

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/28461> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Brink, Marloes Hendrika ten

Title: Individualized therapeutics in allogeneic stem cell transplantation

Issue Date: 2014-09-03

Samenvatting



INLEIDING

Bij een allogene hematopoietische stamceltransplantatie (allo-HSCT) worden stamcellen van een donor toegediend aan een patiënt met als doel het immuunsysteem of bloedvormend systeem van de patiënt te herstellen. Een allo-HSCT wordt toegepast bij bloedkanker (verschillende typen leukemie), bij ziekten waarbij het afweersysteem niet of onvoldoende werkt of ziekten waarbij er een tekort is aan goed functionerende bloedcellen. Deze aandoeningen kunnen aangeboren zijn of zijn verworven na de geboorte. Aangeboren ziektes kunnen vlak na de geboorte al aan het licht komen, daarnaast zijn er verschillende vormen van bloedkanker die vooral bij kinderen voorkomen en allo-HSCT wordt daarom veelvuldig bij kinderen toegepast.

Wanneer lichaamsvreemde stoffen worden toegediend zal het lichaam er voor zorgen dat deze zo snel mogelijk worden opgeruimd. Dit is het geval bijvoorbeeld bij een infectie met een bacterie of een virus of bij toediening van cellen of organen in het geval van een transplantatie. Dus als een patiënt stamcellen van een donor ontvangt, is er het risico dat deze worden afgestoten door het lichaam. Er worden verschillende maatregelen genomen om de kans op afstoting zo klein mogelijk te houden. In de eerste plaats wordt er gezocht naar een donor die zo gelijk mogelijk is aan de patiënt. Dit gebeurt op basis van humaan leukocytenantigen (HLA) matching; antigenen van patiënt en donor moeten zo veel mogelijk overeenkomen, zodat het afweersysteem van de patiënt de cellen van de donor zo min mogelijk herkent als lichaamsvreemde cellen. HLA-antigenen van broers en zussen zijn soms identiek aan elkaar, of kunnen veel op elkaar lijken. Daarom is een broer of zus vaak een geschikte donor. Daarnaast zijn er mogelijkheden om stamcellen van niet-gerelateerde donoren toe te dienen waarbij vooraf is vastgesteld dat deze voldoende overeenkomsten vertonen met de cellen van de patiënt zelf.

ALLOGENE STAMCELTRANSPLANTATIE

De patiënt krijgt voorafgaand aan de allo-HSCT een chemokuur, ook wel conditioneringsfase genoemd, die bestaat uit een combinatie van geneesmiddelen. Deze conditionering heeft als doel het afweersysteem zo veel mogelijk te remmen (immuunsuppressie), zodat de donorcellen niet worden afgestoten. Verder wordt met de conditionering “myelosuppressie” beoogd, dit houdt in dat zo veel mogelijk stamcellen van de patiënt worden gedood, zodat er ruimte is voor de stamcellen van de donor om zich te nestelen en te gaan delen. In het geval van leukemie zal de chemokuur er ook voor zorgen dat kankercellen zo veel mogelijk worden gedood. De dosis van de verschillende geneesmiddelen is hoog in vergelijking met een “normale” chemokuur. Dit resulteert erin dat de hoeveelheid bloedcellen in de patiënt heel laag wordt, dit wordt aplasie

genoemd. Alleen wanneer een patiënt in aplasie is, is het mogelijk om de donor stamcellen toe te dienen. Echter, als een patiënt vrijwel geen witte bloedcellen meer heeft dan werkt het immuunsysteem niet meer en kan de patiënt gemakkelijk geïnfecteerd raken met een bacterie of een virus. Om deze reden krijgen alle patiënten preventief antibiotica en middelen tegen virusinfecties. Daarnaast worden ze verzorgd in een geïsoleerde ruimte met gefilterde, schone lucht om de patiënt zo veel mogelijk te beschermen tegen infecties.

Nadat de stamcellen zijn toegediend is het doel dat deze zich nestelen en gaan expanderen, wat uiteindelijk moet leiden tot herstel van het immuun- en bloedsysteem. In deze fase na de allo-HSCT bestaat het risico dat de stamcellen van de donor worden afgestoten of de immuuncellen van de donor kunnen reageren tegen de cellen van de patiënt zelf en schade veroorzaken. Dit laatste fenomeen heet graft-versus-host ziekte.

DOEL VAN DE STUDIE

In de verschillende fasen van een allo-HSCT procedure krijgt een patiënt geneesmiddelen toegediend, in de conditioneringsfase, in de preventie en behandeling van infecties en bij complicaties die kunnen optreden tijdens de allo-HSCT. Deze middelen kunnen toxisch zijn en schade geven bij de patiënt of kunnen soms juist iets hoger worden gedoseerd om daarmee effectiever te zijn. Het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift is de behandeling met bestaande geneesmiddelen rondom een allo-HSCT verder te optimaliseren. Het onderzoek is gericht op drie geneesmiddelen: busulfan en treosulfan, beide cytostatica die in de conditioneringsfase worden toegepast, en glucocorticosteroïden, die worden toegepast bij de behandeling van acute graft-versus-host ziekte. Onderzoek naar optimalisatie van deze geneesmiddelen wordt gedaan door relaties te zoeken tussen de concentratie of blootstelling (farmacokinetiek) van een geneesmiddel in het bloed en het effect van het geneesmiddel. Of door te kijken of er genetische kenmerken zijn in een patiënt die maken dat het geneesmiddel een afwijkend effect heeft in verschillende individuen (farmacogenetica).

BUSULFAN EN TREOSULFAN

Busulfan en treosulfan zijn beide alkylerende cytostatica die worden toegepast in de conditioneringsfase bij allo-HSCT in volwassenen en kinderen. Met busulfan is al veel ervaring en in eerder onderzoek is aangetoond dat de concentratie (blootstelling) in het bloed gerelateerd is aan de effectiviteit en toxiciteit van busulfan. Als de concentratie in het bloed van busulfan te hoog is, dan bestaat er kans op toxiciteit; leverschade en mucositis (beschadiging van de

slijmvliezen). Wanneer de concentratie van busulfan te laag is, dan is er verhoogde kans op afstoting van het transplantaat. In de praktijk wordt daarom tijdens de vierdaagse kuur van busulfan de concentratie in het bloed gemeten en eventueel de dosis aangepast, zodat de juiste blootstelling wordt bereikt in een patiënt.

De ervaring met treosulfan in allo-HSCT is nog beperkt en vooral in kinderen is er weinig onderzoek gedaan naar de concentratie van treosulfan in het bloed van verschillende patiënten. Het middel lijkt op busulfan, maar geeft minder toxiciteit en is mogelijk iets minder effectief.

In **hoofdstuk 2** van dit proefschrift is een overzicht gegeven van de eerdere onderzoeken die zijn gedaan om de huidige conditioneringen op basis van busulfan en treosulfan te optimaliseren. Busulfan wordt gedoseerd op basis van het lichaamsoppervlak of lichaamsgewicht van de patiënt, maar desondanks kan de blootstelling tussen individuen erg verschillen. Dit zou kunnen komen door verschil in genetische opmaak van patiënten. In **hoofdstuk 3** is gekeken naar verschillen in het DNA (polymorfismen) van patiënten. Polymorfismen in 3 genen zijn onderzocht in 66 volwassen patiënten die busulfan kregen voorafgaand aan hun allo-HSCT. De drie genen coderen voor drie verschillende enzymen die betrokken zijn bij het omzetten van busulfan naar een inactieve stof (metabolisme); *GSTA1*, *GSTM1* en *GSTP1*. De polymorfismen in deze genen werden gerelateerd aan de busulfanconcentratie in het bloed van de individuele patiënten. Eén polymorfisme in *GSTA1* (rs3957357) was gerelateerd aan de blootstelling van busulfan in volwassenen; patiënten met twee C-allelen hebben gemiddeld de hoogste klaring, patiënten met het CT-genotype hebben een lagere klaring in vergelijking met patiënten met het CC-genotype en patiënten met het TT-genotype hebben gemiddeld de laagste klaring en daarmee de hoogste blootstelling van busulfan in het bloed. Echter slechts 18% van de variabiliteit in klaring in de studiegroep kon worden verklaard met dit polymorfisme in *GSTA1*. In **hoofdstuk 4** hebben we daarom breder gezocht naar genetische polymorfismen die een effect zouden kunnen hebben op de farmacokinetiek van busulfan. Een eerste studiegroep van 65 volwassenen is ge genotypeerd met behulp van de DMET array (Drug Metabolizing Enzymes and Transporters array). Met deze array kunnen 1936 genetische veranderingen in 225 genen, betrokken bij metabolisme en transport van geneesmiddelen, worden geanalyseerd. De zeven meest belovende polymorfismen uit de eerste studiegroep werden vervolgens geanalyseerd in een tweede studiegroep van 78 volwassen patiënten. In deze groep was één polymorfisme in *GSTA5* (rs4715354) geassocieerd met busulfanklaring en deze kon 6.5% van de variabiliteit in klaring verklaren. Het polymorfisme in *GSTA5* is gekoppeld aan het polymorfisme in *GSTA1* (rs3957357); wanneer een individu een afwijkend allel heeft in *GSTA1* is de kans groot dat deze ook een afwijkend allel heeft in *GSTA5*. De bevinding dat *GSTA5* geassocieerd is met busulfanklaring is daarom een positieve controle van het effect van *GSTA1* op busulfanklaring. In

deze studie zijn geen andere polymorfismen, in genen betrokken bij geneesmiddelmetabolisme en -transport, gevonden die waren geassocieerd met de farmacokinetiek van busulfan.

De zeven meest veelbelovende polymorfismen uit het volwassenencohort van hoofdstuk 4 zijn ook geanalyseerd in een studiegroep van 84 kinderen, dit is beschreven in **hoofdstuk 5**. In dit hoofdstuk hebben we het polymorfisme in *GSTA1* in plaats van het polymorfisme in *GSTA5* geanalyseerd. Hiervoor is gekozen, omdat deze twee polymorfismen gekoppeld zijn en *GSTA1* functioneel is en *GSTA5* niet. In de kinderen die busulfan kregen toegediend voorafgaand aan hun allo-HSCT was wederom het polymorfisme in *GSTA1* (rs3957357) en een polymorfisme in *CYP39A1* (rs9381468 en rs953062) geassocieerd met busulfanklaring. Tezamen kunnen deze twee genetische varianten 17% van de variabiliteit in busulfanklaring in kinderen verklaren. Tevens is gebleken dat het effect van *GSTA1* groter is in kinderen onder de twee jaar. Een verklaring zou kunnen zijn dat in jonge kinderen de *GSTA1*-activiteit nog niet maximaal is en daarom het effect van genetische variatie groter is.

In **hoofdstuk 6** en **7** is onderzoek gedaan naar de farmacokinetiek van treosulfan. Er zijn enkele studies die de farmacokinetiek van treosulfan in kinderen die een allo-HSCT ondergaan beschrijven, deze studies zijn uitgevoerd in kleine patiëntengroepen. In **hoofdstuk 6** zijn ontwikkeling en validatie van een bioanalytische methode voor het bepalen van treosulfan in het bloed, een populatie-farmacokinetisch model en een "limited sampling model" beschreven. Met behulp van het populatie-farmacokinetisch model en het "limited sampling model" kan de farmacokinetiek van de populatie worden beschreven en kan met behulp van slechts twee bloedmonsters van een individuele patiënt de klaring en blootstelling worden berekend. Met behulp van deze methode kan de farmacokinetiek gemakkelijker worden bestudeerd, tevens bij baby's, aangezien er slechts twee bloedmonsters hoeven worden afgenomen van maximaal 500 µl.

In **hoofdstuk 7** is een eerste verkennend onderzoek in 21 kinderen uitgevoerd waarin de farmacokinetiek van treosulfan is gerelateerd aan uitkomst van de HSCT en toxiciteit. De variabiliteit in blootstelling tussen patiënten was 14% en de van-dag-tot-dag-variatie is 5%. Treosulfanconditionering bleek effectief te zijn en de toxiciteit was relatief mild in vergelijking met andere conditioneringsschema's. Hieruit volgt dat de effectiviteit van treosulfan mogelijk te verbeteren is, door de dosis te verhogen. Dit zou dan in eerste instantie vooral onderzocht kunnen worden in oudere kinderen en in kinderen waarbij een sterkere conditionering nodig is, bijvoorbeeld in het geval van verschillende typen leukemie.

Glucocorticosteroiden en acute graft-versus-host ziekte

Nadat de stamcellen van de donor zijn toegediend en de donorcellen zich nestelen in het beenmerg van de patiënt is er een risico op het optreden van acute graft-versus-host ziekte (aGvHD). Bij aGvHD vallen de immuuncellen van de donor cellen van de patiënt aan en zorgen voor schade, vooral in het maag-darmstelsel, de lever en de huid. Deze ziekte heeft een hoge morbiditeit en mortaliteit. De eerstelijns therapie bij patiënten met graad 2 aGvHD of hoger bestaat uit hoge doses systemische glucocorticosteroiden (GC's). Helaas reageert ongeveer slechts de helft van de patiënten voldoende op deze therapie. Het niet reageren op GC's (GC-resistentie) is ook bekend bij andere ziektes waarbij GC's worden toegepast. Men denkt dat GC-resistentie een intrinsieke eigenschap is van een deel van de populatie, waarbij mogelijk de genetische opmaak van een patiënt een rol speelt. In **hoofdstuk 8** hebben we nieuwe genetische markers ontdekt in gezonde vrijwilligers die een rol spelen bij GC-resistentie en deze vervolgens getest in kinderen met aGvHD na hun allo-HSCT. De genetische markers die onderzocht zijn hebben een effect op de expressie van genen in de aanwezigheid van GC's. Deze markers worden ook wel "expression quantitative trait loci" (eQTLs) genoemd. In gezonde vrijwilligers zijn zeven eQTLs geïdentificeerd. De expressie van de volgende genen is geassocieerd met het genotype van de eQTLs: *LPIN2*, *DPYSL3*, *TMEM71*, *GZMA*, *MOB3C*, *TTF2*, *FAM117B*. Echter, het genotype van de eQTLs hadden geen effect op *in vitro* T-cel proliferatie. In de kinderen zijn deze 7 eQTLs en een eQTL van *RBMS3* geanalyseerd. Aangezien in aGvHD de GC-behandeling vooral is gericht tegen de immuuncellen van de donor, hebben we de patiënt zelf en zijn of haar donor gegenotypeerd voor de 8 eQTLs. In **hoofdstuk 8** hebben we aangetoond dat het genotype van de donor van belang is om de GC-respons van de individuele patiënt met aGvHD te kunnen voorspellen. Met name de eQTLs die een effect hebben op *TMEM71* en *DPYSL3* zijn geassocieerd met GC-respons en *TMEM71* donorgetype heeft een voorspellende waarde van 65%.

Genotyperen van allo-HSCT patiënten

In **hoofdstuk 9** is een casus beschreven van een patiënt die een niertransplantatie zou ondergaan. Hiervoor worden immunosuppressieve geneesmiddelen gegeven en één van de geneesmiddelen is tacrolimus. Dit geneesmiddel wordt gemetaboliseerd door CYP3A5 en de activiteit van dit enzym is afhankelijk van de allelen die de patiënt van het CYP3A5-gen heeft. Om direct te starten met een goede dosis wordt voor start van tacrolimus het genotype van CYP3A5 bepaald. Dit wordt routinematig met behulp van twee onafhankelijke methoden gedaan, zodat er altijd een accurate uitslag wordt uitgegeven. Bij deze patiënt gaven de twee

methoden echter tegenstrijdige resultaten en toen de behandelend arts werd geconsulteerd bleek dat de patiënt in het verleden een allo-HSCT had ondergaan. Het bloedmonster dat was gebruikt voor de genotypering bevatte cellen van de donor en de patiënt zelf, wat vaak voorkomt na een allo-HSCT. Dit resulteerde in een gemengd genotype van *CYP3A5* in het perifere bloed. Het genotype is vervolgens bepaald in speeksel van de patiënt. Dit materiaal gaf een eenduidiger resultaat van het genotype van de patiënt zelf, welke het meest van belang is bij het metabolisme van tacrolimus. Deze casus geeft het belang van goede kwaliteitscontroles en de keuze van patiëntmateriaal aan voor genotyperen in de klinische praktijk.

CONCLUSIE

In dit proefschrift is onderzoek gedaan naar drie geneesmiddelen die worden toegepast bij allo-HSCT in kinderen en volwassenen, met als doel het optimaliseren van de huidige therapieën.

We hebben aangetoond dat variaties in het *GSTA1*-genotype in volwassenen en *GSTA1*- en *CYP3A1*-genotype in kinderen een effect hebben op de farmacokinetiek van busulfan. De variatie in treosulfanklaring tussen patiënten is relatief klein, dit zou één van de voordelen van treosulfan kunnen zijn. In aGvHD-patiënten blijkt dat het donorgenotype meer van belang is voor het voorspellen van de GC-respons dan het genotype van de patiënt zelf. In de toekomst moeten busulfan- en treosulfanconditionering in grote homogene studiegroepen direct met elkaar vergeleken worden, zodat een goede keuze voor één van de middelen kan worden gemaakt voor de individuele patiënt. De resultaten met betrekking tot de donorgenotypes van *TMEM71* en *DPYSL3* en GC-respons moet nog worden onderzocht en bevestigd in een tweede onafhankelijk cohort. Wanneer de huidige resultaten worden bevestigd dan zouden deze genotypes ook kunnen worden onderzocht in andere ziekten.

