

Rutinní terapeutické monitorování tyrosinkinázových inhibitorů metodou LC-MS/MS

Mičová K.^{1,2}, Friedecký D.^{1,2}, Faber E.³, Adam T.^{1,2}

¹Laboratoř dědičných metabolických poruch, Fakultní nemocnice a Univerzita Palackého v Olomouci

²Ústav molekulární a translační medicíny, Univerzita Palackého v Olomouci

³Hemato-onkologická klinika, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

SOUHRN

Cíle studie: Cílem této studie je sledování vzájemného vztahu plasmatických hladin imatinibu s jeho denní dávkou a časovým intervalem od poslední užití dávky u pacientů s chronickou myeloidní leukémií na terapii imatinibem. Chronická myeloidní leukémie (CML) je myeloproliferativní onemocnění charakteristické přítomností chromozomu Philadelphia a leukemického fúzního genu BCR-ABL vedoucího k expresi konstitutivně aktivní tyrosinkinázy zodpovědné za maligní transformaci. Největší úspěšnost v léčbě byla zaznamenána prostřednictvím cílených inhibitorů vzniklého onkoproteinu, proto je dnes imatinib používán jako lék první linie. Terapeutické monitorování plasmatických hladin imatinibu u pacientů s CML je důležitým nástrojem k optimalizaci a individualizaci léčby.

Typ studie: Klinická

Materiál a metody: V naší studii jsme analyzovali soubor 1790 vzorků od 168 pacientů s CML na terapii imatinibem. Veškerá měření byla provedena metodou kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií v rámci rutinního vyšetřování plasmatických hladin tyrosinkinázových inhibitorů. Denní dávka imatinibu s pohybovala v rozmezí 100 až 800 mg; vzorky byly odebrány 1–120 hodin od poslední užití dávky.

Výsledky a závěr: Analýza výsledků odhalila významnou korelaci plasmatické hladiny imatinibu s jeho denní dávkou ($R^2 = 0,075$) a časovým intervalem od poslední užití dávky ($R^2 = 0,177$). Z celého souboru bylo vybráno 616 vzorků odebraných 24±4 hodiny od poslední dávky od 111 pacientů s denní dávkou 400 mg imatinibu a byla stanovena inter- (48 %) a intraindividuální (36 %) variabilita.

Klíčová slova: chronická myeloidní leukémie, imatinib, terapeutické monitorování léčiv

SUMMARY

Mičová K., Friedecký D., Faber E., Adam T.: Routine therapeutic monitoring of tyrosin kinase inhibitors by LC-MS/MS

Objective: The aim of the study is monitoring of correlation of imatinib plasma levels with daily dose and sampling time in patients with chronic myeloid leukemia on imatinib therapy. Chronic myeloid leukemia (CML) is myeloproliferative disorder characterized by the presence of chromosome Philadelphia and leukemic fusion gene BCR-ABL leading expression of constitutively active tyrosin kinase responsible for malignant transformation. The most successful treatment was recorded via targeted inhibitors of generated oncoprotein and therefore imatinib is used as a first-line treatment, today. Therapeutic monitoring of imatinib plasma levels in patients with chronic myeloid leukemia is important tool for treatment individualization.

Design: Clinical

Materials and methods: In our study we have analyzed a group of 1790 samples from 168 patients with CML on imatinib therapy. All measurements were performed by the liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry method within routine monitoring of plasmatic levels of tyrosin kinase inhibitors. Imatinib daily dose vary from 100 to 800 mg and samples were obtained 1 - 120 hours after last drug administration.

Results and conclusion: Analysis of the results revealed correlation between imatinib plasma level and daily dose ($R^2 = 0.075$) or with sampling time ($R^2 = 0.177$). From whole data file 616 samples taken 24±4 hours after last drug administration from 111 patients with imatinib daily dose 400 mg were chosen and inter- (48 %) and intraindividual (36 %) variability were determined.

Key words: chronic myeloid leukemia, imatinib, therapeutic drug monitoring

Úvod

Chronická myeloidní leukémie (CML) je jedním z nejlépe prostudovaných maligních onemocnění u člověka. Objevení chromozomu Philadelphia (Ph) [t(9;22)(q34;q11)] v roce 1960 odstartovalo celou řadu cytogenetických a molekulárně biologických studií vedoucích v konečném důsledku k objevení cílené protinádorové léčby prostřednictvím tyrosinkinázových inhibitorů (TKI).

CML je myeloproliferativní onemocnění charakteristické přítomností cytogenetického diagnostického znaku Ph chromozomu se vznikem fúze genů *ABL* a *BCR*. Produktem exprese nově vzniklého fúzního onkogenu *BCR-ABL1* je konstitutivně aktivní tyrosinkináza p210^{BCR-ABL}, jež má za následek chaotické spuštění řady signálních drah vedoucích k maligní transformaci buňky [1].

Díky krystalografickým studiím došlo k rozšíření znalostí o terciární struktuře proteinových kináz a porozumění molekulárním interakcím různých částí jejich

ATP vazebné domény. Naakumulované poznatky vedly k vývoji léků nyní používaných k tzv. cílené terapii [2]. Jako první specifický TKI byl do praxe zaveden imatinib (STI571, Glivec) cílený proti tyrosinkinázám *BCR-ABL*, *C-KIT* a *PDGFR*. V současné době je imatinib (IMA) používán jako lék první linie u nově diagnostikovaných pacientů s CML díky své vysoké účinnosti a relativně mírným nežádoucím účinkům. Ovšem u velké části pacientů s pokročilým stádiem onemocnění a zejména u pacientů s mutacemi ve vazebné doméně onkoproteinu dochází ke vzniku rezistence na léčbu IMA. V tomto případě nastupují na scénu alternativní látky, tzv. TKI druhé generace – nilotinib (AMN107, Tasigna) a dasatinib (BMS-354825, Sprycel) [3].

Terapeutické monitorování léčiv je užitečným nástrojem pro sledování variability ve farmakokinetice, spolupráce pacientů, lékových a potravinových interakcí, zvládnání nežádoucích účinků a individualizaci léčby. U TKI je prozatím nejvíce prostudováno měření plasmatických hladin imatinibu díky jeho příznivému farmakokinetickému profilu s poločasem rozpadu okolo 17 hodin a typickým dávkováním jednou denně. Po celém světě proběhla řada studií zabývajících se jeho korelací s různými faktory ovlivňujícími farmakokinetiku léku (např. tělesným povrchem, váhou těla, denní dávkou, věkem nebo intervalem od poslední užití dávky) a s prognózou nemocných významně související s dosaženou molekulární či cytogenetickou odpovědí [4-14]. Otázkou zatím zůstává monitorování hladin TKI druhé generace, které je komplikováno rychlou farmakokinetikou, nízkými hladinami dasatinibu, nebo dávkování nilotinibu 2x denně. Nejpoužívanější metodou pro stanovení hladin TKI je kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Příprava vzorku je obvykle založena na jednoduché precipitaci proteinů, extrakci na pevné fázi nebo extrakci kapalina-kapalina [15-21]. V naší laboratoři jsme vyvinuli jednoduchou metodu pro stanovení TKI pomocí LC-MS/MS a přímé infuze bez separačního kroku. Obě metody využívají jednoduchou precipitaci plasmatických proteinů před samotnou analýzou [22,23].

Materiál a metody

Retrospektivně jsme analyzovali soubor pacientů s CML z Hemato-onkologické kliniky ve Fakultní nemocnici v Olomouci, jejichž diagnóza byla založena na pozitivním nálezu v krevním obrazu a v kostní dřeni a potvrzena přítomností *Ph* chromozomu cytogenetickou analýzou a/nebo přítomností fúzního genu *BCR-ABL* analýzou FISH nebo RT-PCR. Na začátku léčby byla všem pacientům v chronické fázi podávána standardní denní dávka imatinibu 400 mg. V případě hematologické či jiné toxicity byla individuálně snížena, v případě suboptimální odpovědi nebo selhávání léčby došlo naopak ke zvýšení denní dávky až na 800 mg. Pacientům byla odebírána nesrážlivá krev v různých časových intervalech od poslední užití dávky, zcentrifugována a plasma dále zpracována dle níže uvedeného postupu. Léčebná odpověď byla hodnocena podle

doporučení expertů European LeukemiaNet [24].

Plasmatické koncentrace imatinibu byly měřeny dříve publikovanou metodou vysoce účinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií za použití přístrojů UHPLC Ultimate 3000 RS (Dionex, USA) a API 4000 (AB Sciex, USA) [22,23]. S každou řadou měření byla použita kalibrační sada a vzorky interní kontroly kvality od firmy Chromsystems. Plasma (20 μ L) byla deproteinována methanolem (180 μ L) s přidavkem interního standardu, vzorek byl sonifikován a ochlazen (-20°C) po dobu 30 min pro lepší vysrážení proteinů. Po centrifugaci byl supernatant odpipetován do vialky a analyzován. Naměřená data byla statisticky vyhodnocena pomocí regresní analýzy, T-testu a deskriptivní statistiky.

Výsledky a diskuse

Byla sledována korelace mezi plasmatickou hladinou IM a denní dávkou a intervalem od poslední užití dávky. Pro vyhodnocení jednotlivých analýz byly naměřeny hladiny u 1790 vzorků od 168 pacientů ve věku 22–90 let, kteří užívali dávku imatinibu od 100 mg do 800 mg denně. Závislost plasmatických hladin na užití dávce (100–800 mg; lineární korelace, obr. 1A) je statisticky významná, avšak s poměrně nízkou hodnotou významnosti ($R^2 = 0,075$). Toto je zapříčiněno širokým rozptylem dat pacientů na denní dávce 400 mg. Závislost hladiny na intervalu od poslední užití dávky (1-120 hod; Koeficient determinace $R^2 = 0,177$; exponenciální korelace; obr. 1B) vykazuje rovněž mírnou korelaci. Z grafu závislosti plasmatické hladiny IMA na denní dávce lze sledovat velkou interindividuální variabilitu, která může být způsobena mnoha faktory zahrnujícími genetické polymorfismy, doprovodné onemocnění a léčbu, rozdíly v absorpci, distribuci a metabolismu léku a podobně. Inter- a intraindividuální variabilita byla vypočtena z průměrných hladin z celkového počtu 616 vzorků u 111 pacientů z odběrů 24 \pm 4 hod od poslední užití dávky 400 mg/den. Z výsledků je patrné, že interindividuální variabilita (48 %) dosahuje vyšších hodnot než průměrné hodnoty intraindividuální variability (36 %), což bylo sledováno i u dřívějších studií [9, 10, 12, 13]. V našem souboru pacientů jsme našli jedince s velmi nízkou intraindividuální variabilitou okolo 5 %. Někteří pacienti vykazovali variabilitu i 50 %, což pravděpodobně souviselo s „patient compliance“ nebo případně s možnými nežádoucími účinky (snížení plasmatické hladiny z důvodu nauzey). Nelze také opomenout možné nepřesnosti v údajích získaných od pacientů (čas poslední medikace, dávkování a jiné).

V mnoha studiích byla sledována závislost plasmatických hladin na stupni klinické odpovědi na léčbu. V řadě případů včetně subanalýz studií IRIS (International Randomized Interferon vs STI571) a TOPS (Tyrosine Kinase Dose Optimization Study) byla prokázáno, že plasmatické hladiny u pacientů s dosaženou kompletní cytogenetickou odpovědí (CCR) a velkou molekulární odpovědí (MMR) jsou významně vyšší než u pacientů se suboptimální odpovědí [6-12]. Naproti stojí studie

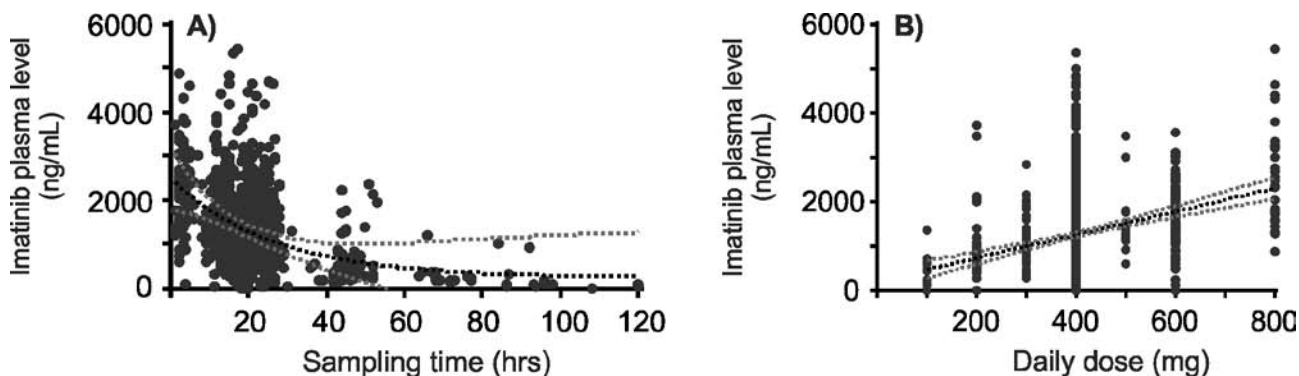


Fig. 1. Imatinib plasmatic levels show slight correlation with sampling time ($R^2 = 0,1769$; exponential correlation; A) and daily dose ($R^2 = 0,0752$; linear correlation; B).

několika skupin autorů [4, 5] včetně studie provedené na našem pracovišti [14], kde se tuto korelaci nepodařilo prokázat. Ovšem jako důležitý prognostický faktor se prokázalo monitorování hladin u pacientů se suboptimální odpovědí. Jako příklad lze uvést dva pacienty z našeho souboru s plasmatickou hladinou IMA nižší než 1000 ng/ml, kdy první z nich nedosáhl jak CCR, tak MMR a druhý MMR při standardní denní dávce 400 mg. Po eskalaci dávky na 800 mg, resp. 600 mg došlo k dosažení CCR u prvního pacienta po 3 měsících, k dosažení MMR po 15 a 6 měsících a rovněž ke zvýšení plasmatických hladin u obou pacientů [25]. Sledování plasmatických hladin je také důležité v případech pacientů s vysokými hodnotami a dosaženou MMR, u kterých je možno zvážit snížení terapeutické dávky, čímž lze eliminovat nebo zmírnit některé nežádoucí účinky, které se obvykle projevují při vysokých hladinách. Při těchto změnách léčby je však nezbytné pečlivě monitorovat léčebnou odpověď.

Závěr

Terapeutické monitorování TKI i přes nejasnou souvislost s klinickou odpovědí na léčbu hraje důležitou roli v individualizaci léčby a kontrole dodržování léčby ze strany pacienta. Ve vybraných případech lze na základě plasmatických hladin upravit léčbu za účelem zlepšení odpovědi na léčbu nebo zlepšení životního komfortu pacientů. Kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií představuje významný nástroj pro terapeutické monitorování TKI s velmi dobrou přesností a správností naměřených výsledků, což nemalou měrou přispívá k větší jistotě kliniků při rozhodovacím procesu.

Literatura

1. **An, X., Tiwari, A. K., Sun, Y., Ding, P. R., Ashby, C. R., Chen, Z. S.** BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia: A review. *Leuk. Res.* 2010, 34 (10), p. 1255-1268.
2. **Madhusudan, S., Ganesan, T. S.** Tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Clin. Biochem.* 2004, 37 (7), p. 618-635.
3. **Baker, S. J., Reddy, E. P.** Targeted inhibition of kinases in cancer therapy. *Mt Sinai J. Med.* 2010, 77 (6), p. 573-586.
4. **Forrest, D. L., Trainor, S., Brinkman, R. R., Barnett, M. J., Hogge, D. E., Nevill, T. J. et al.** Cytogenetics and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia are correlated with Sokal risk scores and duration of therapy but not trough imatinib plasma levels. *Leuk Res.* 2009, 33 (2), p. 271-275.
5. **Yoshida, C., Komeno, T., Hori, M., Kimura, T., Fujii, M., Okoshi, Y. et al.** Relevance of the daily dose of imatinib mesylate (IM) rather than its trough plasma concentration for achieving deep molecular response in patients with chronic myeloid leukemia. 51st ASH Annual Meeting and Exposition, New Orleans, LA, 5-8 December 2009, Abstract 112.
6. **Takahashi, N., Wakita, H., Miura, M., Scott, S. A., Nishii, K., Masuko, M. et al.** Correlation between imatinib pharmacokinetics and clinical response in Japanese patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Clinical Pharmacol. Ther.* 2010, 88 (6), p. 809-813.
7. **Sakai, M., Miyazaki, Y., Matsuo, E., Moriuchi, Y., Hata, T., Fukushima, T. et al.** Long-term efficacy of imatinib in a practical settings is correlated with imatinib trough concentration that is influenced by body size: a report by the Nagasaki CML Study Group. *Int. J. Hematol.* 2009, 89 (3), p. 319-325.
8. **Ishikawa, Y., Kiyoi, H., Watanabe, K., Miyamura, K., Nakano, Y., Kitamura, K. et al.** Trough plasma concentration of imatinib reflects BCR-ABL kinase inhibitory activity and clinical response in chronic-phase chronic myeloid leukemia: A report from the BINGO study. *Cancer Sci.* 2010, 101 (10), p. 2186-2192.
9. **Awidi, A., Ayed, A. O., Bsoul, N., Magablah, A., Mefleh, R., Dweiri, M., et al.** Relationship of serum imatinib trough level and response in CML patients: Long term follow-up. *Leuk Res.* 2010, 34 (12), p. 1573-1575.
10. **Singh, N., Kumar, L., Meena, R., Velpandian, T.** Drug monitoring of imatinib levels in patients undergoing therapy for chronic myeloid leukemia: comparing plasma levels of responders and non-responders. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2009, 65 (6), p. 545-549.
11. **Picard, S., Titier, K., Etienne, G., Teilhet, E., Ducint, D., Bernard, M. A., et al.** Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetics and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood* 2007, 109 (8), p. 3496-3499.
12. **Larson, R. A., Druker, B. J., Guilhot, F., O'Brien S. G., Riviere, G. J., Krahnke, T. et al.** Imatinib pharmacokinetics and its correlation with response and safety in chronic-phase chronic myeloid leukemia: a subanalysis of the IRIS study. *Blood* 2008, 111 (8), p. 4022-4028.

13. **Guilhot, F., Hughes, T., Cortes, J., Wang, Y., Hayes, M., Gichangi, A., et al.** Imatinib pharmacokinetics exposure and its correlation with clinical outcome in patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia for 400mg and 800mg daily doses (Tyrosine Kinase Dose Optimization Study [TOPS]). 51st ASH Annual Meeting and Exposition, New Orleans, LA, 5-8 December 2009, Abstract 447.
14. **Faber, E., Friedecký, D., Mičová, K., Rožmanová, Š., Divoká, M., Jarošová, M., et al.** Imatinib trough plasma levels do not correlate with the response to therapy in patients with chronic myeloid leukemia in routine clinical setting. *Ann. Hematol.* 2012, 91 (6), p. 923-929.
15. **Haouala, A., Zanolari, B., Rochat, B., Montemurro, M., Zaman, K., Duchosal, M. A., et al.** Therapeutic drug monitoring of the new targeted anticancer agents imatinib, nilotinib, dasatinib, sunitinib, sorafenib and lapatinib by LC tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2009, 877 (22), p. 1982-1996.
16. **De Francia, S., D'Avolio, A., De Martino, F., Pirro, E., Baietto, L., Siccradi, M., et al.** New HPLC-MS method for the simultaneous quantification of the antileukemia drugs imatinib, dasatinib, and nilotinib in human plasma. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2009, 877 (18-19), p. 1721-1726.
17. **Parise, R. A., Ramanathan, R. K., Hayes, M. J., Egorin, M. J.** Liquid chromatographic-mass spectrometric assay for quantitation of imatinib and its main metabolite (CGP 74588) in plasma. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2003, 791 (1-2), p. 39-44.
18. **Guetens, G., De Boeck, G., Highley, M., Dumez, H., Van Oosterom, A. T., de Bruijn, E. A.** Quantification of the anticancer agent STI-571 in erythrocytes and plasma by measurement of sediment technology and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2003, 1020 (1), p. 27-34.
19. **Bakhtiar, R., Lohne, J., Ramos, L., Khemani, L., Hayes, M., Tse, F.** High-throughput quantification of the anti-leukemia drug STI571 (GleevecTM) and its main metabolite (CGP 74588) in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2002, roč. 768 (2), s. 325-340.
20. **Awidi, A., Salem, I. I., Najib, N., Mefleh, R., Tarawneh, B.** Determination of imatinib plasma levels in patients with chronic myeloid leukemia by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Methods' comparison. *Leuk Res.* 2010, 34 (6), p. 714-717.
21. **Titier, K., Picard, S., Ducint, D., Teilhet, E., Moore, N., Berthaud, P., et al.** Quantification of imatinib in human plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Ther. Drug. Monit.*, 2005, 27 (5), p. 634-640.
22. **Mičová, K., Friedecký, D., Polýnková, A., Faber, E., Adam, T.** Stanovení hladiny tyrosinkinázových inhibitorů metodou UHPLC-MS/MS. *Chemické Listy* 2010, 104, p. s31-s34.
23. **Mičová, K., Friedecký, D., Faber, E., Polýnková, A., Adam, T.** Flow injection analysis vs. ultra high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry for determination of imatinib in human plasma. *Clin. Chim. Acta* 2010, 411(23-24), p. 1957-1962.
24. **Baccarani, M., Cortes, J., Pane, F., Niederwieser, D., Saglio, G., Apperley, J., et al.** Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European Leukemia. *Net. J. Clin. Oncol.* 2009, 27, p.6041-6051.
25. **Faber, E., Friedecký, D., Mičová, K., Divoká, M., Katriňská, B., Rožmanová, Š., et al.** Imatinib dose escalation in two patients with chronic myeloid leukemia, with low trough imatinib plasma levels measured at various intervals from the beginning of therapy and with sub-optimal treatment response, leads to the achievement of higher plasma levels and major molecular response. *Int. J. Hematol.* 2010, 91 (5), p. 897-902.

Práce byla podpořena granty IGA MZCR NT12218 (Ministerstvo zdravotnictví České republiky), MSM 6198959205, LF UP 2011_07 a LF UP 2011_011 (Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy České republiky). Infrastrukturální část projektu (Ústav molekulární a translační medicíny) byla podpořena Operačním programem Výzkum a vývoj pro inovace (projekt CZ.1.05/2.1.00/01.0030).

Do redakce došlo 13. 2. 2012

*Adresa pro korespondenci:
Mgr. Kateřina Mičová
Univerzita Palackého v Olomouci
Ústav molekulární a translační medicíny
Laboratoř metabolomiky
Hněvotínská 5
779 00 Olomouc
e-mail: KaterinaMicova@gmail.com*