



## TDM van oncolityca

**Arno Sinjewel, Abdel Chahbouni en Bram Wilhelm, laboratorium klinische farmacologie en apotheek, VU medisch centrum.**

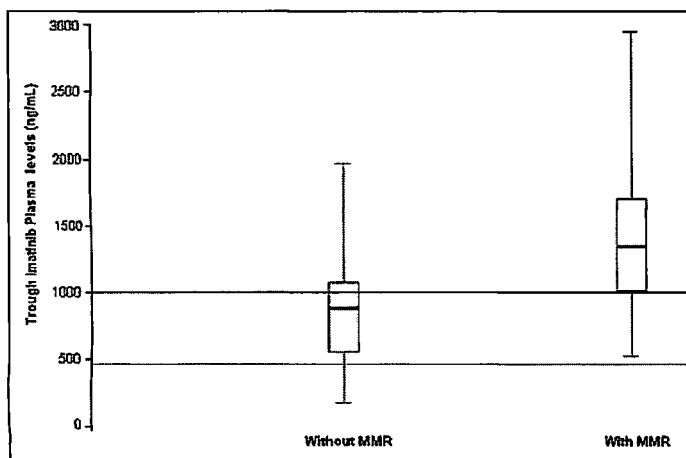
Cytostatica (oncolityca) zijn geneesmiddelen die de groei van kankercellen remmen en/of kankercellen doden. Het gebruik van deze farmaca (chemotherapie) vormt samen met chirurgie en radiotherapie de behandeling tegen kanker. Helaas gaat het gebruik van cytostatica gepaard met vaak ernstige bijwerkingen [1]. Om bijwerkingen te minimaliseren, maar ook om de effectiviteit van de therapie te verhogen, wordt vaak een aantal cytostatica tegelijk gegeven.

Het is opmerkelijk dat er weinig tot geen TDM van deze middelen wordt gedaan, want er is zeker één groep oncolityca waarbij er een indicatie is om bloedspiegels te bepalen. Dit zijn de Tyrosine Kinase Inhibitors (TKI's). Op dit moment worden Erlotinib, Imatinib, Dasatinib, Gefitinib, Nilotinib en Sorafinib voor diverse (studie)doeleinden gebruikt. De middelen waar het meeste onderzoek naar is gedaan zijn Imatinib en Erlotinib. Imatinib wordt toegepast in alle fasen van Chronische Myeloïde Leukemie (CML) [2].

### Chronische myeloïde leukemie

Chronische myeloïde leukemie is een vorm van leukemie waarbij er een overmatige productie is van witte bloedcellen. Bij 95% van CML-patiënten wordt ook het Philadelphia chromosoom gevonden. Het Philadelphiachromosoom is een genetisch defect dat ontstaat doordat een deel van

**Figuur 1.**  
**Imatinib plasma concentraties met en zonder MMR. De stippellijn bij 494 µg/L is de targetwaarde die op basis van fase 1 en fase 2 studie was vastgesteld. Deze waarde is duidelijk te laag.**



chromosoom 9 van plek wisselt met chromosoom 22. Deze verandering heet reciproke translocatie. Beide chromosomen breken in het midden. Bij chromosoom 9 is dat het abl-gen en bij chromosoom 22 is dat het bcr-gen. Door deze fusie ontstaat het BCR-Abl-gen op chromosoom 22. Dit gen codeert voor het BCR-Abl eiwit. Dit eiwit werkt als een enzym en is verantwoordelijk voor de sterke groei en abnormale ontwikkeling van de witte bloedcellen bij CML. Het Philadelphia chromosoom en het eiwit zijn op verschillende manieren aan te tonen. Complete Cytogenetische respons (CCyR) is verdwijning van het BCR-Abl gen en MMR (major molecular respons) is gebaseerd op de meting van het eiwit.

CML is een zeldzame ziekte. Per jaar komen er in Nederland zo'n 150 patiënten bij. De meeste patiënten zijn te vinden in de leeftijdsgroep van 40 tot 60 jaar. CML komt vaker voor bij mannen dan bij vrouwen. Als medicijn kan imatinib worden toegediend waarvoor een studie in het New England Journal of Medicine een vijfjaarsoverleving van 89% laat zien.[3]

Diverse studies hebben een relatie aangetoond tussen de MMR en de concentratie Imatinib in plasma. Picard [4] heeft gepubliceerd dat de kans op MMR groter is bij patiënten met een plasmaconcentratie van 1000 µg/L of hoger.

In een andere studie is er bij 351 CML patiënten de klinische respons, waaronder de complete cytogenetische respons (CCyR), gecorreleerd aan Imatinib concentraties. Ook hierbij is bij een spiegel van boven de 1000 µg /L een significant betere CCyR (=0% Philadelphia chromosoom aanwezig). [5]

Op basis van deze studies heeft Novartis een Europese studie (EUTOS) opgezet, waarbij Imatinib gehalte-bepalingen worden uitgevoerd. Indicaties voor TDM zijn:

- Gebrek aan respons
- Ernstige bijwerkingen
- Twijfel aan therapietrouw
- Interacties met andere farmaca
- Toepassing bij kinderen

Het laboratorium KFA van het VUmc is gevraagd om de bloedspiegelbepalingen uit te voeren van de patiënten die in Nederland worden behandeld. Ondanks publicaties van diverse HPLC methoden is er een nieuwe LC-MS/MS methode ontwikkeld, waarbij simultaan Imatinib, Erlotinib en Gefitinib kunnen worden gemeten. Vanwege de intentie

deze methode elders te publiceren volgt hier een verkorte beschrijving.

## Materiaal en methode

Stockoplossingen van imatinib, erlotinib en gefitinib zijn gemaakt in methanol met een base concentratie van 0.1 mg/mL. Vervolgens zijn er 7 kalibratie standaarden gemaakt met plasmaconcentraties van 10, 25, 90, 180, 300, 450, 900 en 5000 µg/L. D8-imatinib is gebruikt als interne standaard. Voor de validatie zijn er op drie niveaus QC monsters gemaakt. Zie ook tabel 1.

Na het toevoegen van interne standaard wordt het monster geextraheerd en vervolgens gecentrifugeerd. De organische bovenlaag wordt afgepipetteerd, onder stikstof drooggedampt, opgelost in mobiele fase en geïnjecteerd met behulp van een Alliance HPLC 2795 module. De fragmentatie wordt uitgevoerd in ESI+ mode met de volgende over-

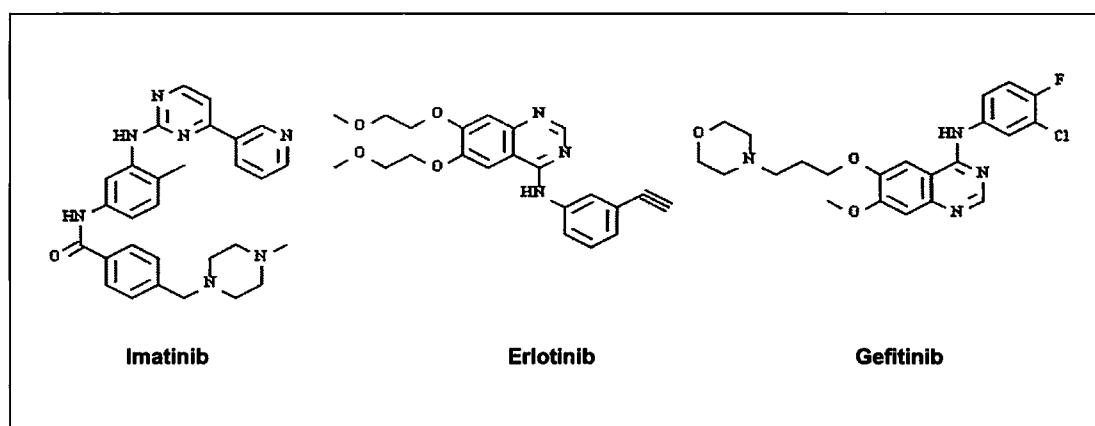
gangen Erlotinib 394.05 → 278.05 m/z, Gefitinib 447.05 → 128.05 m/z, Imatinib 494.10 → 394.00 m/z en D8- Imatinib 502.30 → 394.05 m/z. Hierna vindt detectie en kwantificering plaats met een Waters QuattroMicro MS/MS. Een voorbeeldchromatogram is weergegeven in figuur 3.

## Validatie

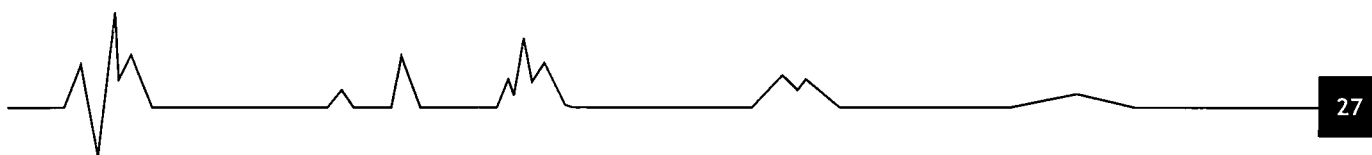
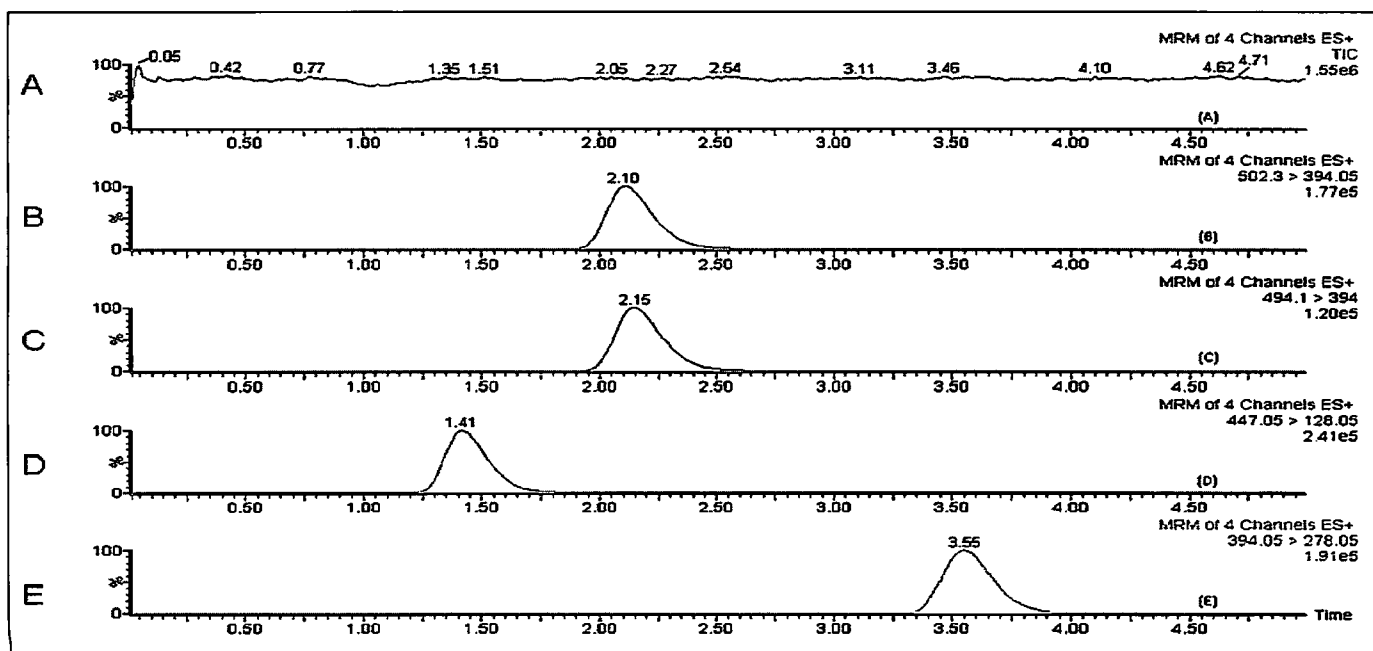
De methode is uitgebreid gevalideerd. Het lineaire bereik is 10 - 5000 µg/L voor Imatinib en 10 - 3000 µg/L voor erlotinib en gefitinib. De inter-en intraday juistheid en precisie van de QC monsters zijn in tabel 1 weergegeven.

De extractieopbrengst is 95%, 92% en 93% voor respectievelijk imatinib, erlotinib en gefitinib. Stabiliteit in plasma is bepaald volgens richtlijnen van USFDA [6]. Er is geen significante degradatie bij -20°C aangetoond. Verder

**Figuur 2.**  
Chemische structuren van Imatinib, Erlotinib en Gefitinib



**Figuur 3.**  
Representatief chromatogram van een blanko monster (A) onder continue infusie van Interne standaard D8-Imatinib(B) Imatinib (C), Erlotinib (D) en Gefitinib (E)



**Tabel 1. Intra-en interdag juistheid en precisie (Acc. = juistheid en RSD is precisie in %)**

Imatinib			Erlotinib			Gefitinib		
Intraday								
Conc.	Acc.	RSD	Conc.	Acc.	RSD	Conc.	Acc.	RSD
77.4	101.2	1.6	79.0	101.7	2.7	84.3	107.0	2.7
348	99.6	1.8	356	102.2	2.2	379	110.0	2.3
3481	96.2	1.8	2608	103.1	1.2	2782	107.6	1.3

Interday								
Imatinib			Erlotinib			Gefitinib		
Conc.	Acc.	RSD	Conc.	Acc.	RSD	Conc.	Acc.	RSD
77.4	97.6	1.6	79.0	98.5	2.2	84.3	103.3	2.0
348	97.0	0.9	356	101.4	2.3	379	106.0	1.7
3481	96.5	0.6	2608	104.2	3.8	2782	104.0	3.2

is de methode kwalitatief en kwantitatief getest op matrix effecten volgens de Matuszewski methode [7-8]. Er is geen significant matrixeffect geconstateerd.

Ten behoeve van externe kwaliteitsbewaking zijn er 15 (onbekende) monsters geanalyseerd over een concentratiegebied van 0-5000 µg/L. De resultaten zijn weergegeven in figuur 4.

## Conclusie en toekomst

Het uitblijven van respons, ernstige bijwerkingen, interacties met andere farmaca, het bevestigen van therapie(on)trouw en behandeling van kinderen zijn redenen om Imatinib spiegels te bepalen. Deze indicaties zijn ook van toepassing op de andere TKI's. Door therapie met TKI's worden sommige vormen van kanker een chronische ziekte, waardoor een langdurige, kostbare therapie noodzakelijk is. In dit geval kan het analyseren van TKI's in vingerprikbloed een patiëntvriendelijke vorm van therapiecontrole zijn. Met het toenemende gebruik, kan de TDM van TKI's een (welkome) aanvulling zijn op het analysepakket van een klinisch farmaceutisch laboratorium. De ontwikkelde LC-MS/MS methode is gevalideerd voor de gelijktijdige bepaling van erlotinib, gefitinib en imatinib in humaan plasma. Deze methode is zowel geschikt voor TDM als voor klinisch onderzoek. Op dit moment ligt er een verzoek voor de spiegelbepaling van Dasatinib. Deze TKI zal samen met Sorafinib, Sunitinib en Nilotinib aan de bestaande methode worden toegevoegd. Het laboratorium KFA van het VUmc wil de ontwikkeling van de TDM van tyrosinekinaseremmers in Nederland ondersteunen.

## Referenties

- [1] E.M. Dettmers, K.J.M. Schimmel. *Pharm. Sel.* 19 (2003) 2-6.
- [2] *Farmacotherapeutisch Kompas* ([www.fk.cvz.nl/](http://www.fk.cvz.nl/))
- [3] Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG et al (2006). "Five-Year Follow-up of Patients Receiving Imatinib for Chronic Myeloid Leukemia". *New England Journal of Medicine* 355 (20): 2408-2417
- [4] Picard, K. Titier, G. Etienne, E. Teilhet, D. Ducint, M. A. Bernard, R. Lassalle, G. Marit, J. Reiffers, B. Begaud, N. Moore, M. Molimard, F.X. Mahon. *Blood* 109 (2007) 3469
- [5] Larson, R.A.; Druker, B.J.; Guilhot, F.; O'Brien, S.G.; Riviere, G.J.; Krahnke, T.; Gathmann, I.; Wang, Y. *Blood*. 2008;111(8):4022-8.
- [6] US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), *Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation*, May 2001.
- [7] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng. *Anal. Chem.* 75 (2003) 3019.
- [8] B.K. Matuszewski. *J. Chromatogr. B.* 830 (2006) 293.

**Figuur 4, resultaten van een ringonderzoek van Imatinib. Het VUmc is NL 01. Resultaten die gemarkeerd zijn met een X zijn verkregen met HPLC, de gevulde markeringen met LC-MS/MS.**

