

## Immunosuppressiva LC-MS

**B-Everolimus (NPU21707)**

**B-Sirolimus (NPU19909)**

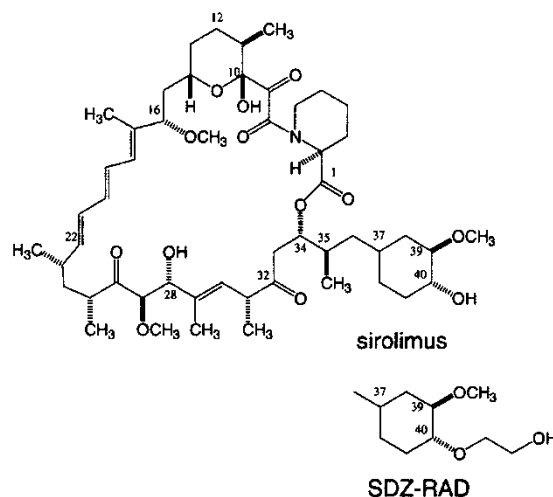
### Bakgrund, indikation och tolkning

#### Everolimus

Everolimus (Certican®) är ett derivat av rapamycin som produceras av *Streptomyces hygroscopicus* och är en semisyntetisk substans framtagen för att få ett oralt aktivt immunosuppressivt läkemedel. Everolimus används som profylax mot transplantationsavstötning hos vuxna patienter med låg till måttlig immunologisk riskprofil efter allogen njur- eller hjärtransplantation. Everolimus skall användas tillsammans med cyklosporin mikroemulsion och kortikosteroider.

#### Sirolimus och Everolimus (SDZ-RAD)

Everolimus utövar sin immunosuppressiva effekt genom att hämma proliferation och följaktligen klonal expansion av antigenaktiverade T-celler, vilken styrs av T-cellspecifika interleukiner, t ex interleukin-2 och interleukin-15. Substansen hämmar ett intracellulärt signalsteg som utlöses vid bindning av dessa tillväxtfaktorer till respektive receptor på T-cellerna och som normalt leder till cellproliferation. Blockering av denna signal gör att celldelningen avstannar i cellcykelns G<sub>1</sub>-fas.



Everolimus är ett substrat till CYP3A4 och P-glykoprotein. De huvudsakliga metabolismvägarna som har identifierats hos människa är mono-hydroxylering och *O*-dealkylering. Två huvudmetaboliter bildades genom hydrolys av den cykliska laktonen. Ingen av huvudmetaboliterna bidrar troligen i någon större grad till den immunosuppressiva effekten.

#### Sirolimus

Rapamune är indicerat för att förebygga transplantatavstötning efter njurtransplantation hos vuxna med låg till måttlig immunologisk riskprofil. Rapamune skall initialt användas tillsammans med cyklosporin mikroemulsion och kortikosteroider i 2-3 månader. Underhållsbehandling med Rapamune kan fortsättas tillsammans med kortikosteroider endast om cyklosporin kan sättas ut successivt.

Sirolimus hämmar T-cellsaktivering inducerad av de flesta stimuli, genom att blockera både kalciumberoende och kalciumoberoende intracellulär signaltransduktion. Studier visar ett effekterna förmedlas av en mekanism som skiljer sig från mekanismen bakom effekten av

Cyklosporin, Takrolimus och andra immunosuppressiva medel. Försöksresultat indikerar att sirolimus binder till det specifika cytosolproteinet FKPB-12, och att komplexet sirolimus/FKPB 12 hämmar aktivering av det så kallade mammalian Target of Rapamycin (mTOR), som är ett kinas med avgörande betydelse för cellcykelns förlopp. Hämmningen av mTOR leder till blockering av flera specifika transduktionsmekanismer. Nettoresultatet är en hämning av aktiveringen av lymfocyterna, vilket leder till immunosuppression (1).

## Everolimus

### Exponering-respons tabell.

Njurtransplantation					
Dalvärdet (µg/L)	≤ 3,4	3,5-4,5	4,6-5,7	5,8-7,7	7,8-15,0
Avstöttningsfrihet	68 %	81 %	86 %	81 %	91 %
Hjärttransplantation					
Dalvärdet (µg/L)	≤ 3,5	3,6-5,3	5,4-7,3	7,4-10,2	10,3-21,8
Avstöttningsfrihet	65 %	69 %	80 %	85 %	85 %

## Sirolimus

Vid kombinationsbehandling med cyklosporin har flertalet patienter efter intag av 2 mg sirolimus helblodskoncentrationer mellan 4-12µg/L. Efter att behandlingen med cyklosporin har avslutats rekommenderas som mål dalvärdet inom målintervall 12-20 µg/L.

## Analysprincip

Metoden mäter Everolimus (40-*O*-(2-hydroxyethyl)-rapamycin (Certican®, Novartis) med Everolimus-d4 som intern standard (IS) och Sirolimus (Rapamune®, Wyeth Lederle) med Sirolimus-d3 som IS. Analysen utförs i helblod eftersom analyterna huvudsakligen finns i erytrocytfraktionen. Kvoten plasma/helblod är ungefär 1/30 för Sirolimus [1]. Helblod mixas med acetonitril/etanol som innehåller IS, centrifugeras, varefter supernatanten analyseras med masspektrometri (LC-MS/MS), en teknologi som kännetecknas av god känslighet och mycket hög specificitet [4].

LC-MS/MS instrumentet är av typen trippel kvadrupol masspektrometer kopplad till en HPLC. Separation av olika provmolekyler sker i en HPLC-kolonn. Provmolekyler som bildar positiva joner i sur miljö joniseras i jonkällan. Joniseringen sker enligt principen API ES (atmospheric pressure electrospray ionisation). I första kvadrupolen selekteras molekylljonens addukt med en ammoniumjon eller med en proton. I andra kvadrupolen fragmenteras denna addukt med en specifik energi. I tredje kvadrupolen selekteras ett av fragmenten, vanligtvis det med störst intensitet. Den resulterande jonintensiteten mäts med en elektronmultiplikator.

## Referensintervall

### Everolimus

Riktområde för Everolimus erhållna med LC-MS/MS metodik är inte fastställt. En metodologisk jämförelse på ett patientmaterial omfattande 6 patienter visade att medelvärdet av Everolimus-koncentrationerna erhållet med LC-MS/MS var 17 % lägre än medelvärdet erhållet med en immunologisk teknik [7].

Det är viktigt att komma ihåg att det föreslagna riktområdet varierar beroende på vilken metod som används för bestämning av Everolimus och därför ska värden som erhållits med olika metoder inte användas som underlag för dosjusteringar. Uträkning av korrigeringsfaktorer för att jämföra immunologiska och kromatografiska metoder går inte då det finns variationer mot metaboliter och andra metodologiska skillnader. En bestämd metod bör användas för enskilda patienter.

Baserat på expositionseffekt- och exposition-säkerhetsanalys har patienter som uppnår dalvärden i helblod av Everolimus  $\geq 3,0 \mu\text{g/L}$  visats ha en lägre frekvens av biopsibekräftad akut transplantatavstötning vid både njur- och hjärttransplantation jämfört med patienter vilkas dalvärden var  $< 3,0 \mu\text{g/L}$ . Den övre gränsen för det terapeutiska intervallet rekommenderas till  $8 \mu\text{g/L}$ . Exponering högre än  $12 \mu\text{g/L}$  har inte studerats. Dessa rekommenderade intervall för Everolimus är baserade på kromatografiska bestämningsmetoder.

Optimalt skall dosjusteringar av Everolimus baseras på dalvärden, vilka erhållits mer än 4-5 dagar efter senaste doseringsändring. Det finns en interaktion mellan cyklosporin och Everolimus, vilket medför att everolimusnivåerna kan reduceras när cyklosporinexponeringen märkbart minskar (d.v.s. dalvärdeskoncentration  $< 50 \mu\text{g/L}$ ).

### Sirolimus

Riktområde för sirolimus erhållna med LC-MS/MS metodik är inte fastställt. En metodologisk jämförelse visar att medelvärdet av sirolimuskoncentrationer erhållna med LC-MS/MS metod är c:a 20 % lägre än medelvärdet erhållna med en immunologisk teknik.

Optimalt ska justeringar i doseringen av sirolimus baseras på mer än en enstaka bestämning av dalvärdet, gjord mer än 5 dagar efter den senaste dosjusteringen.

Cyklosporin hämmar metabolismen av sirolimus och följaktligen kommer nivåerna av sirolimus att minska när cyklosporin sätts ut, om inte dosen av sirolimus ökas. I genomsnitt behöver dosen av sirolimus vara 4 gånger högre för att kompensera både för frånvaron av den farmakokinetiska interaktionen (tvåfaldig ökning) och det ökade behovet av immunosuppression i frånvaro av cyklosporin (tvåfaldig ökning). Dosen av sirolimus ska ökas i en takt som motsvarar eliminationen av cyklosporin. De rekommenderade intervallen för sirolimus baseras på kromatografiska metoder.

Sirolimus är substrat för både cytokrom P450 IIIA4 (CYP3A4) och P-glykoprotein.

Sirolimus metaboliseras i stor utsträckning genom *O*-demetylering och/eller hydroxylering. Sju huvudmetaboliter inkluderande hydroxi, demetyl och hydroxidemetyl, kan identifieras i helblod.

Sirolimus är huvudkomponenten i humant helblod och bidrar till mer än 90 % av den immunosuppressiva aktiviteten. Efter en engångsdos av [14C] sirolimus hos friska försökspersoner

Metodbeskrivning

**Immunosuppressiva LC-MS**Gäller för  
Klinisk kemi

LU

återvanns huvuddelen av radioaktiviteten (91,1 %) i feces, och bara en mindre del (2,2 %) utsöndrades i urinen.

Absorption och efterföljande elimination av sirolimus kan påverkas av substanser som påverkar CYP3A4 och P-glykoprotein. Hämmare av CYP3A4 (t.ex. ketokonazol, vorikonazol, itra-konazol, telitromycin eller klaritromycin) minskar metabolismen av sirolimus och ökar nivåerna av sirolimus. Inducerare av CYP3A4 (t.ex. rifampin eller rifabutin) ökar metabolismen av sirolimus och minskar nivåerna av sirolimus. Samtidig administrering av sirolimus och starka hämmare av CYP3A4 eller inducerare av CYP3A4 rekommenderas inte.

**Metodkaraktistika****Interferenser och felkällor**

Påverkan av hemolys, hyperlipidemi, hyperbilirubinemi och uremi är inte testad men vi antar att någon sådan inte finns på grund av den höga specificiteten i LC-MS/MS teknologin.

**Mätområde**

Komponent	Kvantifieringsgräns, µg/L	Mätintervall µg /L
Everolimus	0,50	0,50-32
Sirolimus	0,50	0,50-32

**Mätosäkerhet (enligt årsgenomgång för 2019)**

Komponent	Låg kontroll		Hög kontroll	
	Börvärde (µg/L)	CV%	Börvärde (µg/L)	CV%
Everolimus	1	7	19,7	7
Sirolimus	1,1	9	22	9

**Riktighet**

Riktigheten kontrolleras kontinuerligt genom deltagande i externt kontrollprogram (LGC Standards Proficiency) för båda analyterna.

**Spårbarhet**

Kalibreringen är spårbar via analyscertifikat från respektive leverantör av referenssubstanser, se Bilaga 1.

**Validering**

Valideringen har utförts vid Klinisk Kemi Lund, Labmedicin Skåne [6].

**Övrig information**

Metoden är ackrediterad.

Normal analysfrekvens är tre gånger i veckan.

# Medicinsk service

Metodbeskrivning

## Immunosuppressiva LC-MS

Gäller för  
Klinisk kemi

LU

Gäller from	Revision	Sida
2020-10-20	15	5(6)
Godkänd av: Anders Blomgren 166289		

Utarbetad av  
Anders Blomgren

Dokumentförvaltare  
Anders Blomgren 166289

Dokument id  
C-8945

Original lagras elektroniskt! Användaren ansvarar för att gällande revision används.

## Referenser

1. Therapeutic monitoring of immunosuppressant drugs. Where are we? Wallemacq P.E. Clin Chem Lab Med 2004;42:1204-1211.
2. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanism of action and therapeutic efficacy. A.L Taylor, C.J.E. Watson and J.A. Bradley. Critical reviews in Oncology/Hematology 2005,56:23-46
3. Laurells Klinisk kemi i praktisk medicin. Lund. Nilsson-Ehle P, red. Studentlitteratur 2003, 8:e upplagan sid 664-665.
4. Yang Z, Wang S. Recent development in application of high performance Liquid chromatography-tandem mass spectrometry in therapeutic drug monitoring of immunosuppressants. J Immun. Methods. 2008;336:98-102
5. [C-7506, Instrumenthandledning LCMSMS AB Sciex QTrap 5500-1, Lund](#)
6. Valideringsprotokoll Immunosuppressiva, Klinisk kemi och farmakologi, Lund.
7. FASS 2007, Läkemedelsindustriföreningen, LIF.
8. [C-7656, Instrumenthandledning LCMSMS Beräkningar](#)
9. [16-1092, Instruktion för utvärdering på LC-MS](#)
10. [17-195, Analysprotokoll Immunosuppressiva](#)