inhibit proliferation throughout the dose interval in almost all patients<sup>(15)</sup>. Second, the CEM response parameter should be used to distinguish between the less sensitive and the more sensitive patients, increasing doses only in the former.



## **CONCLUSIONS**

The inhibitory capacity of MMF-treated patients' sera on CEM response could be a useful parameter to evaluate the efficacy of MMF treatment in individual patients.

MMF pharmacokinetic profiles in HIV patients under HAART do not differ significantly from those found in transplanted patients. There are not enough data to establish a cut off point that establishes the MPA C<sub>min</sub>, AUC or percentage of CEM inhibition necessary to ensure inhibition of viral replication. However, some general guidelines can be proposed. The use of low doses such as 0.25 g/12 hrs will divide the population into at least two groups; one that maintains an inhibitory capacity of over 60% (< 40% CEM response, 6 of 9 patients) throughout the entire dose interval, and another that maintains this capacity only during 0 to 4 hrs post-dose. It is possible that GTP depletion and the control of the proliferative response will be more constant in the first group. The data presented here suggest that patients who did not maintain inhibition throughout the dose interval had a higher tendency towards early viral increase.

The effect of MMF on CEM response in a particular patient may help to explain the success or failure of the inhibition of viral load and the real effect on disease progression. In our opinion, CEM response can be used to distinguish the less sensitive from the more sensitive patients, and doses should be increased only in the former. However, further studies are necessary to support this hypothesis.

## **FOOTNOTES**

### **Financial support:**

This study was partially funded by grants from: Fundació Catalana de Trasplantament, FIPSE 3118/00, FIS 01/1595, SAF 01/2591, Fundació Marató TV3 003210

## **REFERENCES**

- (1) Chapuis AG, Paolo Rizzardi G, D'Agostino C, et al. Effects of mycophenolic acid on human immunodeficiency virus infection in vitro and in vivo. *Nat Med* 2000; 6:762-8
- (2) Coull JJ, Turner D, Melby T, et al. A pilot study of the use of mycophenolate mofetil as a component of therapy for multidrug-resistant HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2001; 26:423-34
- (3) Ransom TJ. Mechanism of action of mycophenolate mofetil. *Ther Drug Monit* 1995; 17:681-84
- (4) Laliberté J, Yee A, Xiong Y et al. Effects of guanine nucleotide depletion on cell cycle progression in human T lymphocytes. *Blood* 1998; 91:2896-904
- (5) Allison AC, Eugui EM. Purine metabolism and immunosuppressive effects of mycophenolate mofetil (MMF). *Clin Transpl* 1996; 10:77-84
- (6) Allison AC, Eugui EM. Immunosuppressive and other effects of mycophenolic acid and an ester prodrug, mycophenolate mofetil. *Imm Rev* 1993; 136:5-28
- (7) Margolis D, Heredia A, Gaywee J, et al. Abacavir and mycophenolic acid, an inhibitor of inosine monophosphate dehydrogenase, have profound and synergistic anti-HIV activity. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999; 21:362-70

- (8) Shaw LM and Nowak I Mycophenolic acid: Measurement and relationship to pharmacologic effects. *Ther Drug Monit* 1995; 17:685-89
- (9) Griesmacher A, Weigel G, Seebacher G et al. IMP-dehydrogenase inhibition in human lymphocytes and lymphoblasts by mycophenolic acid and mycophenolic acid glucuronide. *Clin Chem* 1997; 43:2312-17
- (10) Schütz E, Shipkova M, Armstrong VW, et al. Identification of a pharmacologically active metabolite of mycophenolic acid in plasma of transplant recipients treated with mycophenolate mofetil. *Clin Chem* 1999; 45:419-21
- (11) Shaw LM, Nicholls A, Hale M, et al. Therapeutic monitoring of mycophenolic acid: a consensus panel report. *Clin Biochem* 1998; 31:317-22
- (12) Cox VC, Ensom MH. Mycophenolate mofetil for solid organ transplantation: does the evidence support the need for clinical pharmacokinetic monitoring? *Ther Drug Monit* 2003; 25:137-57
- (13) Batiuk TD, Urmson J, Vincent D, et al. Quantitating immunosuppression. *Transplantation* 1996; 61:1618-24
- (14) Stet EH, De Abreu RA, Bokkerink JP, et al. Inhibition of IMP dehydrogenase by mycophenolic acid in Molt F4 human malignant lymphoblasts. *Ann Clin Biochem* 1994; 31:174-80



- (15) Johnson AG, Rigby RJ, Taylor PJ, et al. The kinetics of mycophenolic acid and its glucuronide metabolite in adult kidney transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther* 1999; 66:492-500
- (16) De Maat MMR, Ekhardt GC, Huitema ADR, et al. Drug interactions between antiretroviral drugs and comedicated agents. *Clin Pharmacokinet* 2003; 42:223-82
- (17) Millán O, Oppenheimer F, Brunet M, et al. Assessment of mycophenolic acid-induced immunosuppression: a new approach. *Clin Chem* 2000; 46:1376-83
- (18) Langman LJ, LeGatt DF and Yatscoff RW. Pharmacodynamic assessment of mycophenolic acid-induced immunosuppression by measuring IMP dehydrogenase activity. *Clin Chem* 1995; 41:295-99
- (19) Schockmel G, Yerly S and Perrin L. Detection of low HIV-1 RNA levels in Plasma. *J Acqui Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997; 14:179-83
- (20) Li S and Yatscoff RW. Improved high-performance liquid chromatographic assay for the measurement of mycophenolic acid in human plasma. *Transpl Procc* 1996; 26:938-40
- (21) Brunet M, Martorell J, Oppenheimer F et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolic acid in stable renal transplant recipients treated with low doses of mycophenolate mofetil. *Transpl Int*. 2000;13 Suppl 1:S301-305.

- (22) Hale MD, Nicholls AJ, Bullingham RE, et al. The pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship for mycophenolate mofetil in renal transplantation. *Clin Pharmacol Ther* 1998; 64:672-83
- (23) Margolis MD, Kewn S, Coull JJ, et al. The addition of mycophenolate mofetil to anti-retroviral therapy including Abacavir is associated with depletion of intracellular Deoxyguanosine Triphosphate and a decrease in plasma HIV-1 RNA. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; 31:45-9
- (24) Hosain MM, Coull JJ, Drusano GL, Margolis MD. Dose proportional inhibition of HIV-1 replication by mycophenolic acid and synergistic inhibition in combination with abacavir, didanosine, and tenofovir. *Antiviral Research* 2002, 55:41-52
- (25) Langman LJ, Shapiro JAM, Lakey JRT, et al. Pharmacodynamic assessment of mycophenolic acid-induced immunosuppression by measurement of inosine monophosphate dehydrogenase activity in a canine model. *Transplantation* 1996; 61:87-92
- (26) Sanquer S, Breil M, Baron C, et al. Induction of inosine monophosphate dehydrogenase activity after long-term treatment with mycophenolate mofetil. *Clin Pharmacol Ther* 1999; 65:640-48
- (27) Wong SH. Therapeutic drug monitoring for immunosuppressants. *Clin Chim Acta* 2001; 313:241-53
- (28) Shaw LM, Holt DW, Oellerich M, et al. Current issues in therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid: report of a roundtable discussion. *Ther Drug Monit* 2001; 23:305-15

(29) Dyrhol-Riise AM, Ohlsson M, Skarstein K, et al. T cell proliferation and apoptosis in HIV-1-infected lymphoid tissue: impact of highly active antiretroviral therapy. *Clin Immunol* 2001; 101:180-91

(30) Orendi JM, Bloem AC, Borleffs JC, et al. Activation and cell cycle antigens in CD4+ and CD8+ T cells correlate with plasma human immunodeficiency virus (HIV-1) RNA level in HIV-1 infection. *J Infect Dis* 1998; 178:1279-87



**TABLE 1****MYCOPHENOLIC ACID PLASMA LEVELS**

	<b>All curves</b> N=35	<b>Day 7</b> N=9	<b>Day 28</b> N=9	<b>Day 120</b> N=9	<b>Day 150</b> N=8.
<b>HAART</b>		YES	YES	YES	NO
<b>Cmin</b>	mg/L.				
A. Mean	0.81	1.05	0.68	0.51	1.03
95% CI	0.48-1.15	0.00-2.10	0.53-0.84	0.38-0.64	0.00-2.27
G. Mean	0.60	0.64	0.65	0.49	0.63
Minimum	0.20	0.20	0.31	0.34	0.25
Maximum	4.67	4.51	1.00	0.93	4.67
Median	0.55	0.55	0.72	0.48	0.50
<b>Cmax</b>	mg/L.				
A. Mean	2.99	2.71	2.73	2.65	3.97
95% CI	2.42-3.56	1.27-4.17	1.30-4.16	2.10-3.21	2.44-5.50
G. Mean	2.60	2.20	2.31	2.54	3.67
Minimum	0.94	0.95	0.94	1.23	2.12
Maximum	7.98	6.30	7.16	3.41	7.98
Median	2.67	2.02	2.18	2.84	3.68
<b>Tmax</b>	Hr				
Median	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Minimum	0.33	0.33	1.00	0.33	0.66
Maximum	4.00	4.00	2.00	2.00	2.00
<b>AUC</b>	mg*hr/L.				
A. Mean	15.6	15.2	15.6	14.7	16.9
95% CI	14.5-16.6	12.7-17.8	13.6-17.5	12.8-16.5	13.9-20.0
G. Mean	15.3	14.9	15.4	14.5	16.6
Minimum	10.4	10.4	13.2	10.6	12.4
Maximum	24.4	20.3	21.3	18.2	24.4
Median	15.0	15.0	15.4	14.7	16.2

Cmax, maximum concentration; Cmin, predose concentration; CI , confidence interval; Tmax, time at maximum concentration; AUC, area under the concentration-time curve; A. Mean, arithmetic mean; G. Mean, Geometric Mean.



## **FIGURE LEGENDS**

**FIGURE 1.** Mycophenolic Acid (MPA) plasma levels post-administration of Mycophenolate Mofetil (MMF) dose (0.25 g/bid) at 0, 20, 40 min and 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 hrs on the four days of study: days 7, 28, 120 and 150. Gray line shows individual data, Dark line (P) median of the group.

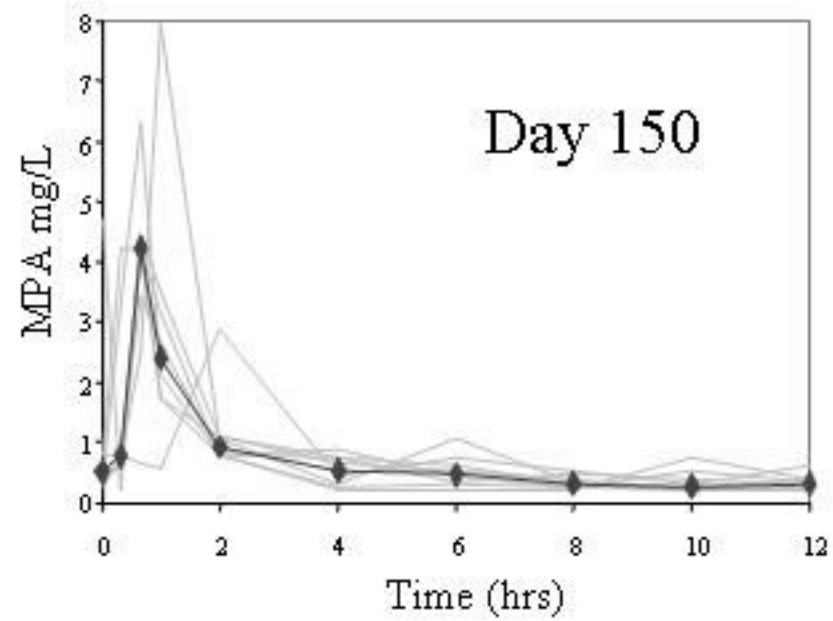
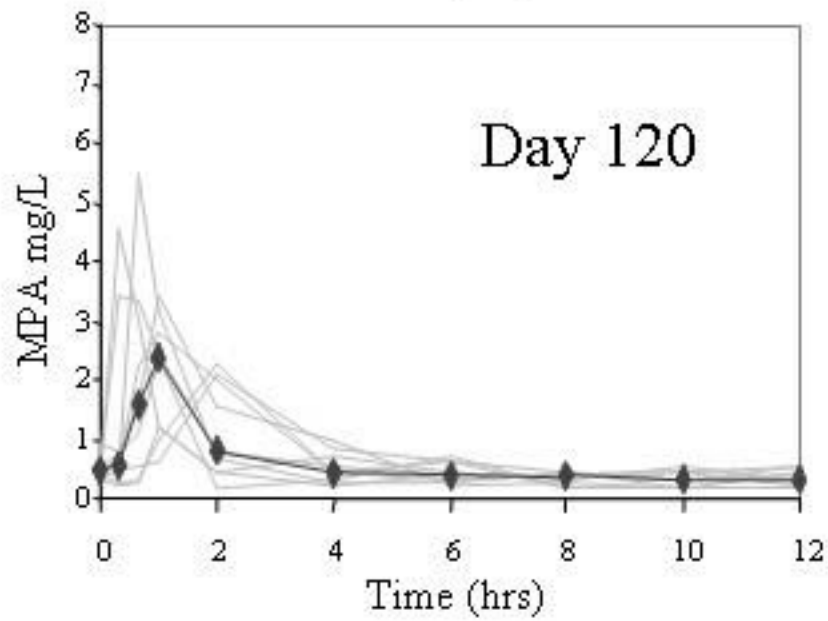
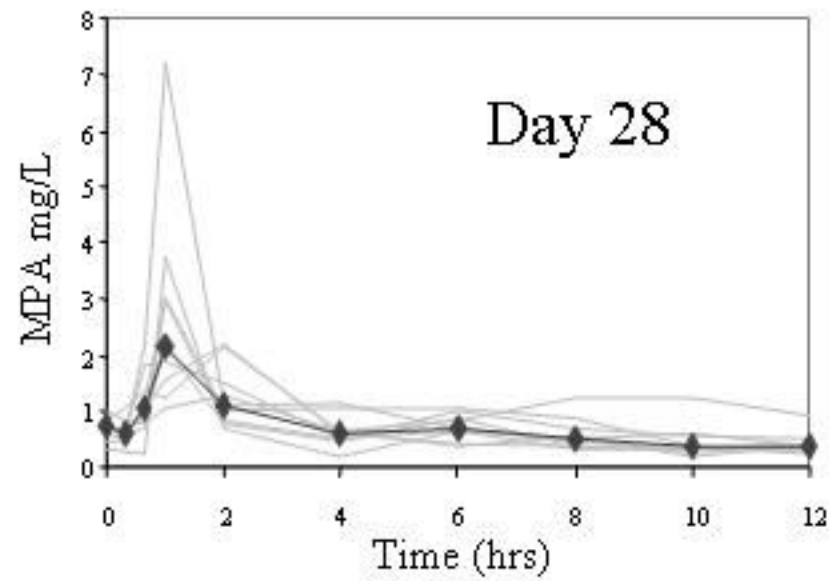
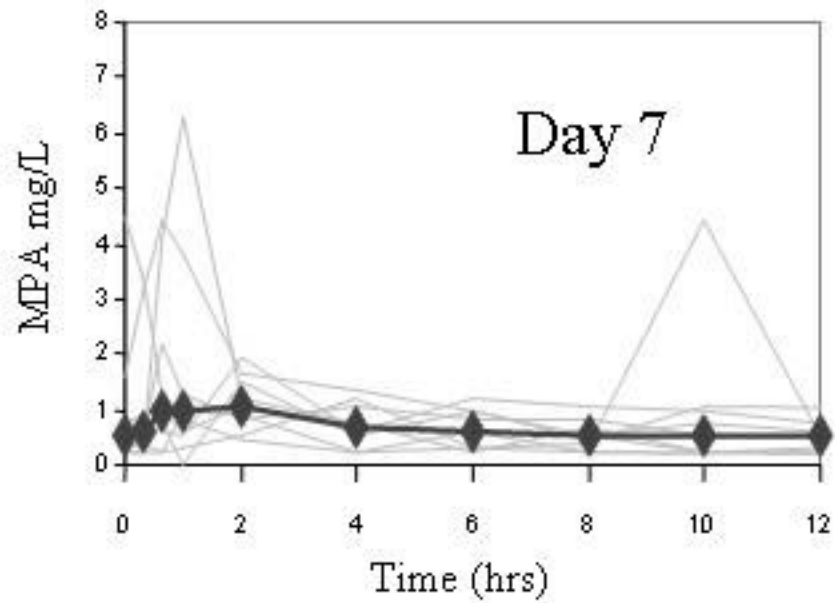
**FIGURE 2.** CEM cell proliferation in the presence of patients' sera before initiation of Mycophenolate Mofetil (MMF) treatment (Pre-Treatment), and after initiation of MMF treatment: pre-dose (0hr) and at 1, 2, 4, and 12hr post dose, on the four days of study: days 7, 28, 120 and 150. The results are expressed as % of cpm of CEM cell cultured with normal human sera. Quartile 25 and 75 (box), values < 1.5 inter quartile range (line), and extreme values > 1.5 inter quartile range (O & \*) are shown.

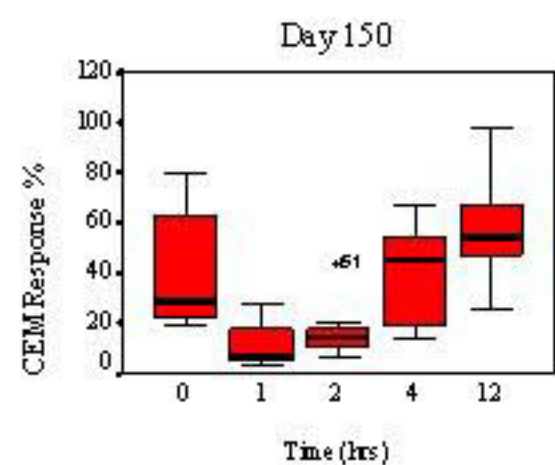
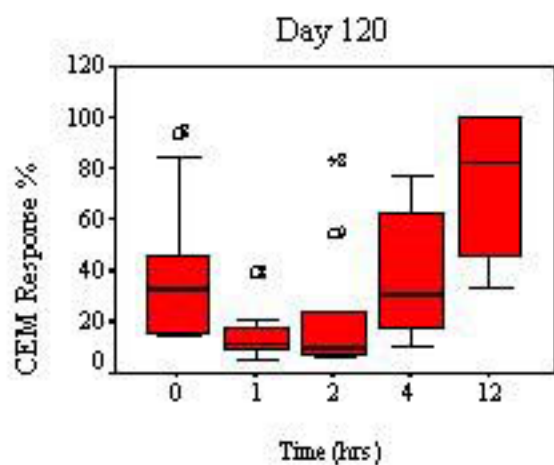
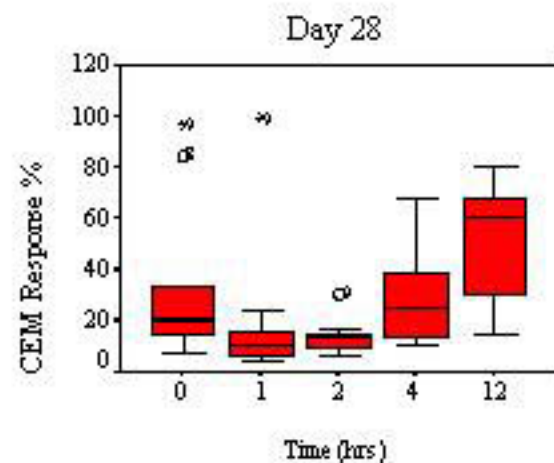
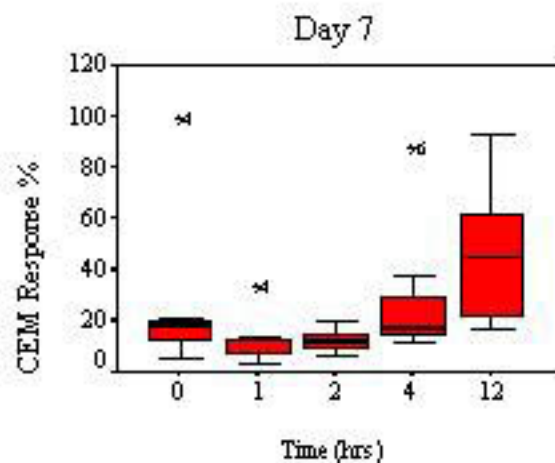
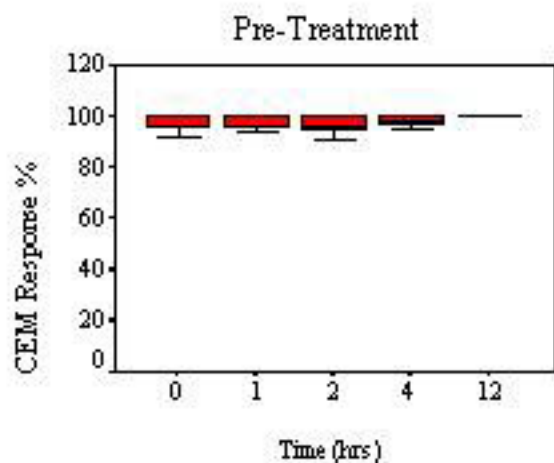
**FIGURE 3A.** Correlation between Mycophenolic Acid (MPA) blood levels and CEM proliferation in patients' sera. Pooled data obtained on days 7 (↖), 28 (◆), 120 (■), 150 (●) days of MMF treatment are shown.

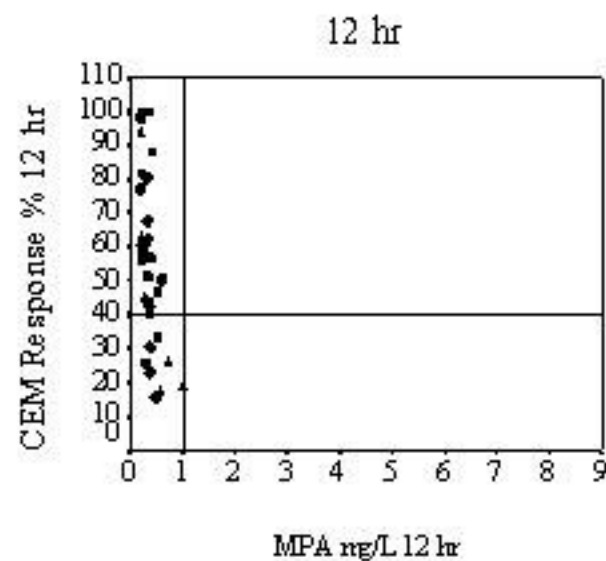
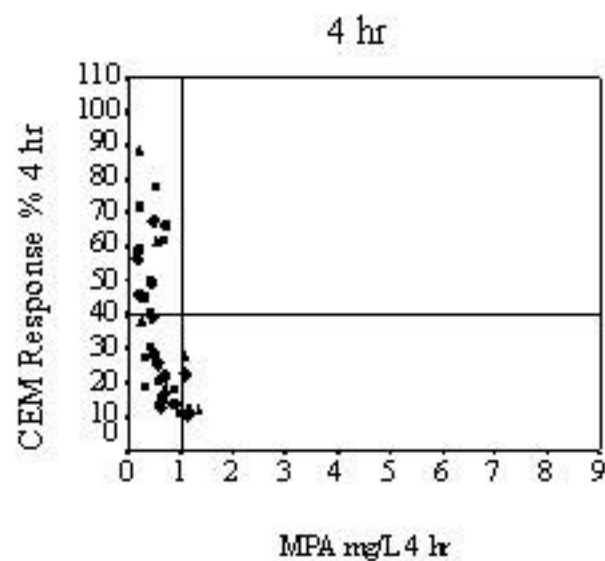
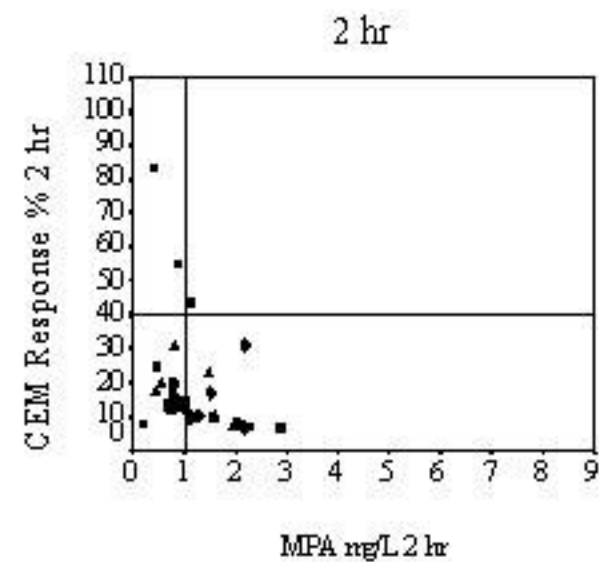
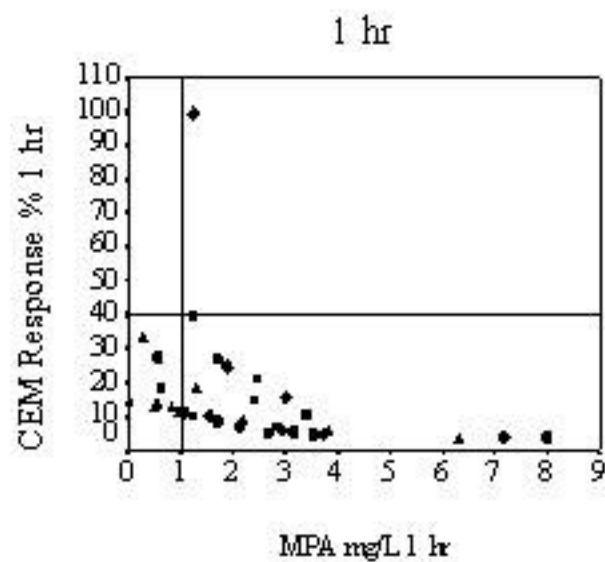
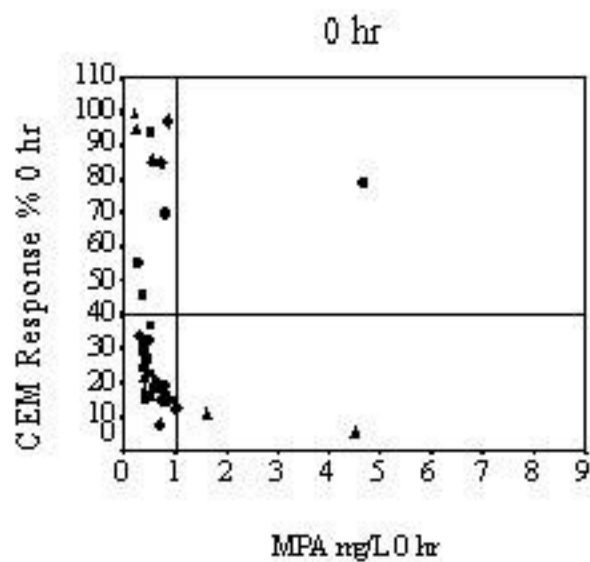
**FIGURE 3B.** Correlation between: Mycophenolic Acid (MPA) blood levels and CEM response inhibition induced by patients' sera. Pooled data obtained at 0, 1, 2, 4 and 12 hrs after Mycophenolate Mofetil (MMF) dose on days 7, 28, 120, 150 of MMF treatment. Note that inhibition of CEM response and not CEM response has been used.

**FIGURE 4.** CEM cell proliferation in patients' sera before MMF morning dose (0 hr). Only the group treated with HAART+MMF was considered. Four studies done in each patient (at days: 7, 28, 120 and 150) were considered. The nine patients studied four times provide 36 values of % CEM pre-dose (minus one lost, amounting to 35 values) These 35 values were divided into those belonging to patients who increased viral load (YES) and those who did not (NO) over 200 copies/ml at day 150. Quartiles 25 and 75 (box), values  $< 1.5$  inter quartile range (line), and extreme values  $> 1.5$  inter quartile range (O & \*) are shown.

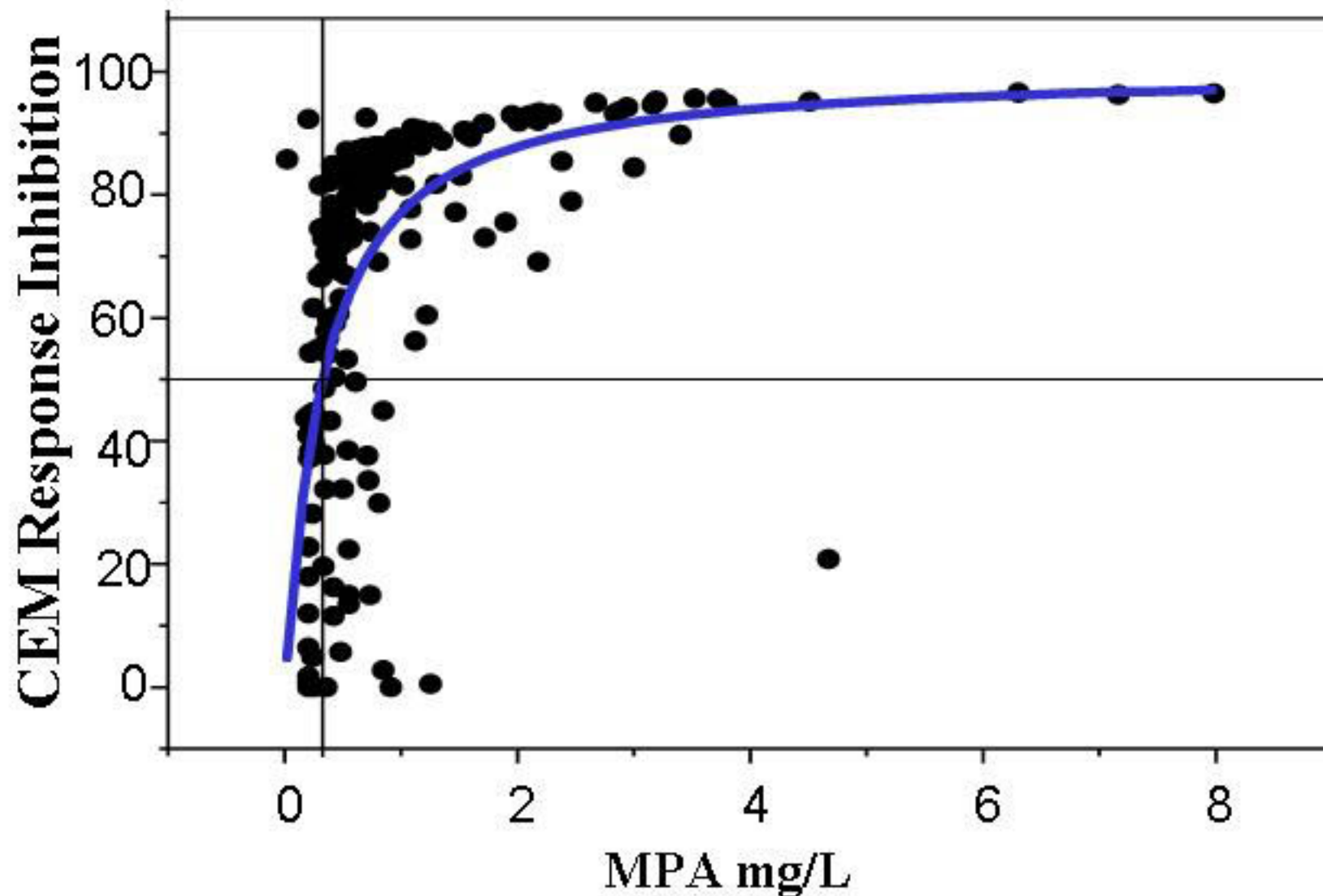




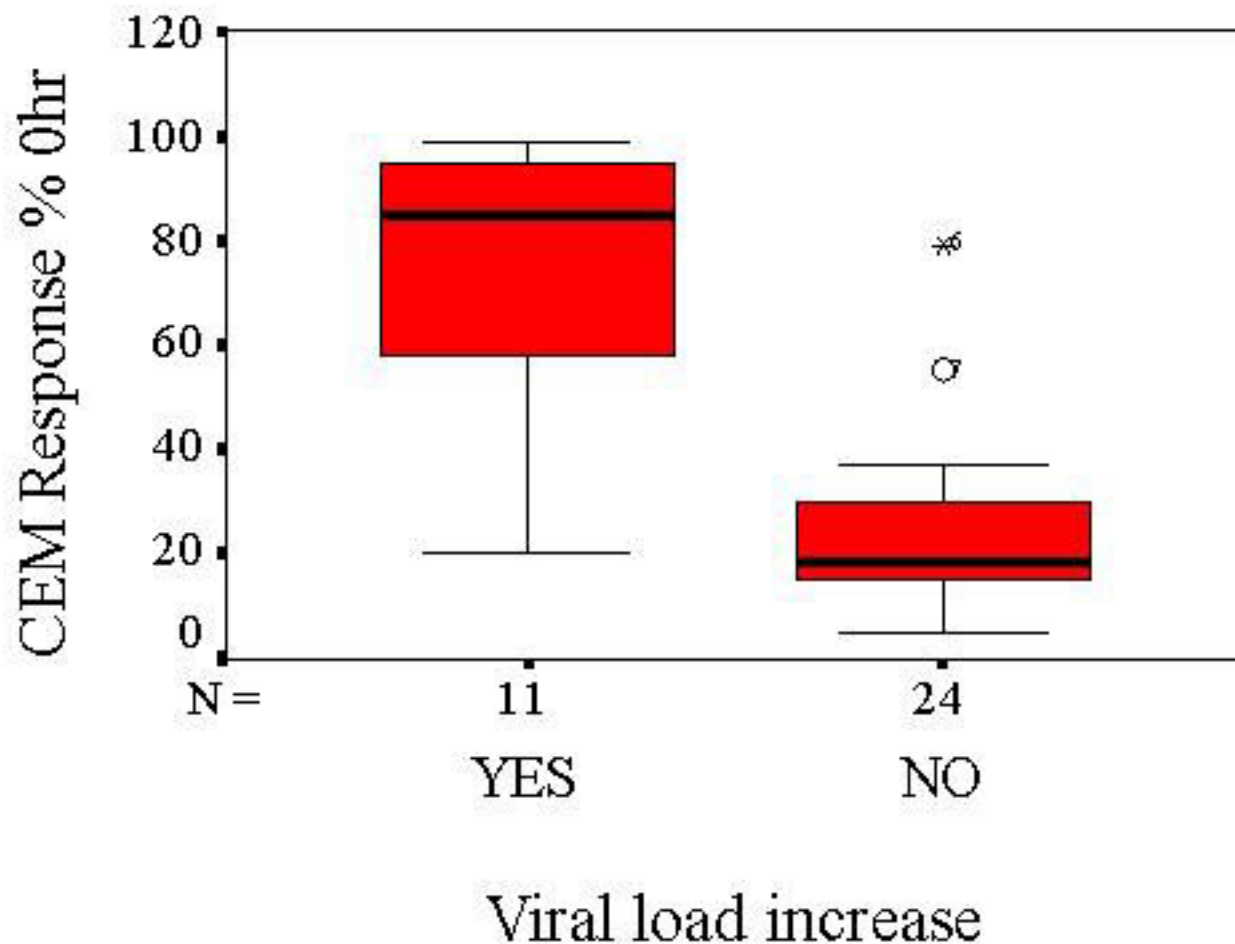




## MPA Concentration versus CEM Inhibition



## Viral load increase versus CEM 0 hr



**DATOS ADICIONALES**

## **MONITORIZACION FARMACODINAMICA DE DOSIS BAJAS DE CsA EN TRANSPLANTADOS RENALES ESTABLES**

Existe una tendencia cada vez más generalizada a utilizar terapias basadas en la combinación de fármacos inmunosupresores, con el fin de poder obtener un mayor impacto biológico con dosis más bajas que las que se obtendrían con monoterapias y por tanto con un menor riesgo de aparición de efectos adversos.

El uso de dosis estándares de CsA en combinación con otros inmunosupresores como el MMF ha hecho que se reduzca la incidencia de rechazo agudo en los trasplantes renales<sup>(56)</sup>.

En etapa de mantenimiento, la administración de MMF permite reducir las dosis de CsA atenuándose la nefrotoxicidad que provoca este fármaco. Se desconoce si estas dosis bajas de CsA provocan un efecto biológico real, si el efecto es básicamente atribuible sólo al MMF, o si el paciente se encuentra en una situación de baja inmunosupresión y por tanto en una situación de riesgo de aparición de rechazo.

Es por ello que aceptamos la amable invitación del equipo de Transplante Renal del Hospital de Bellvitge, de realizar un estudio en el que se monitorizaron desde un punto de vista farmacodinámico (aCN, producción de IL-2 e IFN- $\gamma$ ) y farmacocinético (Niveles en sangre y plasma) 2 grupos de transplantados renales en etapa de mantenimiento: uno que recibía dosis de CsA estándares y otro grupo que recibía bajas dosis de CsA junto con MMF.

## **POBLACION ESTUDIADA Y PARAMETROS EVALUADOS**

Se incluyeron 3 grupos de estudio, procedentes del Hospital de Bellvitge de Barcelona: 1/ 11 pacientes que recibían corticoides y dosis estándares de CsA ( $200\pm 58\text{mg/día}$ ), que suponían unos niveles de CsA  $>125\text{ng/ml}$  (CsA Regular); 2/ 10 pacientes recibían corticoides y dosis bajas de CsA ( $125\pm 38\text{mg/día}$ ), que suponían unos niveles de CsA  $<100\text{ng/ml}$ , junto con MMF ( $2\text{-}3\text{g/día}$ ) (CsA Low +MMF); y 3/ 6 pacientes que recibían corticoides y MMF ( $1\text{-}3\text{g/día}$ ) (MMF). Ningún paciente presentó cambios en la terapia inmunosupresora durante los 12 meses previos al inicio del estudio. Además se evaluó un grupo de 12 individuos sanos (NHC).

Los parámetros estudiados fueron: Actividad Calcineurina (aCN), Producción de IL-2 e IFN- $\gamma$  pre-dosis y 2h post-dosis y niveles de CsA en sangre y de MPA en plasma.

## **OBJETIVO**

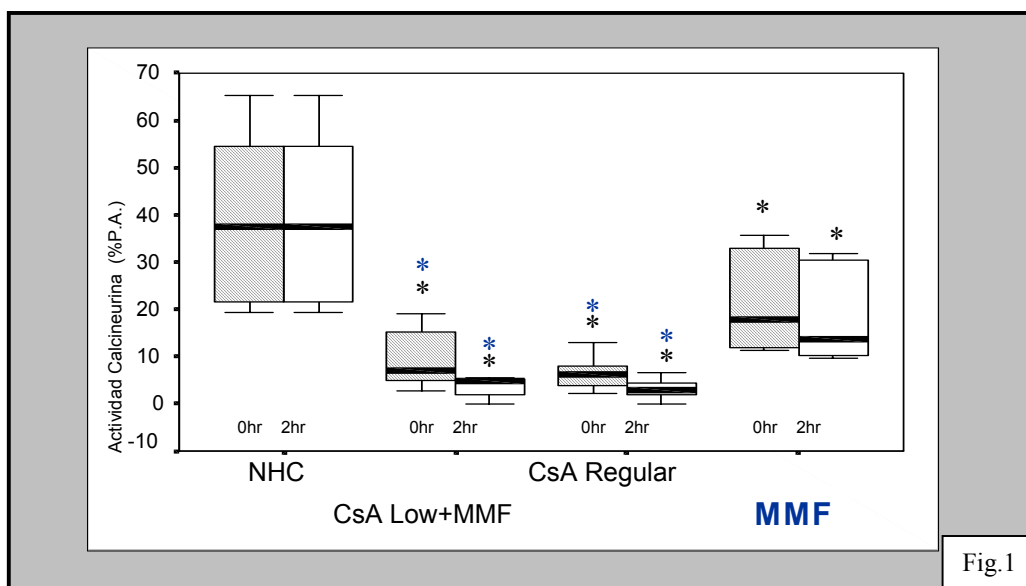
Analizar que efecto biológico produce dosis bajas de CsA en comparación a las dosis consideradas estándares utilizando la Actividad calcineurina y la Producción de citocinas (IL-2, IFN- $\gamma$ ) como marcadores farmacodinámicos

## **RESULTADOS**

Los 3 grupos de estudio: CsA Regular, CsA Low+MMF y MMF presentaron una aCN reducida tanto pre-dosis como 2h post-dosis respecto al grupo control (NHC), llegando a



ser estadísticamente significativa en el caso de los grupos tratados con CsA ( $p < 0.05$ )(Fig.1).

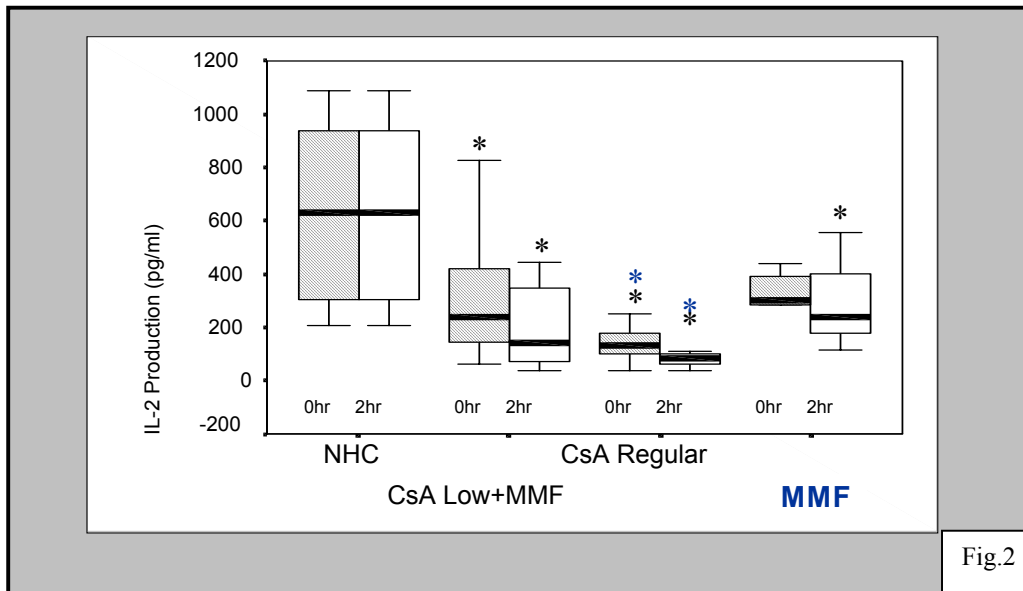


Ambos grupos tratados con CsA también presentaron una disminución de la aCN estadísticamente significativa respecto al grupo con monoterapia con MMF ( $p < 0.05$ ).

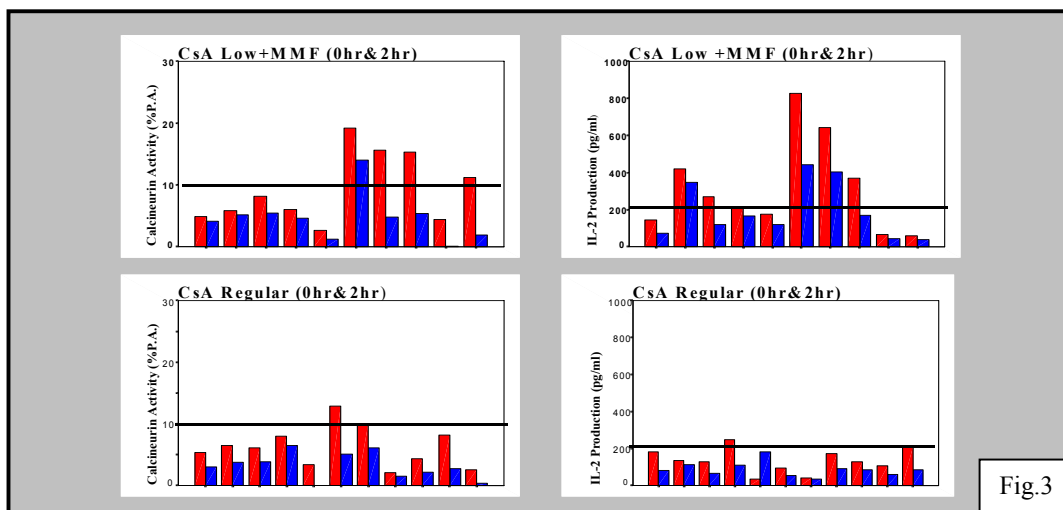
No se observaron diferencias significativas entre los 2 grupos tratados con CsA. Cuando se analizó paciente por paciente se observó que el grupo que recibía dosis estándar de CsA presentaba una aCN mucho más uniforme en comparación con el grupo de CsA a dosis bajas, en el cual la variabilidad interindividual fue mayor. De hecho en este segundo grupo se podían diferenciar 2 subpoblaciones una que mantenía una aCN pre-dosis muy inhibida y parecida al del grupo tratado con dosis estándar de CsA ( $< 10\%P.A.$ ) y otra que una aCN pre-dosis menos inhibida ( $> 10\%P.A.$ )(Fig.3).

Respecto a la producción de IL-2 se observó una reducción estadísticamente significativa de los 2 grupos en tratamiento con CsA respecto al grupo control (NHC), especialmente en

el grupo tratado con monoterapia de CsA ( $p < 0.05$ ). Tampoco se observaron diferencias significativas entre los 2 grupos tratados con diferentes dosis de CsA (Fig.2).



De nuevo con este parámetro se reflejan 2 subpoblaciones en el grupo tratado con dosis bajas de CsA: uno que presenta una producción de IL-2 pre-dosis muy inhibida y parecida al del grupo tratado con dosis estándar de CsA ( $< 200$ pg/ml) y otra que una producción de IL-2 pre-dosis menos inhibida ( $> 200$ pg/ml)(Fig.3).



En todos los grupos estudiados la producción de IFN- $\gamma$  pre dosis no se vio disminuida respecto al grupo control (NHC).

Los 2 grupos que recibían CsA presentaron una producción de IFN- $\gamma$  post-dosis (2h) significativamente inferior respecto al grupo control (Grupo CsA Regular  $p=0.001$ ; y grupo CsA Low + MMF  $p=0.01$ ).

Entre los 2 grupos tratados con CsA no se observaron diferencias post-dosis, pero el grupo de CsA Regular si presentó diferencias significativas post-dosis respecto al grupo de MMF.

## **DISCUSION**

Determinar la dosis de CsA que confiere la mejor inmunosupresión y a la vez minimiza su nefrotoxicidad para cada paciente transplantado renal en etapa de mantenimiento es un reto cotidiano para el nefrólogo. Cuando se asocia a MMF, las dosis de CsA se han reducido con el objetivo de mejorar la función renal. Sin embargo, se teme que estas dosis bajas de CsA en asociación con el MMF, podrían ocasionar un riesgo de baja inmunosupresión, a pesar que experiencias en este sentido publicadas por otros autores no parece indicar que estas combinaciones se asocien a un mayor riesgo de rechazo agudo<sup>(57)(58)</sup>.

En este estudio hemos podido constatar, que a partir de la medición de la aCN, IL-2 e IFN- $\gamma$  los pacientes que recibían dosis bajas de CsA junto con MMF alcanzaban una inhibición de los mencionados parámetros ex vivo y una producción de citocinas parecidas a las obtenidas por los pacientes tratados con dosis más altas de CsA y que no recibían MMF.

Ya ha sido comentado en la introducción que la farmacodinamia permite identificar aquellos pacientes que pueden alcanzar los mismos objetivos biológicos con dosis por debajo de las convencionales o estándares. Los datos de este trabajo ponen de manifiesto que hay un subgrupo de pacientes dentro de los que recibían dosis más bajas de CsA, que alcanzan unos niveles de aCN y una producción de IL-2 similar a los pacientes que reciben dosis más altas. (Fig.3). Es evidente que las dosis o niveles terapéuticos considerados “estándar” se determinan para cubrir a un porcentaje elevado de la población, pero como se observa en este estudio un porcentaje de ésta puede obtener idénticos resultados con niveles menores, reduciéndose el riesgo de aparición de efectos adversos y reduciendo estados de sobreinmunosupresión, que lo único que favorecen es a la aparición de infecciones oportunistas.

## **CONCLUSIONES**

1/ Dosis bajas de CsA ( $125\pm 38\text{mg/día}$  que conllevan unos niveles  $<100\text{ng/ml}$ ) en combinación con MMF ( $2\text{-}3\text{g/día}$ ) ejercen una inhibición de la aCN y una producción de citocinas similar a la que producen dosis convencionales ( $200\pm 58\text{mg/día}$  que conllevan unos niveles  $>125\text{ng/ml}$ ) de dicho anti-calcineurínico, en transplantados renales en etapa de mantenimiento.

2/ La utilización de dosis por debajo de las llamadas estándares evidencia una mayor variabilidad interindividual, la cual es detectable a través de la farmacodinamia. La medición de parámetros farmacodinámicos permite identificar pacientes capaces de alcanzar los mismos objetivos biológicos que los que reciben dosis convencionales, pero con dosis inferiores de inmunosupresor.

**ANEXOS**

## ANEXO 1

### **1. TECNICA MEDICION DE LA RESPUESTA DE CEM**

Esta técnica se basa en la capacidad de los sueros de pacientes que reciben MMF de inhibir la proliferación espontánea de la línea celular T humana denominada CEM. El motivo de utilizar el suero del paciente es que esta descrito que una vez el MMF es metabolizado a su metabolito activo, el Acido Micofenólico (MPA), éste se almacena en más de un 99% en el compartimento del plasma unido albúmina.

La línea celular CEM se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC). Es una línea T-linfoblastoide humana obtenida a partir de una capa leucoplaquetaria de sangre periférica de una mujer caucasiana con una leucemia limfoblástica aguda. Nosotros utilizamos una subclona, denominada CEM.2b, la cual es resistente a los corticoides. Las células CEM, son células que crecen en suspensión, que se cultivan con RPMI-1640 suplementado con 10ml/L de suero fetal de ternero (FCS) y gentamicina. Estas células se cultivan bajo atmósfera del 5%CO<sub>2</sub> y a 37°C. Tienen un tiempo de duplicación aproximado de 24h.

Para llevar a cabo la técnica de medición de la respuesta de CEM, se hace un conteo de las células CEM en cultivo y se ajusta a una concentración de  $2 \times 10^8$  cél/L. Se siembran 100µl de esta solución en placas de 96 pocillos de fondo "U" (TPP), lo que conlleva que hayan 20.000 cél CEM/pocillo. Se realizan 2 triplicados en los que se les añade 100µl de un suero de un individuo sano, el cual siempre es el mismo en todos los ensayos. Dado que este individuo no recibe MMF, su suero no tiene capacidad de inhibir la respuesta proliferativa

de las CEM y por tanto se le considera el 100% de respuesta. A mayor respuesta de CEM menor capacidad de inhibir la proliferación de dicha línea celular. En diferentes pocillos, que contienen las células CEM, se añaden 100µl/pocillo de suero de paciente. Tras 24h de cultivo se añade <sup>3</sup>H-Timidina (1µCi) y se dejan cultivando 24h más. Finalmente se valora la timidina incorporada en un contador de centelleo Beckman.

La forma de expresar los resultados es como %CEM, el cual se obtiene del siguiente cociente:

$$\% \text{ CEM} = \frac{[\text{Proliferación en cpm en presencia del suero del paciente}] \times 100}{[\text{Proliferación en cpm en presencia del suero del individuo sano}]}$$

Una mayor capacidad inhibitoria de los sueros de los pacientes implica un menor porcentaje en la Respuesta de CEM.



## ANEXO 2

### **2. MODIFICACIONES DE LA TECNICA DE MEDICION DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA CALCINEURINA**

La técnica de medición de la actividad calcineurina fue descrita por Fruman y colaboradores<sup>(59)</sup>. Se basa en la capacidad que tienen los lisados hipotónicos de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de defosforilar un péptido sintético de 19 aminoácidos, marcado radioactivamente con <sup>32</sup>P en posición serina, en presencia de ácido okadaico, un inhibidor de las fosfatasa de tipo 1 y 2A. La actividad fosfatasa de tipo 2C, la cual es resistente tanto al ácido okadaico como a la CsA, se determina y se resta para cada muestra, realizando el ensayo en presencia y ausencia de CsA. La concentración de CsA con la que se trabaja es suficiente para inhibir totalmente la actividad calcineurina residual, que no ha sido previamente inhibida por el inmunosupresor administrado al paciente. El resto de actividad fosfatasa se asume como actividad calcineurina.

Hemos incorporado 2 variaciones a esta técnica. Por un lado cuando los pacientes están tratados con Tacrolimus (TRL), en vez de inhibir la actividad calcineurina residual con CsA (utilizando el buffer 3 descrito en el artículo 2) lo hacemos con TRL (utilizando el buffer 4 descrito en el artículo 2). El motivo es que nos pareció a priori más lógico inhibir la actividad calcineurina residual con el mismo fármaco que se le estaba tratando al enfermo para inhibir, entre otras cosas, su actividad calcineurina, a pesar que los resultados no fueron muy diferentes a los obtenidos cuando inhibíamos con CsA. Y por otro lado hemos variado la forma de expresar la actividad calcineurina. Tras realizar los primeros ensayos

nos dimos cuenta de la necesidad de introducir un valor interno que permitiera minimizar la variabilidad entre los diferentes marcajes del péptido con  $^{32}\text{P}$ , y el decaimiento de la radioactividad del péptido marcado. Hay que tener en cuenta que la vida media del  $^{32}\text{P}$  es de 15 días, lo que hace que a los 15 días del marcaje su radioactividad pase a ser la mitad de la inicial y así sucesivamente. Además debíamos tener en cuenta que los lisados no se podían almacenar durante más de 15 días en nitrógeno líquido, ya que superado este tiempo se observaba un decaimiento de la actividad enzimática, por lo que era imprescindible realizar diferentes marcajes durante el periodo de estudio de los pacientes.

Es por ello introdujimos en cada ensayo una fosfatasa con una gran actividad, como es la fosfatasa alcalina (A.P.) (20U) y evaluamos su capacidad de defosforilar el péptido marcado. Consideramos que la actividad de esta fosfatasa alcalina era la máxima defosforilación que podíamos alcanzar del péptido marcado, de modo que la forma de expresar los resultados de la actividad calcineurina viene dado por un porcentaje respecto la actividad de esta fosfatasa alcalina:

$$\text{aCN}(\% \text{ A.P.}) = \frac{100 \times (\text{cpm liberadas en presencia de la muestra})}{\text{cpm liberadas en presencia de la fosfatasa alcalina}}$$

Por tanto, el valor de la actividad calcineurina se obtiene de la diferencia entre la actividad fosfatasa en presencia de ácido okadacio y la actividad resistente a CsA o TRL expresándola como %A.P.

**ACTIVIDAD FOSFATASA CALCINEURINA (PP2B):****Actividad Fosfatasa Total: PP1C + PP2A + PP2B + PP2C**Sensibles al  
Ac. OkadaicoSensible a  
CsA/TRLFosfatasa que se detectaEn ausencia de Inhibidores de la fosfatasas  Actividad TotalEn presencia de Ac. Okadaico  PP2B+PP2CEn presencia de Ac. Okadaico y CsA/TRL  PP2C**aCN = (Actividad en presencia de Ac. Okadaico) - (Actividad en presencia de  
Ac. Okadaico + CsA/TRL)**

**DISCUSION**

## DISCUSION

En este apartado se pretende llevar a cabo una discusión general del contenido de esta tesis. No se entrará a evaluar con detalle los resultados publicados, ya que éstos ya han sido comentados en los correspondientes apartados de discusión de cada artículo.

El trabajo realizado en esta tesis pretende contribuir al desarrollo de parámetros que permitan la monitorización de los fármacos inmunosupresores desde un punto de vista farmacodinámico, con el fin de poder en un futuro hacer uso de ellos, si se demuestran eficaces, en el ajuste de las dosis a administrar a cada paciente. Nuestra hipótesis de partida en la que manifestábamos que la determinación de la actividad residual de la enzima diana de un fármaco podía constituir un buen marcador del impacto biológico que el fármaco en cuestión realiza sobre el sistema inmunitario, ha sido válida para algunos de los fármacos estudiados (CsA y TRL). Para otros, en cambio, como en el caso del MMF es preferible recurrir a la evaluación de algún mediador implicado en el mecanismo de acción del inmunosupresor para llegar a conocer el impacto que realmente realizan sobre el sistema inmunitario. Por lo tanto en cada situación se tendrá que valorar cual de las opciones es la más adecuada.

Hemos desarrollado en el laboratorio metodologías que permiten medir parámetros que reflejan el efecto biológico de diferentes fármacos inmunosupresores como: CsA, TRL y MMF, poniéndolas a punto y validándolas en primer lugar “in vitro”, y a continuación evaluándolas “in vivo” en diferentes poblaciones. En el caso del MMF ha quedado constancia que el uso de la actividad de la enzima IMPDH como parámetro de monitorización farmacodinámico no parece ser, por lo que conocemos hasta ahora, el más óptimo, dada la elevada variabilidad interindividual que presenta, incluso siendo

evidenciable en pacientes que no reciben este fármaco. El parámetro propuesto por nuestro grupo, Respuesta de CEM, como alternativa a la medición de la actividad IMPDH, parece ser de utilidad en la evaluación del efecto biológico que realiza el MMF, especialmente cuando las dosis que se administran son bajas (0.5-1.5g/día), como lo han sido en los estudios llevados a cabo con los transplantados renales en etapa de mantenimiento y en los pacientes infectados con el VIH. Con éstos últimos, incluso parece ser un parámetro capaz de identificar que pacientes serán capaces de controlar la carga viral, ya que fue el único parámetro de los evaluados que presento diferencias entre el grupo que mantuvo un control de la carga viral respecto al grupo que no la mantuvo, a pesar de que se necesita ampliar el estudio con un número mayor de pacientes para dar validez a esta hipótesis.

Respecto los parámetros estudiados para monitorizar farmacodinámicamente los inhibidores de la calcineurina (CsA, TRL), hemos observado que la evaluación de la actividad calcineurina, que inicialmente se propuso para monitorizar la CsA, puede ser también útil en la medición del impacto que el Tacrolimus realiza sobre el sistema inmunitario, si bien los pacientes tratados con este fármaco presentan una mayor variabilidad que los que reciben CsA, aunque no creemos que ello comprometa su uso. Este parámetro, sin embargo, no refleja el efecto adicional que realiza la presencia de otros fármacos, como por ejemplo el MMF, en las terapias basadas con inhibidores de la calcineurina. Dada la reciente tendencia a introducir terapias basadas en las combinaciones de fármacos se ha evidenciado la necesidad de encontrar parámetros que reflejen la acción conjunta de los fármacos implicados. En este sentido, a la vista de nuestros resultados, la evaluación de la producción de IL-2 parece ser un parámetro que refleja el efecto adicional que produce la presencia de MMF en las terapias con inhibidores de la calcineurina, siendo por tanto útil en la monitorización de este tipo terapias combinadas.

Un factor importante a tener en cuenta, que afecta de manera muy directa a la variabilidad interindividual existente en la respuesta a un determinado tratamiento inmunosupresor, es la capacidad de respuesta que presenta el sistema inmunitario de cada individuo en un determinado momento, la cual estará condicionada por el grado de incompatibilidad donante-receptor (HLA clase I, clase II); por la capacidad que el paciente haya mostrado en la producción de anticuerpos (pacientes hipersensibilizados); por su background genético a nivel de producción de interleucinas (polimorfismos genéticos); y de otros factores (presencia de CD30 soluble)<sup>(60)</sup>. La cuantificación que nosotros realizamos de la producción de IL-2 pretende ser una primera aproximación para llegar a conocer cual es esta situación en cada individuo, ya que nos permite evaluar si un paciente tiene células capaces de producir IL-2, lo cual es indicativo de la existencia de células capaces de activarse y por tanto capaces de desencadenar una respuesta. Evidentemente todavía queda un largo camino que recorrer en este sentido, pero si se pudiera predecir, dentro de un orden, que respuesta del sistema inmunitario podemos esperar en cada caso, permitiría ajustar mucho mejor los tratamientos inmunosupresores (terapia individualizada).

En los diferentes estudios que hemos realizado, cuando las dosis que se administraban de inmunosupresor estaban por debajo de las llamadas convencionales, los parámetros farmacodinámicos que hemos evaluado han sido capaces de detectar diferentes respuestas por parte de los pacientes a una misma dosis o a un mismo nivel de fármaco, lo cual puede ser de utilidad para el clínico a la hora de identificar y diferenciar los pacientes más sensibles de los menos y en consecuencia utilizar esta información para poder ajustar las dosis de fármaco de una forma más eficaz.

En ocasiones la logística que acompaña a los estudios farmacodinámicos puede ser compleja y costosa. Esto hace que quizás no se deban plantear como una rutina continuada,

pero si parece tener sentido utilizarlos en las fases finales de desarrollo de un fármaco (Estudios clínicos de Fase II, III y IV) ya que con el conocimiento del efecto biológico real que realiza el fármaco permitirá ajustar de una forma más cuidadosa las llamadas dosis convencionales o estándares; y en el post-transplante inmediato, para asegurar que un medicamento que previsiblemente se administrará indefinidamente llega a alcanzar en el contexto genético del paciente los objetivos biológicos deseados.

La farmacodinámica puede ser de gran utilidad en el caso de fracaso terapéutico, para acotar las causas, pero hay 2 aspectos en los cuales la farmacodinámica puede ser especialmente útil: 1/ Cuando se tenga que reducir las dosis por debajo de las llamadas dosis estándares o convencionales, ya que nos permitirá identificar aquellos pacientes que pueden alcanzar niveles correctos de inmunosupresión con dosis más bajas de las habituales; y 2/ En la introducción de nuevas pautas de inmunosupresión, como las llamadas terapias inmunosupresoras de baja toxicidad, basadas normalmente en la asociación de diferentes fármacos con el fin de poder administrar dosis bajas de cada uno de ellos, reduciendo así la presencia de efectos adversos asociados a dosis más altas. Un ejemplo de estas terapias de baja toxicidad que actualmente se empiezan a utilizar son las combinaciones entre un inhibidor de la calcineurina (a bajas dosis) y el Micofenolato Mofetil.

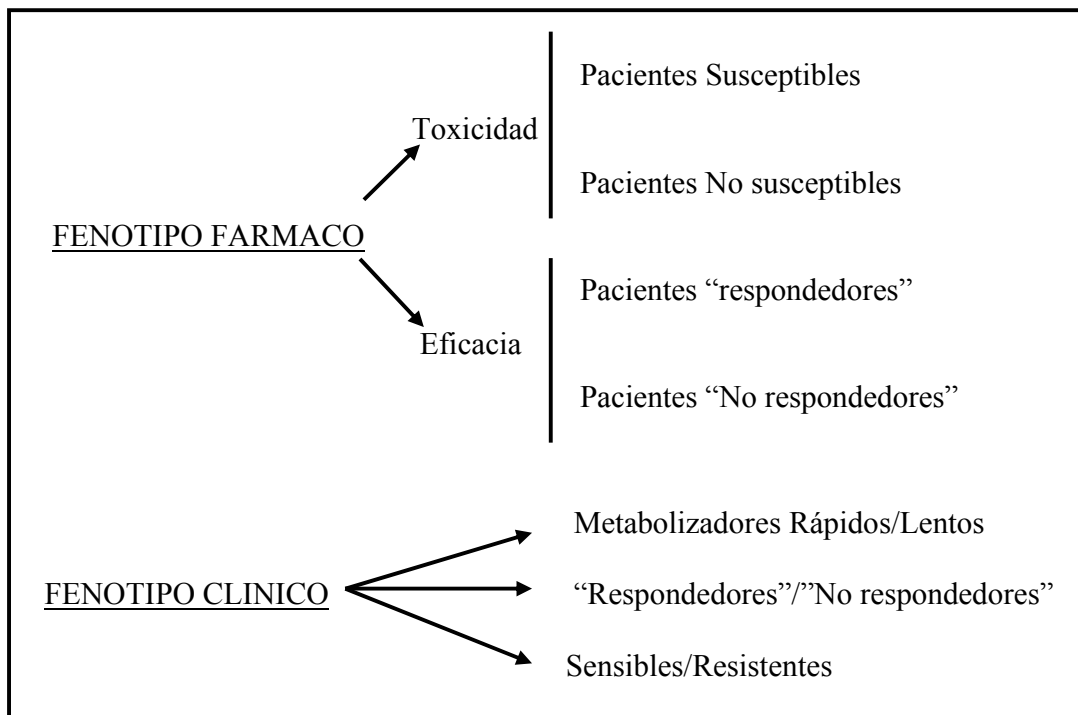
La introducción de este tipo de terapias ha evidenciado la necesidad de: 1/ Establecer parámetros que permitan la evaluación del impacto de la combinación utilizada sobre el sistema inmunitario, ya que es de esperar que el impacto biológico que producirán será mayor que el que se pueda predecir a partir de la medición individual de las concentraciones de cada fármaco; 2/ Definir pruebas que permitan evidenciar la existencia de un impacto real a pesar de utilizar dosis reducidas.



La farmacodinamia también puede ayudar a establecer: 1/ Cual es la dosis mínima de fármaco que produce un impacto biológico “detectable”; 2/ Así como las sinergias de las combinaciones sobre el sistema inmunitario. Con ello se acotaran y se orientaran los estudios clínicos a realizar para establecer cuales son las combinaciones más óptimas y cuales son las dosis mínimas necesarias y su correlación con la aparición de rechazo, ya que se centraran en combinaciones en que la farmacodinamia haya establecido una sinergia biológica sobre el sistema y se partirán de dosis por encima de las dosis que producen un impacto biológico “detectable”, ya que parece coherente pensar que por debajo de estas dosis no se observará un efecto terapéutico; 3/ Finalmente la farmacodinamia, al evaluar el efecto biológico del fármaco, puede ayudar a entender porque hay individuos que presentan una respuesta anómala a un determinado fármaco, cuya base se pueda encontrar en el contexto genético del individuo en cuestión (Por ejemplo: polimorfismos genéticos que afecten al metabolismo del fármaco).

En los últimos años se está introduciendo una nueva disciplina que es la denominada Farmacogenética<sup>(61)</sup>. La Farmacogenética se define como el estudio de la variabilidad de las respuestas a un determinado fármaco atribuible a factores hereditarios. Se centra en el estudio de polimorfismos genéticos, es decir, variaciones en la secuencia de ADN que se producen en la población con una frecuencia superior al 1% (fundamentalmente polimorfismos en un solo nucleótido: SNP), que pueden provocar diferentes respuestas a un mismo fármaco (por ejemplo aparición de efectos adversos, resistencias) o incluso a una misma dosis al comparar individuos pertenecientes a una misma etnia racial (variabilidad interindividual). Normalmente son genes que codifican proteínas y enzimas involucrados en los procesos de absorción, distribución, transporte, metabolización y excreción de un fármaco<sup>(62)(63)</sup>.

Si estas modificaciones, a nivel genético, son funcionales provocará una alteración a nivel proteico, lo que se traducirá en un cambio del fenotipo del fármaco y del fenotipo clínico.



El objetivo final que persigue la farmacogenética es el de adaptar las dosis de fármaco a administrar al genotipo del individuo, es decir, seleccionar la terapia más adecuada en cada caso, basándose en la información genética individual. Para que se aplique a la práctica se tendrá que establecer asociaciones evidentes entre genotipo-fenotipo, es decir, asociaciones entre la variante genética y los resultados clínicamente relevantes, y sólo se valoraran aquellas variantes genéticas relativamente comunes. Ahora bien, hoy por hoy, la farmacogenética no será coste-efectiva siempre que existan métodos sencillos y fiables de monitorizar la respuesta al tratamiento directamente o a través de variables clínicas o de laboratorio validadas.

Uno de los problemas con el que el clínico se encuentra en el ajuste de las dosis de los fármacos inmunosupresores, es que las dosis administradas normalmente se correlacionan muy mal con los niveles o concentraciones de fármaco que se obtienen. Por otro lado se observan pacientes que a pesar de tener niveles parecidos, el efecto biológico que el fármaco produce es muy diferente. Por lo tanto con sólo el estudio de la farmacocinética no es suficiente para justificar las diferencias que se observan en las respuestas a los tratamientos. La farmacodinamia, en cambio, al evaluar la función biológica que tiene que desempeñar el fármaco es capaz de detectar el hecho de que un paciente presente una respuesta anómala a un determinado fármaco, o simplemente respuestas diferentes a una misma dosis. Será entonces, una vez que se detecta el problema, cuando se pueda plantear la posibilidad de ir a buscar el origen de estas respuestas diferentes en un contexto farmacogenético. Hay 3 puntos claves donde ir a buscar posibles polimorfismos genéticos que justifiquen estas diferencias en los comportamientos<sup>(61)</sup>:

1. En los genes que codifican enzimas involucrados en el metabolismo de los fármacos (Por ejemplo: Sistema Citocromo P450)
2. En los genes que codifican las dianas y receptores de los fármacos
3. En los genes que codifican proteínas transportadoras (Por ejemplo: Glicoproteína-P)

La mayoría de fármacos, entre ellos los inmunosupresores que actualmente se utilizan en la práctica clínica, en su metabolismo intervienen enzimas del sistema del citocromo P450 (CYP450). Se han descritos numerosos polimorfismos de CYP450, los cuales se han involucrado con respuestas diferentes a un mismo tratamiento. Recientemente se han

publicado trabajos dirigidos a estudiar el papel de estos polimorfismos en la respuesta a CsA y Tacrolimus, con el fin de justificar la variabilidad interindividual existente frente a estos fármacos. Respecto a la CsA no se ha encontrado todavía, ningún polimorfismo en CYP450 (y más concretamente en el CYP3A4)<sup>(64)</sup> ni en el gen que codifica una de las proteínas transportadoras involucradas en el mecanismo de este fármaco, la glicoproteína-P, el gen MDR (multidrug resistance gene)<sup>(65)(66)</sup> que se puedan asociar con una mejor o peor eficacia del tratamiento en transplantados renales.

En el caso del TRL, existe un estudio publicado recientemente por David Holt et al. con una población de transplantados renales de diferentes orígenes étnicos, en el que establece una asociación entre un polimorfismo en CYP450 (el polimorfismo CYP3A1 pseudogen A/G<sub>44</sub>) que se asocia con una fuerte actividad hepática de CYP3A5, y un polimorfismo en el gen MDR-1, el cual influye en la expresión de Glicoproteína-P en el intestino, con la dosis de TRL necesaria<sup>(67)</sup>.

Por lo tanto es muy posible que nos encontremos delante de la posibilidad de realizar este tipo de estudios, incluso ya en las Fases de desarrollo de un fármaco, con el fin de poder predecir cuál va a ser la terapia más idónea a administrar a un determinado individuo en función de su perfil genético.

En los últimos años la farmacodinámica se está configurando como un complemento esencial de la farmacocinética y probablemente también lo va a ser de la farmacogenética. Sólo haciendo uso de todas estas disciplinas se podrá avanzar en la utilización de nuevos fármacos, nuevas asociaciones y nuevas dosificaciones o niveles.

Creemos que en el futuro se deben plantear estudios en los que se tendrá que abordar la evaluación de los parámetros farmacodinámicos desarrollados en esta tesis y otros, en el post-transplante inmediato, estudiando su evolución y su valor pronóstico como marcadores

de aparición de rechazo. A partir de estos estudios se tendría que intentar establecer un cut/off (un punto de corte) para cada parámetro, que permitiera discernir entre pacientes que tienen una inmunosupresión “correcta” (sin signos de rechazo, sin aparición de infecciones, sin efectos adversos) de los que no y por tanto susceptibles de presentar algún episodio de rechazo. De esta manera se abastecerá al clínico con más herramientas con las que ajustar las dosis y prevenir la aparición del rechazo.

**CONCLUSIONES**

**1/** La medición de la actividad de la enzima diana, tal y como habitualmente se propone como parámetro óptimo para evaluar la eficacia biológica, puede ser muy útil para algunos fármacos, como los inhibidores de la calcineurina, pero parece problemática para otros, como los inhibidores de la IMPDH. Es necesario evaluar para cada fármaco inmunosupresor cual de los parámetros farmacodinámicos que se propongan, refleja mejor su acción biológica.

**2/** La Farmacodinamia permite identificar aquellos pacientes que aún recibiendo dosis de inmunosupresor por debajo de las llamadas dosis estándares o convencionales, presentan un impacto biológico similar a los pacientes que reciben las dosis convencionales, permitiendo diferenciar entre pacientes más sensibles, y por tanto susceptibles de recibir menos cantidad de fármaco, de los menos sensibles.

**3/** La Respuesta de CEM parece ser un parámetro más útil en la monitorización del MMF, especialmente cuando los pacientes son tratados con dosis por debajo de las llamadas estándares (2g/día), que la determinación de la actividad enzimática IMPDH, dada la elevada variabilidad que presenta la actividad de dicha enzima.

4/ La Respuesta de CEM es capaz de identificar pacientes que a pesar de presentar niveles plasmáticos de MPA más bajos que los obtenidos cuando se utilizan dosis estándares, presentan una eficacia biológica similar a los que reciben dichas dosis estándares.

5/ La evaluación de la actividad calcineurina puede ser de ayuda en el seguimiento del efecto que los inhibidores de la calcineurina (CsA y TRL) realizan sobre el sistema inmunitario, incluso cuando éstos se administran en combinación con MMF.

6/ Con la aparición de las terapias inmunosupresoras basadas en la combinación de fármacos son necesarios parámetros que reflejen la acción conjunta de los diferentes fármacos implicados. En este sentido la determinación de la producción de IL-2 es un parámetro que se ha mostrado eficaz en la evaluación del impacto biológico, en terapias basadas en la combinación de inhibidores de la calcineurina y el MMF.



**BIBLIOGRAFIA ADICIONAL**

- (1) Rogers NJ, Lechler RI. Allorecognition. *Am J Transplant.* 2001 Jul;1(2):97-102. Review.
- (2) Auchincloss H Jr, Sultan H. Antigen processing and presentation in transplantation. *Curr Opin Immunol.* 1996 Oct;8(5):681-7. Review.
- (3) Shoskes DA, Wood KJ. Indirect presentation of MHC antigens in transplantation. *Immunol Today.* 1994 Jan;15(1):32-8. Review.
- (4) Shi L, Mai S, Israels S, Browne K, Trapani JA, Greenberg AH. Granzyme B (GraB) autonomously crosses the cell membrane and perforin initiates apoptosis and GraB nuclear localization. *J Exp Med.* 1997 Mar 3;185(5):855-66.
- (5) Brossart P, Bevan MJ. Selective activation of Fas/Fas ligand-mediated cytotoxicity by a self peptide. *J Exp Med.* 1996 Jun 1;183(6):2449-58.
- (6) Li B, Hartono C, Ding R, Sharma VK, Ramaswamy R, Qian B, Serur D, Mouradian J, Schwartz JE, Suthanthiran M. Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. *N Engl J Med.* 2001 Mar 29;344(13):947-54.
- (7) Strehlau J, Pavlakis M, Lipman M, Shapiro M, Vasconcellos L, Harmon W, Strom TB. Quantitative detection of immune activation transcripts as a diagnostic tool in kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Jan 21;94(2):695-700.
- (8) Young NT, Bunce M, Morris PJ, Welsh KI. Killer cell inhibitory receptor interactions with HLA class I molecules: implications for alloreactivity and transplantation. *Hum Immunol.* 1997 Jan;52(1):1-11. Review.
- (9) Matas AJ, Gillingham KJ, Payne WD, Najarian JS. The impact of an acute rejection episode on long-term renal allograft survival (t1/2). *Transplantation.* 1994 Mar 27;57(6):857-9.

- (10) Rodriguez-Iturbe B. Cellular adhesion molecules in transplantation. *Transplant Proc.* 1996 Dec;28(6):3285-9. Review.
- (11) Strehlau J, Pavlakis M, Lipman M, Shapiro M, Vasconcellos L, Harmon W, Strom TB. Quantitative detection of immune activation transcripts as a diagnostic tool in kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Jan 21;94(2):695-700.
- (12) Kamoun M. Cellular and molecular parameters in human renal allograft rejection. *Clin Biochem.* 2001 Feb;34(1):29-34. Review.
- (13) McKenna RM, Takemoto SK, Terasaki PI. Anti-HLA antibodies after solid organ transplantation. *Transplantation.* 2000 Feb 15;69(3):319-26. Review.
- (14) Guerini D. Calcineurin: not just a simple protein phosphatase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Jun 18;235(2):271-5. Review.
- (15) Baksh S, Burakoff SJ. The role of calcineurin in lymphocyte activation. *Semin Immunol.* 2000 Aug;12(4):405-15. Review.
- (16) Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:707-47. Review.
- (17) Crabtree GR. Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca<sup>2+</sup>, calcineurin, and NF-AT. *Cell.* 1999 Mar 5;96(5):611-4. Review.
- (18) Loh C, Shaw KT, Carew J, Viola JP, Luo C, Perrino BA, Rao A. Calcineurin binds the transcription factor NFAT1 and reversibly regulates its activity. *J Biol Chem.* 1996 May 3;271(18):10884-91.
- (19) Saeki T, Ueda K, Tanigawara Y, Hori R, Komano T. Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506. *J Biol Chem.* 1993 Mar 25;268(9):6077-80.
- (20) Matsuda S, Koyasu S. Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology.* 2000 May;47(2-3):119-25. Review.

- (21) Liu J, Farmer JD Jr, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell*. 1991 Aug 23;66(4):807-15.
- (22) Markovic S, Raab M, Daxecker H, Griesmacher A, Karimi A, Muller MM. In vitro effects of cyclosporin A on the expression of adhesion molecules on human umbilical vein endothelial cells. *Clin Chim Acta*. 2002 Feb;316(1-2):25-31.
- (23) Goto T, Kino T, Hatanaka H, Nishiyama M, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, Imanaka H. Discovery of FK-506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces tsukubaensis*. *Transplant Proc*. 1987 Oct;19(5 Suppl 6):4-8.
- (24) Starzl TE, Todo S, Fung J, Demetris AJ, Venkataraman R, Jain A. FK 506 for liver, kidney, and pancreas transplantation. *Lancet*. 1989 Oct 28;2(8670):1000-4.
- (25) Schreiber SL. Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science*. 1991 Jan 18;251(4991):283-7. Review.
- (26) Shiraga T, Matsuda H, Nagase K, Iwasaki K, Noda K, Yamazaki H, Shimada T, Funae Y. Metabolism of FK506, a potent immunosuppressive agent, by cytochrome P450 3A enzymes in rat, dog and human liver microsomes. *Biochem Pharmacol*. 1994 Feb 11;47(4):727-35.
- (27) Christians U, Sattler M, Schiebel HM, Kruse C, Radeke HH, Linck A, Sewing KF. Isolation of two immunosuppressive metabolites after in vitro metabolism of rapamycin. *Drug Metab Dispos*. 1992 Mar-Apr;20(2):186-91.
- (28) Sehgal SN. Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transplant Proc*. 2003 May;35(3 Suppl):S7-S14.
- (29) Kirken RA, Wang YL. Molecular actions of sirolimus: sirolimus and mTor. *Transplant Proc*. 2003 May;35(3 Suppl):S227-30.

- (30) Hashemolhosseini S, Nagamine Y, Morley SJ, Desrivieres S, Mercep L, Ferrari S. Rapamycin inhibition of the G1 to S transition is mediated by effects on cyclin D1 mRNA and protein stability. *J Biol Chem*. 1998 Jun 5;273(23):14424-9.
- (31) Bertagnolli MM, Yang L, Herrmann SH, Kirkman RL. Evidence that rapamycin inhibits interleukin-12-induced proliferation of activated T lymphocytes. *Transplantation*. 1994 Nov 27;58(10):1091-6.
- (32) Almawi WY, Assi Jw, Chudzik DM. *J Am Soc Nephrol* 1992 3:572
- (33) Strehlau J, Maslinski W, Chae D, Pavlakis M, Ehrich JH, Strom TB. Adjusting immunosuppression to the identification of T-cell activating mediators in rejecting transplants: a novel approach to rejection diagnosis and treatment. *Transplant Proc*. 1998 Aug;30(5):2389-91.
- (34) Hong JC, Kahan BD. Sirolimus-induced thrombocytopenia and leukopenia in renal transplant recipients: risk factors, incidence, progression, and management. *Transplantation*. 2000 May 27;69(10):2085-90.
- (35) Massy ZA, De Bandt JP, Morelon E, Thevenin M, Lacour B, Kreis H. Hyperlipidaemia and post-heparin lipase activities in renal transplant recipients treated with sirolimus or cyclosporin A. *Nephrol Dial Transplant*. 2000 Jun;15(6):928.
- (36) Morrisett JD, Abdel-Fattah G, Kahan BD. Sirolimus changes lipid concentrations and lipoprotein metabolism in kidney transplant recipients. *Transplant Proc*. 2003 May;35(3 Suppl):S143-50.
- (37) Allison AC, Eugui EM. Purine metabolism and immunosuppressive effects of mycophenolate mofetil (MMF). *Clin Transplant*. 1996 Feb;10(1 Pt 2):77-84. Review.
- (38) Nowak I, Shaw LM. Mycophenolic acid binding to human serum albumin: characterization and relation to pharmacodynamics. *Clin Chem*. 1995 Jul;41(7):1011-7.

- (39) Griesmacher A, Weigel G, Seebacher G, Muller MM. IMP-dehydrogenase inhibition in human lymphocytes and lymphoblasts by mycophenolic acid and mycophenolic acid glucuronide. *Clin Chem.* 1997 Dec;43(12):2312-7.
- (40) Shipkova M, Armstrong VW, Wieland E, Niedmann PD, Schutz E, Brenner-Weiss G, Voihsel M, Braun F, Oellerich M. Identification of glucoside and carboxyl-linked glucuronide conjugates of mycophenolic acid in plasma of transplant recipients treated with mycophenolate mofetil. *Br J Pharmacol.* 1999 Mar;126(5):1075-82.
- (41) Allison AC, Eugui EM. Immunosuppressive and other effects of mycophenolic acid and an ester prodrug, mycophenolate mofetil. *Immunol Rev.* 1993 Dec;136:5-28. Review.
- (42) Ransom TJ. Mechanism of action of mycophenolate mofetil. *Ther Drug Monit.* 1995;17:681-4
- (43) Laliberte J, Yee A, Xiong Y, Mitchell BS. Effects of guanine nucleotide depletion on cell cycle progression in human T lymphocytes. *Blood.* 1998 Apr 15;91(8):2896-904.
- (44) Allison AC, Eugui EM. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology.* 2000 May;47(2-3):85-118. Review.
- (45) Flórez J, Armijo JA, Mediavilla A. *Farmacología Humana 3ª Edición Masson S.A.*
- (46) Nashan B, Cole E, Levy G, Thervet E. Clinical validation studies of Neoral C(2) monitoring: a review. *Transplantation.* 2002 May 15;73(9 Suppl):S3-11. Review.
- (47) Schütz E, Armstrong VW, Shipkova M, Weber L, Niedmann PD, Lammersdorf T, Wielsel M, Mandelbaum A, Zimmerhackl LB, Mehls O, Tönshoff B, Oellerich M and Members of the German study Group on MMF therapy in Pediatric Renal Transplant Recipients. Limited sampling strategy for the determination of mycophenolic acid area under the curve in pediatric kidney recipients. *Transplant Proc.* 1998 30:1182-84.

- (48) Yatscoff RW, Aspeslet LJ, Gallant HL. Pharmacodynamic monitoring of immunosuppressive drugs. *Clin Chem.* 1998 Feb;44(2):428-32.
- (49) Halloran PF, Helms LM, Kung L, Noujaim J. The temporal profile of calcineurin inhibition by cyclosporine in vivo. *Transplantation.* 1999 Nov 15;68(9):1356-61.
- (50) Caruso R, Perico N, Cattaneo D, Piccinini G, Bonazzola S, Remuzzi G, Gaspari F. Whole-blood calcineurin activity is not predicted by cyclosporine blood concentration in renal transplant recipients. *Clin Chem.* 2001 Sep;47(9):1679-87.
- (51) Stein CM, Murray JJ, Wood AJ. Inhibition of stimulated interleukin-2 production in whole blood: a practical measure of cyclosporine effect. *Clin Chem.* 1999 Sep;45(9):1477-84.
- (52) Sindhi R, LaVia MF, Paulling E, McMichael J, Burckart G, Shaw S, Sindhi LA, Livingston R, Sehgal S, Jaffe J. Stimulated response of peripheral lymphocytes may distinguish cyclosporine effect in renal transplant recipients receiving a cyclosporine+rapamycin regimen. *Transplantation.* 2000 Feb 15;69(3):432-6.
- (53) Langman LJ, LeGatt DF, Halloran PF, Yatscoff RW. Pharmacodynamic assessment of mycophenolic acid-induced immunosuppression in renal transplant recipients. *Transplantation.* 1996 Sep 15;62(5):666-72.
- (54) Gallant HL, Yatscoff RW. P70 S6 kinase assay: a pharmacodynamic monitoring strategy for rapamycin; assay development. *Transplant Proc.* 1996 Dec;28(6):3058-61.
- (55) Ferron GM, Pyszczynski NA, Jusko WJ. Gender-related assessment of cyclosporine/prednisolone/sirolimus interactions in three human lymphocyte proliferation assays *Transplantation.* 1998 May 15;65(9):1203-9.

- (56) Halloran P, Mathew T, Tomlanovich S, Groth C, Hooftman L, Barker C. Mycophenolate mofetil in renal allograft recipients: a pooled efficacy analysis of three randomized, double-blind, clinical studies in prevention of rejection. The International Mycophenolate Mofetil Renal Transplant Study Groups. *Transplantation*. 1997 Jan 15;63(1):39-47. Erratum in: *Transplantation* 1997 Feb 27;63(4):618.
- (57) Hueso M, Bover J, Seron D, Gil-Vernet S, Sabate I, Fulladosa X, Ramos R, Coll O, Alsina J, Grinyo JM. Low-dose cyclosporine and mycophenolate mofetil in renal allograft recipients with suboptimal renal function. *Transplantation*. 1998 Dec 27;66(12):1727-31.
- (58) Weir MR, Ward MT, Blahut SA, Klassen DK, Cangro CB, Bartlett ST, Fink JC. Long-term impact of discontinued or reduced calcineurin inhibitor in patients with chronic allograft nephropathy. *Kidney Int*. 2001 Apr;59(4):1567-73.
- (59) Fruman DA, Pai SY, Klee CB, Burakoff SJ, Bierer BE. Measurement of Calcineurin Phosphatase Activity in Cell Extracts Methods. 1996 Apr;9(2):146-54.
- (60) Pelzl S, Opelz G, Daniel V, Wiesel M, Susal C. Evaluation of posttransplantation soluble CD30 for diagnosis of acute renal allograft rejection. *Transplantation*. 2003 Feb 15;75(3):421-3.
- (61) Ensom MH, Chang TK, Patel P. Pharmacogenetics: the therapeutic drug monitoring of the future? *Clin Pharmacokinet*. 2001;40(11):783-802. Review.
- (62) Mancinelli L, Cronin M, Sadee W. Pharmacogenomics: the promise of personalized medicine. *AAPS PharmSci*. 2000;2(1):E4. Review.
- (63) Roses AD. Pharmacogenetics. *Hum Mol Genet*. 2001 Oct 1;10(20):2261-7. Review.



- (64) Rivory LP, Qin H, Clarke SJ, Eris J, Duggin G, Ray E, Trent RJ, Bishop JF. Frequency of cytochrome P450 3A4 variant genotype in transplant population and lack of association with cyclosporin clearance. *Eur J Clin Pharmacol.* 2000 Aug;56(5):395-8.
- (65) von Ahsen N, Richter M, Grupp C, Ringe B, Oellerich M, Armstrong VW. No influence of the MDR-1 C3435T polymorphism or a CYP3A4 promoter polymorphism (CYP3A4-V allele) on dose-adjusted cyclosporin A trough concentrations or rejection incidence in stable renal transplant recipients. *Clin Chem.* 2001 Jun;47(6):1048-52.
- (66) van der Heiden I, van Schaik R, van Fessem, et al. No association between MDR-1 or CYP3A4 gene polymorphism and dose-adjusted cyclosporine whole-blood concentrations in kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2002 2(Suppl 3):187
- (67) Macphee IA, Fredericks S, Tai T, Syrris P, Carter ND, Johnston A, Goldberg L, Holt DW. Tacrolimus pharmacogenetics: polymorphisms associated with expression of cytochrome p4503A5 and P-glycoprotein correlate with dose requirement. *Transplantation.* 2002 Dec 15;74(11):1486-9.