



Dosage des immunosuppresseurs dans des matrices alternatives au sang

Groupe STP-PT

23 mai 2019

Camille Tron – *Laboratoire de pharmacologie CHU de Rennes*

OBJECTIFS: POURQUOI QUANTIFIER LES IS (ICA) DANS D'AUTRES MATRICES QUE LE SANG TOTAL ?

- ▶ **Inhibiteur de CaN (ICA : tacrolimus, ciclosporine)** : Pierre angulaire du traitement préventif du rejet de greffe
 - ▶ forte variabilité de réponse pharmacologique

Adaptation de posologie
Suivi thérapeutique pharmacologique

Concentration sanguine résiduelle C_{\min}

- ▶ Pratique courante
- ▶ Facile à obtenir
- ▶ Invasif
- ▶ Estimation de l'exposition
- ▶ Marqueur de substitution

Limites

- Survenue de rejets malgré C_{\min} dans l'intervalle thérapeutique
 - Relation C_{sang} - effet mal définie
- C_{\min} reflet imparfait de l'exposition au niveau des cibles tissulaires et cellulaires
 - Paramètre PK qui ne prend pas en compte la variabilité PD

Objectifs : Recherche de nouveaux outils/biomarqueurs de suivi pharmacologique

PLAN

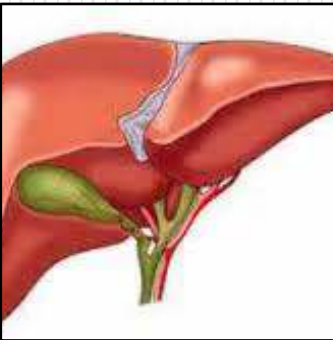
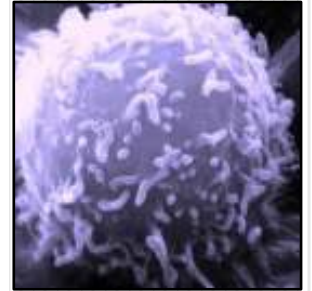


Micro-prélèvements Dosage du tacrolimus

Peu invasif
Prélèvements multiples
(AUC++)

Dosage du tacrolimus Intra- PBMC

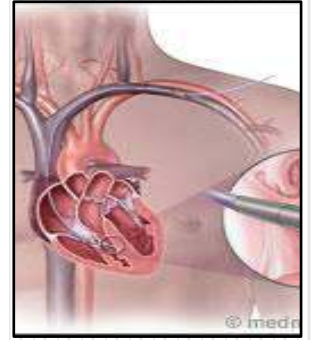
Cellule cible
Concentration mieux
corrélée à l'effet IS



Dosage du tacrolimus dans la bile « péri-tissulaire »

Dosage de la ciclosporine dans les biopsies endo- myocardiques

Tissulaire



TACROLIMUS- MICRO-PRÉLÈVEMENTS

■ Intérêts- contexte :

- Mitra[®] devices (Neoteryx[®]) : Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS[™])
- Peu invasif (++ prélèvements multiples : AUC)
- Prélèvement à domicile -> confort patient
- Stabilité de l'échantillon
- Moins d'effet hémocrite que les DBS
- Prélèvement volume précis (5-30 μ L selon tips)



TACROLIMUS- MICRO-PRÉLÈVEMENTS

■ Challenges analytiques

- 10 μ L de prise d'essai de sang : sensibilité
- Rendement d'extraction
 - Étape de séchage (min 24h)
 - Etape de sonication/agitation
 - extraction plus longue que sur sang « liquide »
 - Pas adapté au rendu du résultat dans la 1/2 journée (sauf si automatisé)
- Effet hématocrite à vérifier
- Stabilité en conditions extrêmes (+60°C / 4°C : boîte au lettre)
- Validation clinique indispensable : corrélation [C] sang veineux / [C] VAMS



neoteryx
The blood micro-sampling innovator

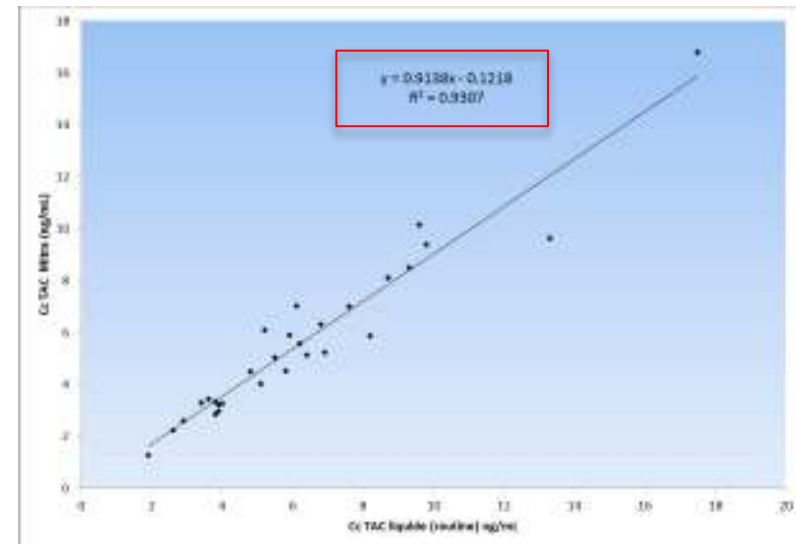
TACROLIMUS- MICRO-PRÉLÈVEMENTS

■ Résultats – études en cours

- Validation analytique (justesse, précision, stabilité, hémocrite effet, effet matrice) : ok EMA
- Validation clinique (30TH) : satisfaisant
- Application clinique :
 - AUC patients néphrologie
 - Projet article 51

Table 3: Within day and between day accuracy and precision of the assay.

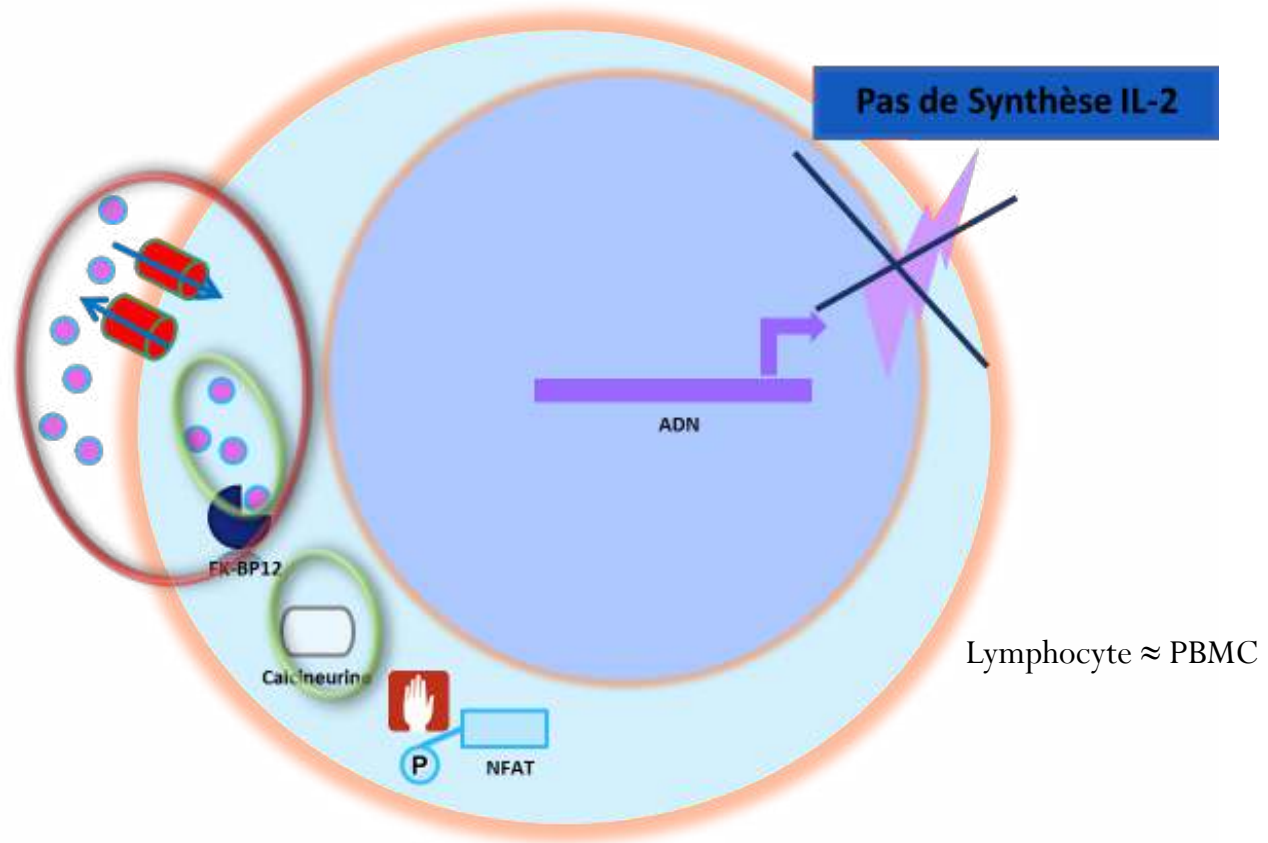
Analyte	Concentration (ng/l)	Within day precision (CV%)	Between day precision (CV%)	Overall Bias (%)
Tacrolimus	LLOQ	4.70	7.44	1.19
	QC low	7.72	11.58	-6.61
	QC medium	5.90	6.85	-6.50
	QC high	10.19	10.19	-4.92



Tron, et al. Validation and clinical application of an ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantification of tacrolimus using volumetric absorptive microsampling. 23ème congrès de la Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique, Lyon, France, 12-14 Juin 2019 (Accepté)

TACROLIMUS- INTRACELLULAIRE

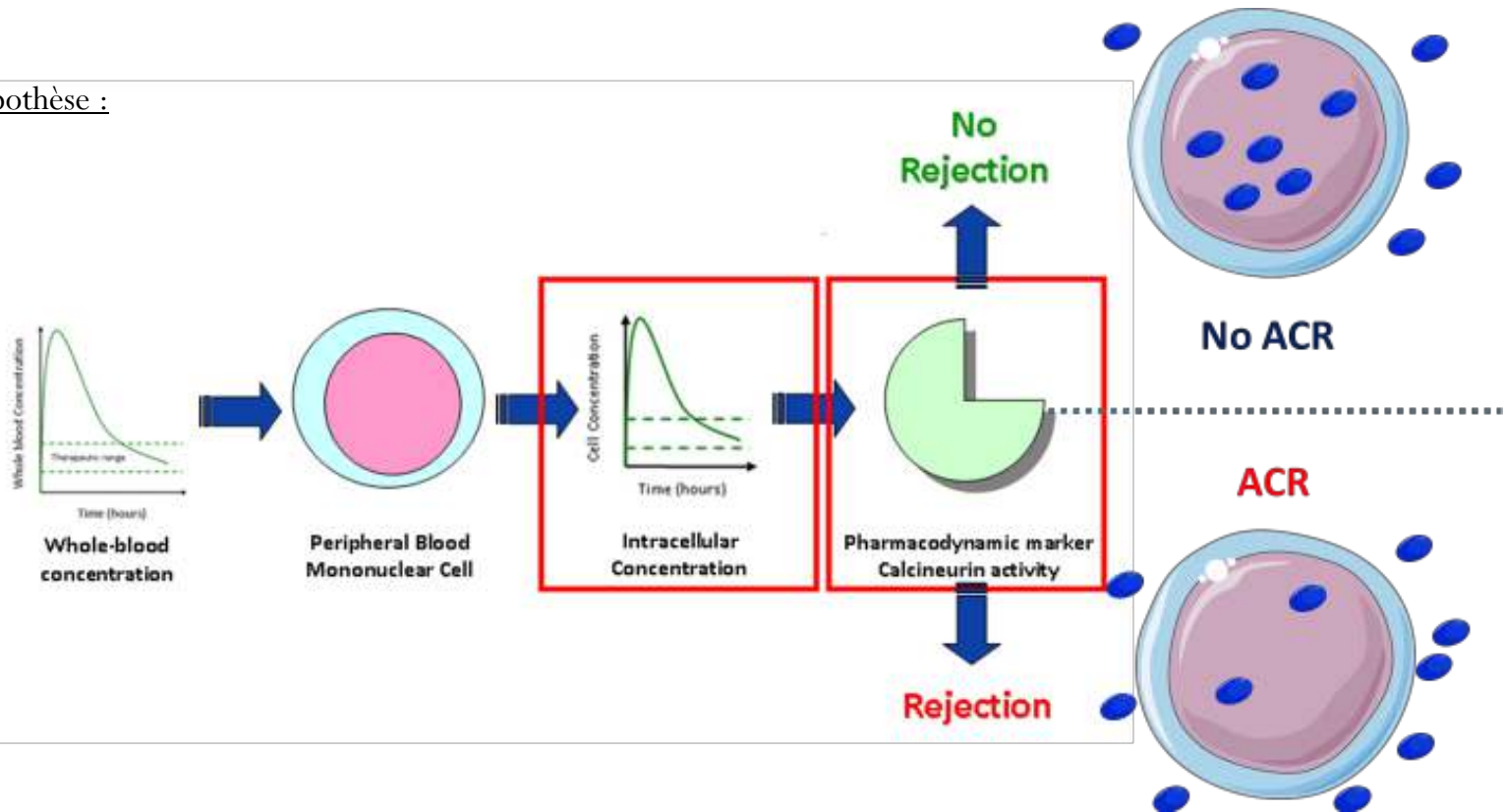
- Intérêts- contexte :



TACROLIMUS- INTRACELLULAIRE

Intérêts- contexte :

Hypothèse :

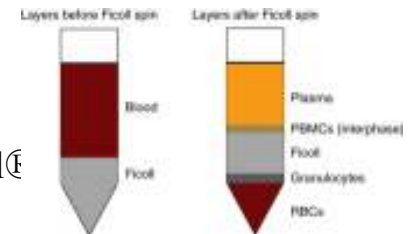


TACROLIMUS- INTRACELLULAIRE

■ Challenges analytiques

■ Workflow :

- Isoler les cellules (PBMC) : gradient de densité/centrifugation (Ficoll[®])
- 3 lavages du culots cellulaires
- Eviter contamination : Lyse des GR + élimination des granulocytes résiduels
- Numération des cellules pour normaliser la Cc/ nombre de cellules
- Aliquotage en suspension cellulaire d'1 million de cellules
- Congélation à -80°C jusqu'à analyse
- Maitrise des échanges par diffusion passive?
 - Pré-analytique à standardiser (étapes de lavage)
- Sensibilité (cc \approx pg/mL)
- De l'extraction des PBMC au résultat de Cc : 1 jours
- Méthode LC/MS \approx Méthode IS de « routine »



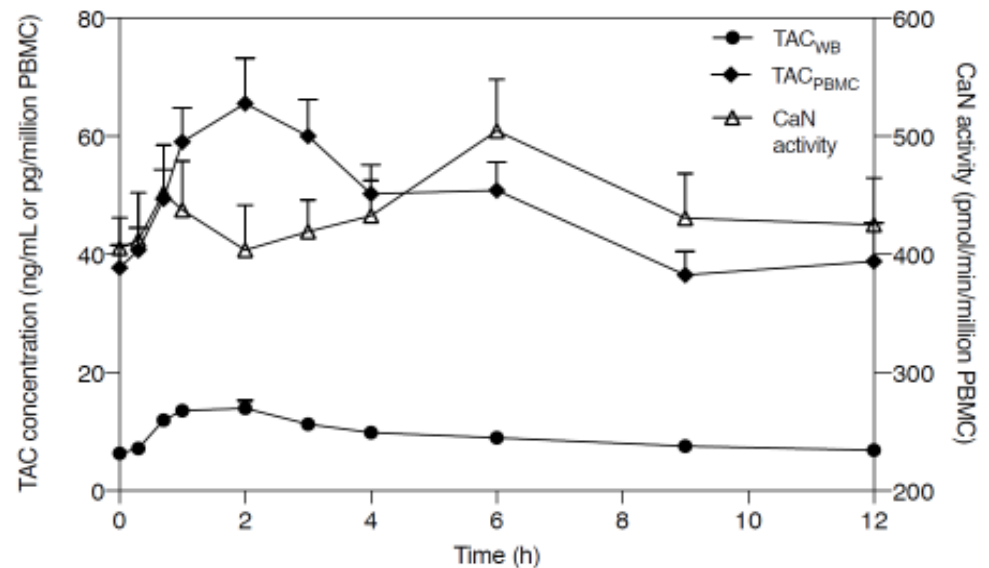
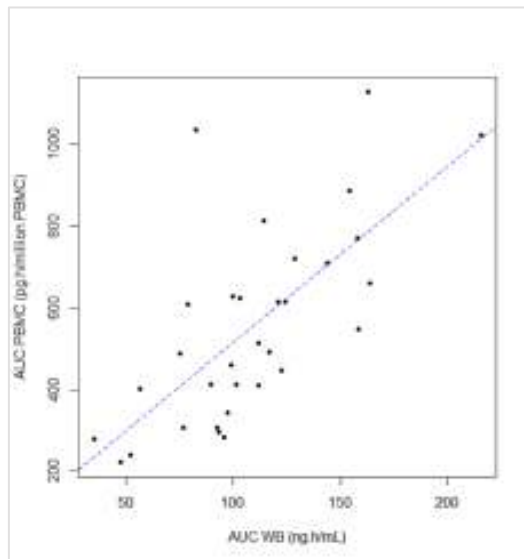
TACROLIMUS- INTRACELLULAIRE

■ Résultats – études en cours :

■ Etude **CYPTAC'H** : relation PK-PG-PD tacrolimus sanguin et intracellulaire

(7-10 jours post transplantation hépatique)

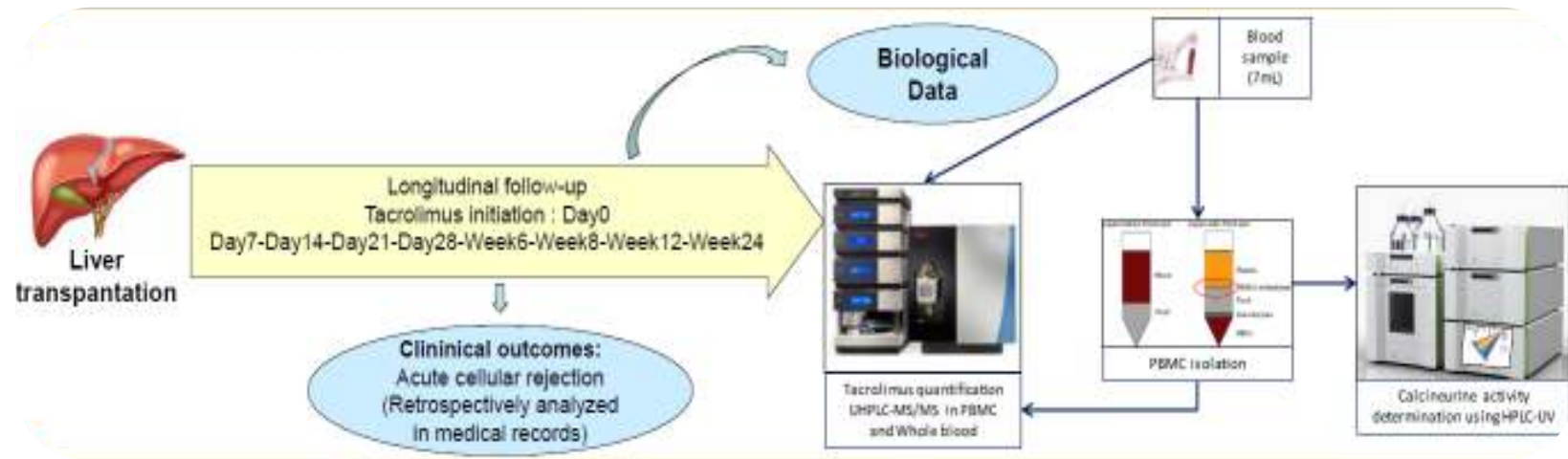
- Faible corrélation AUC WB/AUC PBMC (n=32) ($r^2 = 0,52$, $p < 0,001$)
- Association SNP *ABCB1* et exposition WB et PBMC
- Estimation d'une IC50 intra-PBMC du tacrolimus / calcineurine



TACROLIMUS- INTRACELLULAIRE

■ Résultats – études en cours :

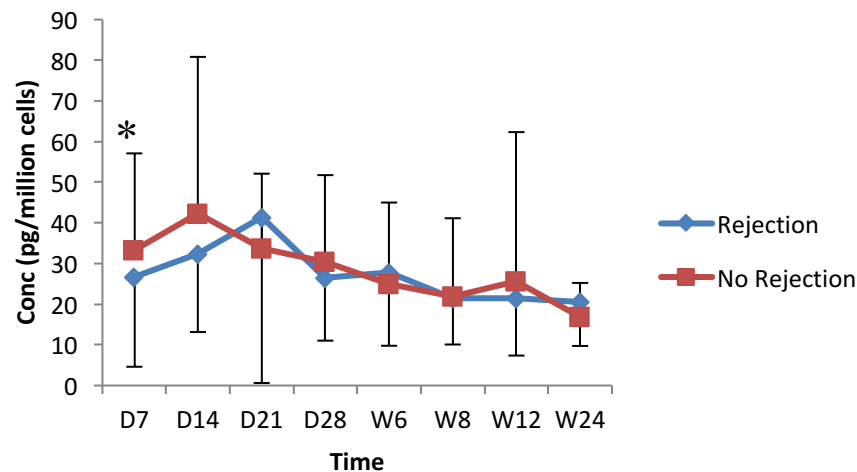
- **Etude OPTILTH (NCT02877628)** : Relation PK-PD du tacrolimus sanguin et intracellulaire chez le patient transplanté hépatique en suivi longitudinal



TACROLIMUS- INTRACELLULAIRE

■ Résultats – études en cours :

- **Etude OPTILTH (NCT02877628)** : Relation PK-PD du tacrolimus sanguin et intracellulaire chez le patient transplanté hépatique en suivi longitudinal
 - Résultats préliminaires sur 85 patients
 - Pas de corrélation claire entre exposition sanguine/activité CaN ou exposition PBMC/activité CaN
 - Concentration intraPBMC à J7 < groupe rejet vs non rejet (Concentration sg non ≠)
(median 20.5 pg/million cells [IQR: 15.2-33.8 pg/million cells] versus 27.5 pg/million cells [IQR: 21.2-43.0 pg/million cells], $p=0.036$)
 - A confirmer sur rejet diagnostiqué par biopsies systématiques



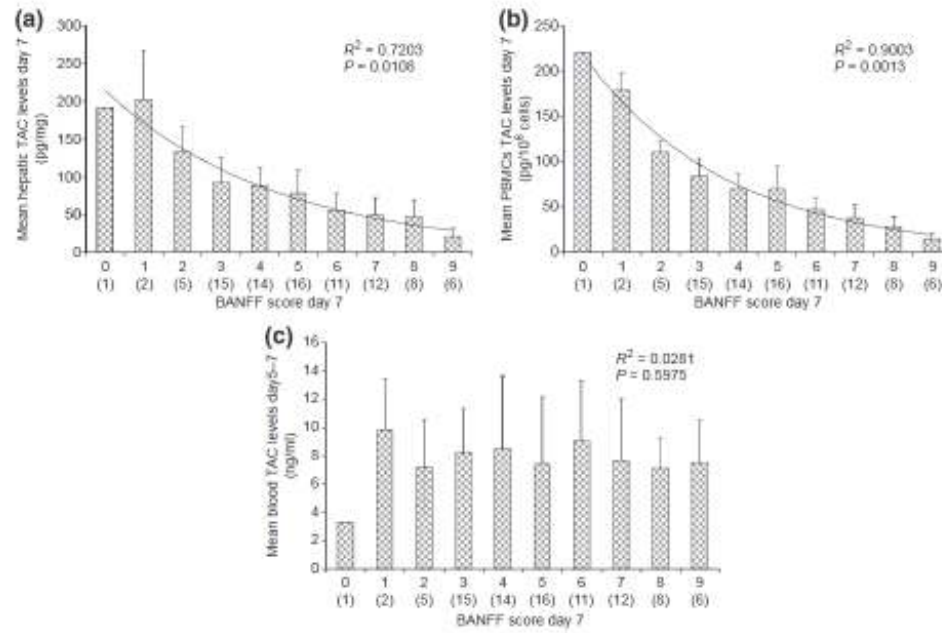
Lemaitre et al. 17th International Congress of Therapeutic Drug Monitoring & Clinical Toxicology, 2019

TACROLIMUS- INTRA-BILIAIRE

■ Intérêts- contexte :

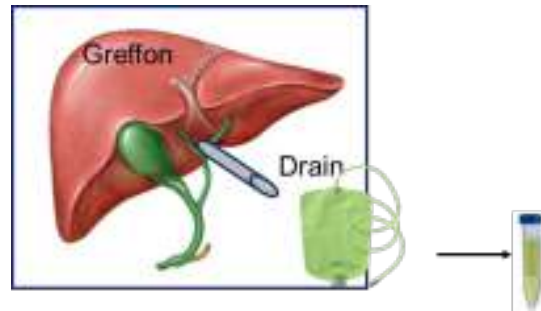
En transplantation hépatique, Capron *et al.* (Transplant Int, 2012) :

- Score histologique de rejet (BANFF) corrélé à C_{PBMC} et $C_{\text{intra-hépatique}}$ mais pas C_{sang}
 - C_{PBMC} et $C_{\text{intra-hépatique}}$ corrélées

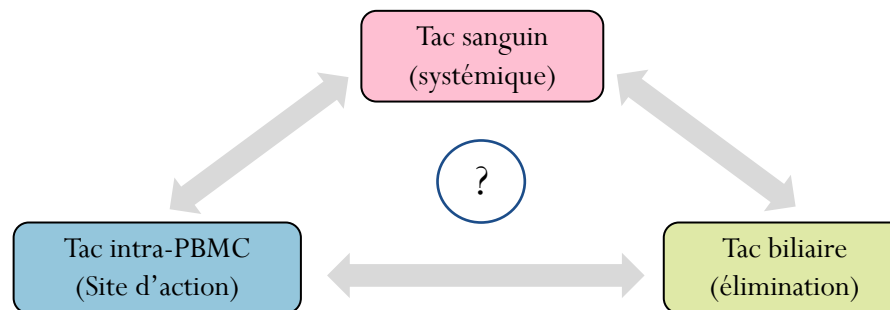


TACROLIMUS- INTRA-BILIAIRE

■ Intérêts- contexte :



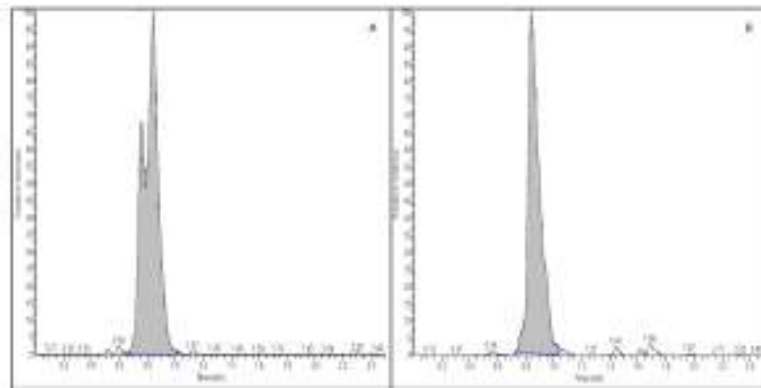
Bile = liquide peri tissulaire émanant directement du foie (non invasif et facile d'accès via drain de Kehr vs biopsies)



TACROLIMUS- INTRA-BILIAIRE

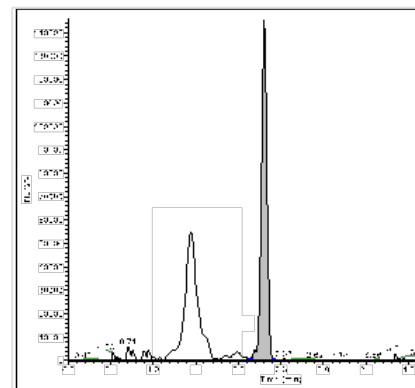
■ Challenges analytiques

- Bile = matrice complexe → précipitation protéique + extraction liquide liquide (acétate d'éthyle)
- Bile « blanche » pour gamme et CQs (patient non traité par Tacro)
- C_{moy} tacrolimus bile = 1,5 ng/mL → sensibilité
- Validation analytique : Conforme aux spécifications EMA
- LLOQ : 0,2 ng/mL, EM absolu mais pas relatif
- Co-élution du tacrolimus avec métabolite dissocié dans spectromètre (échantillons patients traités seulement) → MEV métabolite glucuronide direct
- **Stabilité pré-analytique** : Pas de dissociation de glucuronides dans la poche de recueil → Pas de surestimation de C_{bile} = OK

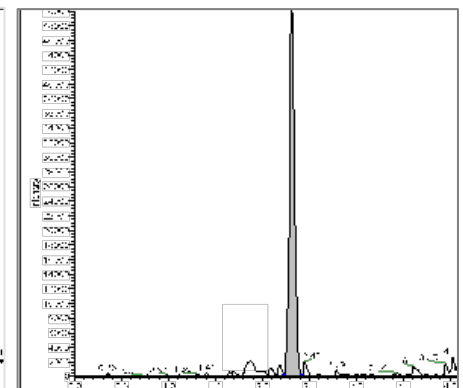


Mise au point : co-élution TAC et TAC-G

Mise au point : Après ajout de glucuronidase



Gradient final : échantillon patient pics séparés

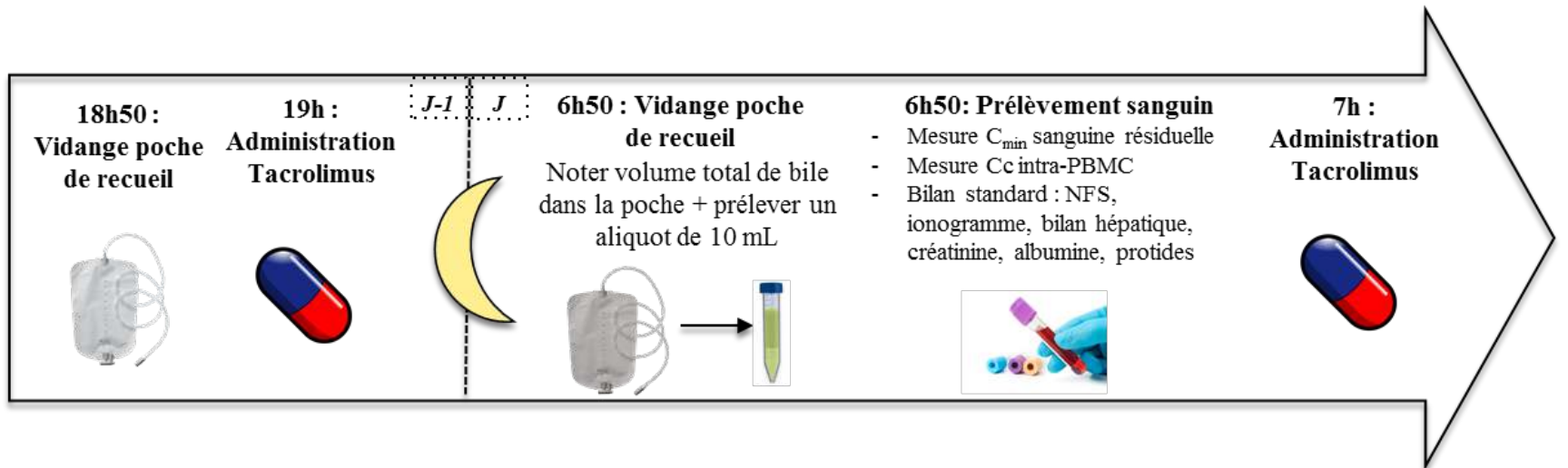


Gradient final : échantillon calibrant

TACROLIMUS- INTRA-BILIAIRE

■ Résultats – études en cours

- **Etude STABILE (NCT02820259):** Suivi thérapeutique pharmacologique des concentrations de Tacrolimus dans la **BILE** chez le transplanté hépatique
 - Prospective, non interventionnelle, monocentrique – 41 sujets
 - Période d'étude : 7j post introduction du tacrolimus
 - Objectifs : évaluer les relations entre
 - TAC_{bileC} et TAC_{PBMC}
 - TAC_{blood} et TAC_{PBMC}
 - TAC_{bileC} et reprise de fonction du greffon/ complications (neurotox)



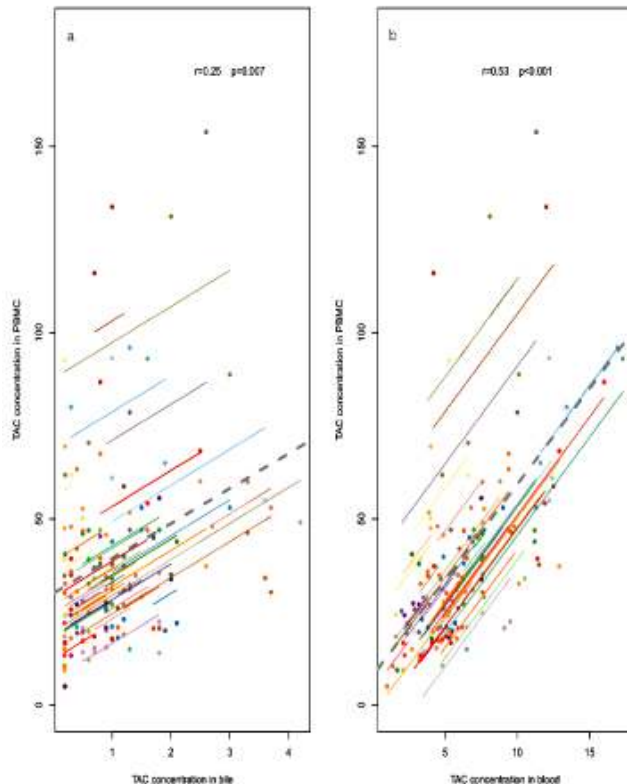
TACROLIMUS- INTRA-BILIAIRE

Résultats – études en cours (Etude STABILE)

TAC_{bileC} was significantly correlated with TAC_{PBMC}
 A better correlation was found between TAC_{PBMC}
 and TAC_{blood}

→ TACbile pas meilleurs BM que TAC sang pour évaluer l'effet IS (TAC PBMC)

Unlike TAC_{blood} and TAC_{PBMC}, TAC_{bileC} was
 significantly correlated with liver graft function
 (factor V ,INR,bilirubin level)



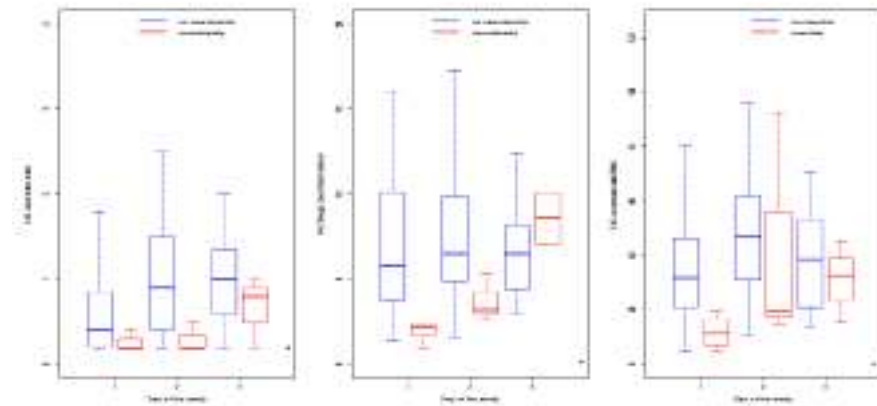
Variables	TAC-bileC		TAC-blood		TAC-PBMC	
	r	p	r	p	r	p
Factor V	0.40	0.009	0.25	0.06	0.08	0.63
INR	-0.31	0.003	0.12	0.08	0.06	0.55
Prothrombin Time	0.36	<0.001	-0.07	0.35	-0.004	0.98
Total bilirubin level	0.21	0.01	0.12	0.10	-0.01	0.91
ALP	0.19	0.03	-0.04	0.60	-0.16	0.08
GGT	0.24	0.004	-0.14	0.04	-0.20	0.03
AST	-0.17	0.052	0.24	<0.001	0.14	0.13
ALT	0.11	0.17	0.25	<0.001	0.20	0.03

TACROLIMUS- INTRA-BILIAIRE

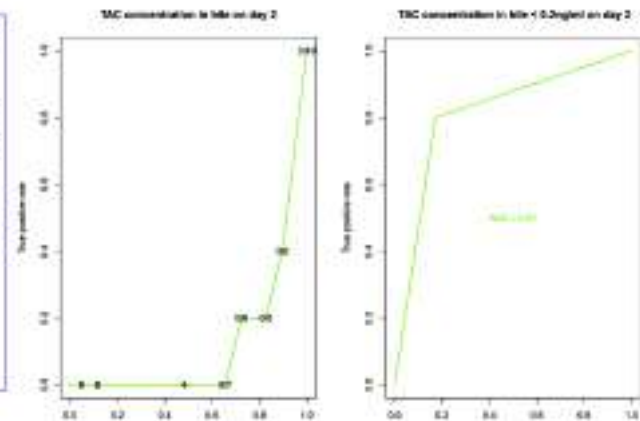
■ Résultats – études en cours (Etude STABILE)

Résultats à confirmer sur plus de sujets
(STABILE 2)

TAC_{bileC} was significantly lower in patients presenting neurological toxicity (5/41) ($p < 0.001$) while having TAC_{blood} within the therapeutic range.



ROC curve analysis showed that a TAC_{bileC} lower than 0.20ng/ml on day 2 after TAC initiation was a good predictive marker of occurrence of neurotoxicity (AUC=0.81).



CICLOSPORINE – INTRA BEM

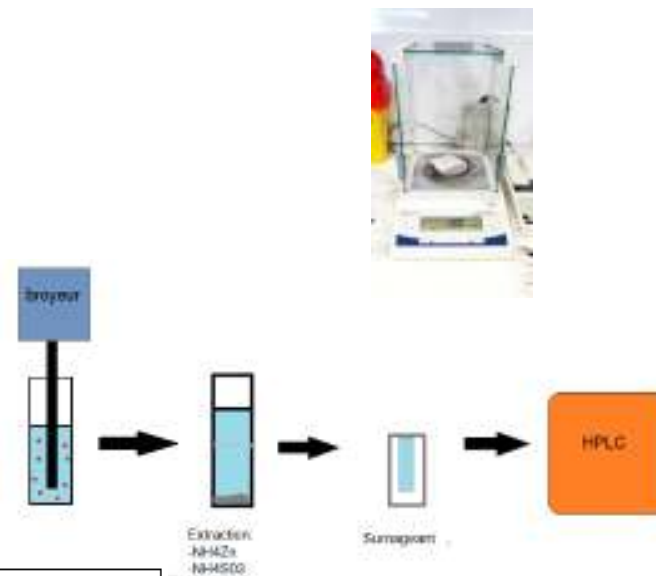
■ Intérêts- contexte :

- Dosage de la ciclosporine dans les biopsies endomyocardiques des greffés cardiaques
- Dosage dans l'organe cible
- Biopsies facile d'accès : suivi protocolisé (BEM systématiques)
- Transplantation hépatique et tacrolimus: Correlation entre score histologique de rejet (BANFF) et C_{PBMC} et $C_{\text{intra-hépatique}}$ mais pas à C_{sang} + Correlation entre C_{PBMC} et $C_{\text{intra-hépatique}}$ - Capron et al. (Transplant Int, 2012) → A-t-on les mêmes relations avec la ciclosporine en transplantation cardiaque?
- Etude pilote/Faisabilité : Robertsen et al. Transplant Res. 2013 : 10 sujets

CICLOSPORINE – INTRA BEM

■ Challenges analytiques

- Mise au point de la méthode de dosage dans les BEM
- Matrice blanche = cœur de porc frais « aliquoté » congelé (pesé précise - masses des aliquots.)
- Broyat de la BEM avant extraction
- Extraction = méthode IS sang adaptée
- Pas d'effet matrice (absolu)
- Méthode validée



Concentration théorique en pg/mg	125		500		2000	
	Echantillon B (eau)	Échantillon A (biopsie)	Echantillon B (eau)	Échantillon A (biopsie)	Echantillon B (eau)	Échantillon A (biopsie)
Aire du pic de CsA	140213	150002	397019	425994	2049350	2268430
Ecart-type	24555	36092	84481	73843	282748	251091
CV(%)	17,5	24,1	21,3	17,3	13,8	11,1
Effet matrice = MF (%)	6,98		7,3		10,7	
Test Mann-Whitney wilcoxon	p=0,59		p=0,59		p=0,48	

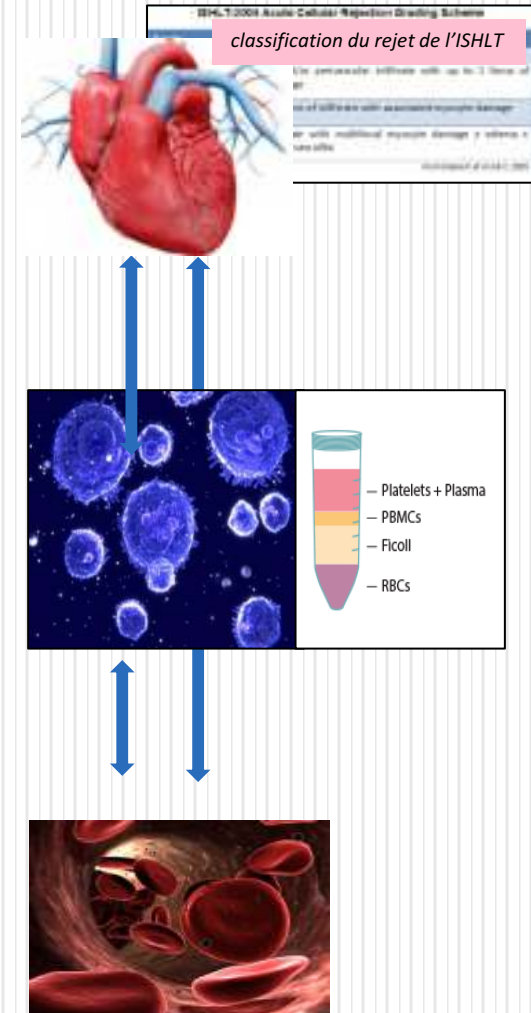
Tron et al. Validation of an ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantification of cyclosporine in endomyocardial biopsies. 23ème congrès de la Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique, Lyon, France, 12-14 Juin 2019

CICLOSPORINE – INTRA BEM

■ Résultats – études en cours :

■ Etude INTRACAR :

- Objectif = étudier les relations entre les concentrations en ciclosporine dans le sang, dans les BEM, dans les PBMC et, la survenue d'un rejet de greffe aigu évalué par anatomo-pathologie
- Déterminer si les concentrations intra-BEM des ICA peuvent être reflétées par les concentrations intra-PBMC (marqueur plus simple d'accès et peu invasif).
- Suivi longitudinal $[C]_{\text{ciclo}}$ sang+PBMC+BEM et rejet sur 6 mois
- 45 sujets
- En cours de dépôt réglementaire



TAKE HOME MESSAGES

- LES TRAITEMENTS PAR ICA PEUVENT ENCORE ÊTRE OPTIMISÉS GRÂCE À DE NOUVEAUX BIOMARQUEURS PHARMACOLOGIQUES
- FAISABILITÉ ANALYTIQUE DES DOSAGES EN MATRICE ALTERNATIVE AU SANG VEINEUX (LC/MS)
- MICROPRÉLÈVEMENT = OUTIL D'AVENIR DU TDM POUR MIEUX ÉVALUER L'EXPOSITION
- DOSER LES ICA DANS LEUR CELLULES CIBLES ET TISSUS CIBLES → MEILLEUR RELATION PK/PD QUE DANS LE SANG TOTAL?
- RELATION CONCENTRATION/EFFICACITÉ ET CONCENTRATION/ TOXICITÉ À EXPLORER VS. SANG
- BIOMARQUEURS PRÉVENTIFS EN COMPLÉMENT DU TDM SANGUIN : IDENTIFIER LES PATIENTS ÉLIGIBLES À UNE MINIMISATION OU UNE INTENSIFICATION AVANT ÉVÈNEMENT CLINIQUE
- MÉDECINE PERSONNALISÉE

Merci de votre attention