

## 건강한 한국인 지원자에서 사이클로스포린(Cyclosporine) 투약 후 칼시뉴린(Calcineurin) 활성도 측정법의 적용

경북대학교 임상시험센터 및 경북대학교 대학원 의과학과

임미선, 성숙진, 박정현, 서정주, 이주미, 이해원, 윤영란

=Abstract=

### Application of Method to Measure Calcineurin Activity in Healthy Human Volunteers after Cyclosporine Administration

Mi-Sun Lim<sup>1,2</sup>, Sook Jin Seong<sup>1,2</sup>, Jeong Hyeon Park<sup>1,2</sup>, Jeong Ju Seo<sup>1,2</sup>, Joomi Lee<sup>1,2</sup>,  
Hae Won Lee<sup>1,2</sup>, Young Ran Yoon<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Clinical Trial Center, Kyungpook National University Hospital

<sup>2</sup>Department of Biomedical Science, Kyungpook National University Graduate School

**Background:** Calcineurin-inhibitors have wide inter-individual variation in drug response. Although therapeutic drug monitoring has been conducted to optimize personalized regimen, toxicity or rejection may occur. In this study, pharmacologic effect was evaluated by measuring calcineurin activity in peripheral blood after administration of a single dose of cyclosporine in healthy volunteers.

**Methods:** 7 healthy Korean male subjects received cyclosporine 200 mg and blood samples were drawn immediately before and at 1, 1.5, 4, 6, 12 h after dosing to measure calcineurin activity. The blood concentrations of cyclosporine were determined for 24 hours. Calcineurin activity assay was done with Calcineurin cellular activity assay kit (Calbiochem, USA). Frozen whole blood samples in liquid N<sub>2</sub> were thawed and lysed with lysis buffer. 50 µL of phosphate standard curve samples were added to each well of a 96-well plate and 10 µL of diluted lysate were added to the well with RII phosphopeptide substrate. After incubating for 30 min, reaction was terminated by adding 100 µL GREEN<sup>TM</sup> reagent. Absorbance was read at 620 nm using spectrophotometer. We evaluated percent change in calcineurin activity from baseline level in relation to the lowest level.

**Results:** Decrease of calcineurin activity was confirmed after cyclosporine administration (mean ± SD: 58.9 ± 48.6 (%)). Significant correlation was shown between calcineurin activity change and pharmacokinetic parameters (AUC<sub>last</sub>: r = 0.834, p value = 0.01, C<sub>max</sub>: r = 0.774, p value = 0.02).

**Conclusion:** In this study, we confirmed the pharmacologic effect and its correlation with pharmacokinetics after administration of a single dose of cyclosporine by measuring calcineurin activity in peripheral blood in healthy volunteers.

**Key words:** Calcineurin activity, Immunosuppressants, Pharmacodynamics, Pharmacokinetics, Cyclosporine

---

교신저자: 윤영란

소 속: 경북대학교병원 임상시험센터 및 경북대학교 대학원 의과학과

주 소: 대구광역시 중구 동인 2가 101번지 (우 700-422)

전화번호: 053-420-4950, 팩스: 053-422-4950, E-mail: yry@knu.ac.kr

접수일자: 2011. 11. 25. 수정일: 2011. 12. 13. 게재확정일: 2011. 12. 17.

## 서 론

칼시뉴린은  $Ca^{2+}$ -calmodulin에 의해 활성화되는 단백질 분해효소로 신경 조직에 많이 분포하여 칼시뉴린으로 명명되었다.<sup>1)</sup> 싸이클로스포린이나 타크로리무스와 같은 면역억제제와 세포질 단백질인 Immunophilin의 복합체가 칼시뉴린을 억제한다는 사실이 밝혀지면서<sup>2,3)</sup> 칼시뉴린이 T 세포의 활성화에 중요한 역할을 한다는 것이 알려지게 되었다.<sup>4,6)</sup> 칼시뉴린은 T 세포에서 NFAT (Nuclear Factor of Activated T cell)를 탈인산화시켜 핵 안으로 이동하게 한 후 전사인자로 작용하여 IL-2를 생성을 증가시키도록 하는 기전을 통해 T 세포를 활성화시킨다.<sup>7-11)</sup>

칼시뉴린 억제제는 장기 이식 환자에 있어서 면역억제를 통한 이식 장기의 보존을 위해 중요한 약물로 사용되고 있다. 칼시뉴린 억제제는 약물 반응과 독성의 발현에 있어서 개인간 차이가 상당히 크므로 치료적 약물 농도 모니터링이 일반적으로 시행되고 있다. 그러나 약물 농도가 충분히 높게 유지됨에도 불구하고 이식 거부반응이 나타나거나, 약물농도가 낮아도 독성이 나타나는 경우들이 보고되면서 약물농도 모니터링만으로는 개인별 적정 약물 사용의 한계가 있음이 보고되고 있다.<sup>12,13)</sup> 따라서 약효의 직접적인 측정을 통하여 개인별 적정 약물 용법을 결정하기 위한 약력학 모니터링이 대안으로 제시되고 있다.

본 연구에서는 건강한 성인을 대상으로 싸이클로스포린 200 mg 단회 투여 후 칼시뉴린 활성화도의 변화를 측정하여, 본 칼시뉴린 활성화 측정법이 약물 효과의 모니터링에 적합한 방법으로 사용될 수 있을 것인가를 확인하고자 시행하였다.

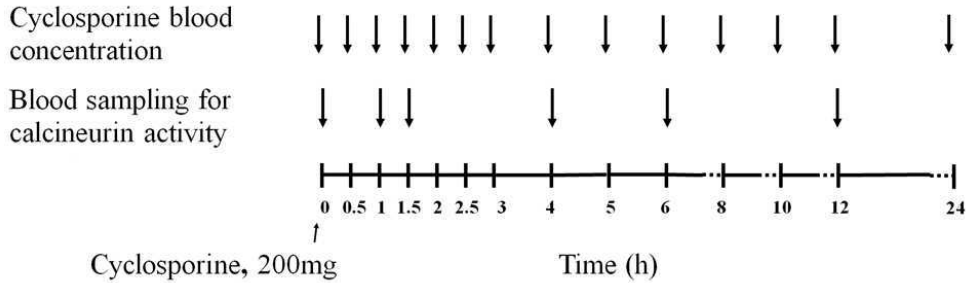
## 연구대상 및 방법

### 1. 연구대상 및 연구설계

본 연구에는 20세에서 55세 사이의 건강한 한국인 남성 피험자 7명을 대상으로 진행하였다. 모든 피험자는 신체검사와 문진, 혈액학검사, 혈액화학검사, 요검사 등 실험실 검사, 심전도 검사 결과로 건강상태를 확인하였다. 투약 2주 이내에 전문의약품이나 한약제제를 복용하였거나 1주 이내에 어떤 일반의약품이라도 복용한 경우, 지속적으로 과도한 음주를 한 경우(21 unit/week 초과), 하루 10개피 이상의 흡연을 하는 경우 등은 피험자 선정에서 제외하였다.

모든 피험자는 10 시간의 공복 이후에 200 mg의 산디문뉴오랄® 내복액(Sandimmun Neoral Emulsion)을 200 mL의 물과 함께 경구로 복용하도록 하였다. 칼시뉴린 활성화도 측정을 위한 혈액 샘플은 약물투여 직전 및 약물투여 후 1, 1.5, 4, 6, 12 시간 이후에 이루어졌고 약물 농도 측정을 위한 혈액 샘플은 약물투여 직전 및 약물투여 후 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 24 시간 이후에 이루어졌다. 칼시뉴린 활성화도 측정 및 싸이클로스포린 혈중 농도 측정을 위한 채혈 시점은 Figure 1에서 나타내었다.

본 연구는 경북대학교병원 임상시험심사위원회의 승인을 받은 후 헬싱키 선언(Helsinki declaration)과 의약품임상시험 관리기준(Korean Good Clinical Practice, KGCP)의 규정을 준수하여 시행하였다. 모든 피험자는 임상시험과 관련된 모든 내용에 대해 설명을 듣고 자필 서명한 임상시험 참가 동의서를 제출하였으며 임상시험의 전 과정은 경북대학교병원 임상시험센터에서 진행되었다.



**Figure 1.** Scheme of the blood sampling for cyclosporine concentrations and calcineurin activities.

## 2. 칼시뉴린 활성도 측정 방법

칼시뉴린 활성도는 Calcineurin cellular activity assay kit (Calbiochem, USA)를 이용하여 경북대학교병원 임상시험센터 분석실에서 측정하였다. 전혈에서 추출한 세포 용해물에 존재하는 칼시뉴린 포스파타제가 RII phosphopeptide 기질과 반응하게 되는데 이때 기질로부터 해리되는 free phosphate을 염색하여 흡광도를 측정한 후 표준검량선에 의해 계산된 free phosphate 농도값을 구하여 혈중 칼시뉴린 활성도를 측정하였다. 채혈 직후 액체 질소에 급랭시켜  $-80^{\circ}\text{C}$  이하에 보관한 전혈 샘플 50  $\mu\text{L}$ 에 lysis buffer 150  $\mu\text{L}$ 를 넣고 3번의 해동 및 냉동의 과정을 거쳐 상층액 100  $\mu\text{L}$ 를 준비하였다. Phosphate 표준검량선 측정을 위한 농도를 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.063, 0.031, 0 nmol로 준비하였다. 96-well plate에 phosphate 표준검량선 농도 별 샘플을 50  $\mu\text{L}$ 씩 분주하였고 미리 준비된 RII phosphopeptide 기질 용액을 분주해둔 well에 전혈 용해물을 10  $\mu\text{L}$ 를 분주하였다. 상온에서 30분간 반응을 시킨 후 GREEN reagent 100  $\mu\text{L}$ 를 첨가하여 반응을 종결시켰다. 다시 상온에서 30분간 둔 후 색이 변한 것을 확인 하고 spectrometer (FLUOstar Optima, BMG

LABTECH)로 620 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준검량선의 직선성은  $r^2$ 가 0.99 이상으로 만족되었다. 정밀도(precision)와 정확도(accuracy)는 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.063, 0.031 nmol 각 농도 별로 3일 동안 2회에 걸쳐 총 6회 반복 측정하여 확인하였다. 정밀도는 CV %가 각각 8.1 %, 3.9 %, 4.2 %, 3.9 %, 1.6 %, 24 %, 2.8 %이었다. 0.065 nmol에서는 한 포인트의 이상치로 인해 CV % 값이 크게 계산되었으므로 전체적으로 영향을 미치지 않는 것으로 받아들였다. 정확도는 각 농도 수준에서 시료의 평균값이 실제 값의 25 % 이내로 측정되었다. 검량선의 직선성을 기준으로 값을 채택하였기에 정확성은 문제삼지 않았다.

## 3. 약물농도 측정 및 약동학적 분석방법

싸이클로스포린의 약물농도는 경북대학교 임상시험센터 분석실에서 전혈을 이용하여 LC-MS/MS로 측정하였다. 채혈 후  $-80^{\circ}\text{C}$  이하에서 보관한 전혈을 상온에서 녹인 후, 전혈 200  $\mu\text{L}$ 에 내부표준물질인 ascomycin (1000 ng/mL) 20  $\mu\text{L}$ , 0.1 M zinc sulfate buffer 100  $\mu\text{L}$ , ethylacetate 1.5 mL 첨가하여 vortex mixer에서 5분간 혼합한 용액을 13,200 rpm에서 2분간 원심분리 하였다. 유기층

1.4 mL을 취하여 깨끗한 2 mL의 PP재질의 tube에 옮겨 담은 후, SpeedVac를 이용하여 40분 동안 증발건조 하였다. 잔사에 0.1 % formic acid solution / acetonitrile - 50/50, v/v 100  $\mu$ L을 가하여 vortex mixer로 1분간 혼합하여 재용해한 후 Nylon 0.22  $\mu$ m filter tube로 옮겨 13,200 rpm에서 5분간 원심 분리하였다. 여과액을 vial에 담은 후 10  $\mu$ L를 분석을 위해 injection하였다. 약물 농도 정량은 API 5000TM LC-MS/MS system (Applied Biosystems)을 이용하여 multiple reaction monitoring 방법으로 수행하였다. Zorbax Eclipse XDB-CN columns (3.5  $\mu$ m, 2.1 mm  $\times$  100 mm; Agilent Technologies, Santa Clara, CA)을 사용하였고 0.1 % formic acid buffer/0.1 % formic acid in acetonitrile at 60/40 (v/v)를 이동상으로 사용하였다. 최소정량한계농도(LLOQ)는 2 ng/mL이었고 표준검량선의 결정계수( $r^2$ )는 0.99 이상이었고 전체적인 정확도는 90.3 - 108.1 %이었고 정밀도는 전체 농도에서 15 % 미만이었다.

#### 4. 약동학 파라미터 산출 및 통계분석

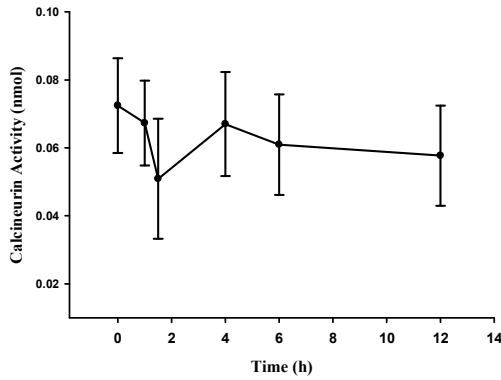
약동학적 파라미터는 WinNonlin® (ver. 5.2; Pharsight, Mountain View, CA) 프로그램을 사용하여 비구획모형(noncompartmental model)을 적용하여 산출하였다. 최고혈장농도( $C_{max}$ )와 최고혈장농도 도달시간( $T_{max}$ )는 관측된 값을 채택하였고, 마지막 농도가 측정된 시간까지의 혈장농도-시간 곡선하 면적( $AUC_{last}$ )은 선형 사다리꼴 계산법(linear trapezoidal method)으로 산출하였다. 최종소실속도상수( $ke$ )는 혈장농도-시간의 log-linear 곡선으로부터 추정하였고, 최종 소실 반감기( $t_{1/2}$ )는  $\ln(2)/ke$ 로 구하였다. 약동학적 파라미터와 시

간대별 칼시뉴린 활성도는 평균  $\pm$  표준편차로 나타내었다. 칼시뉴린 활성도의 퍼센트 변화값과 약동학적 파라미터의 관련성을 상관관계 분석을 통해 상관계수로 나타내었고  $p$ -value 0.05 미만을 통계적으로 의미있는 결과로 채택하였다.

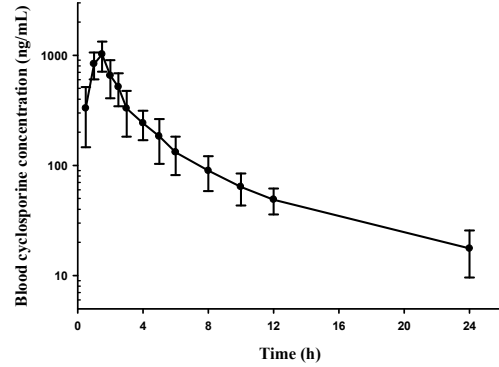
### 결 과

본 연구 결과 7명의 피험자에서 싸이클로스포린 투여 후 칼시뉴린 활성도가 감소하는 것이 확인되었다. 시간에 대한 칼시뉴린 활성도 변화의 평균 및 표준편차를 Figure 2에서 나타내었다. 싸이클로스포린 투여 후 1.5 시간이 지난 시점에서 칼시뉴린 활성도가 최저로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 싸이클로스포린의 약효를 판정하기 위해 싸이클로스포린 투약 전 측정된 칼시뉴린 활성도 기저치와 투약 이후 칼시뉴린 활성도 최저치 사이의 퍼센트 변화(% change)를 '(칼시뉴린 활성도 기저치 - 칼시뉴린 활성도 최저치)/칼시뉴린 활성도 기저치'의 공식으로 산출하였다. 칼시뉴린 활성도는 기저치에 비해 평균 58.9 % 감소했다(CV: 48.6 %). 각 피험자별 칼시뉴린 활성도의 기저치로부터 최저치 사이의 퍼센트 변화는 각 90.8 %, 27.7 %, 50.1 %, 34.1 %, 90.5 %, 84.4 %, 34.8 %로 나타났다.

시간대별 혈중 싸이클로스포린의 농도의 평균 및 표준편차는 Figure 3에서 나타내었다. 시간대별 혈중 싸이클로스포린 농도를 이용하여 산출한 약동학적 파라미터의 평균 및 표준편차는  $C_{max}$  (ng/mL)가  $1025.9 \pm 308.4$ ,  $T_{max}$  (h)가 1.4 (1.0 - 1.5),  $AUC_{last}$  (ng·h/mL)가  $3302.0 \pm 836.1$  그리고  $t_{1/2}$  (h)가  $7.0 \pm 2.1$  로 나타났다. 개인별 칼시뉴린 활성도 퍼센트 변화와  $AUC_{last}$ , 칼시뉴린 활성도 퍼센트 변화와  $C_{max}$  는 각각 통계적



**Figure 2.** Plot of calcineurin activities (mean, SD) versus time after administration of oral cyclosporine 200 mg (n=7).



**Figure 3.** Plot of cyclosporine concentration (mean, SD) versus time after administration of oral cyclosporine 200 mg (n=7).

으로 유의한 양의 상관관계를 보였고 이 내용은 Figure 4에 나타내었다. 칼시뉴린 활성도 퍼센트 변화와  $AUC_{last}$ 의 상관관계는  $r = 0.834$ ,  $p$  value = 0.01으로 나타났고, 칼시뉴린 활성도 퍼센트 변화와  $C_{max}$ 의 상관관계는  $r = 0.774$ ,  $p$  value = 0.02으로 나타났다.

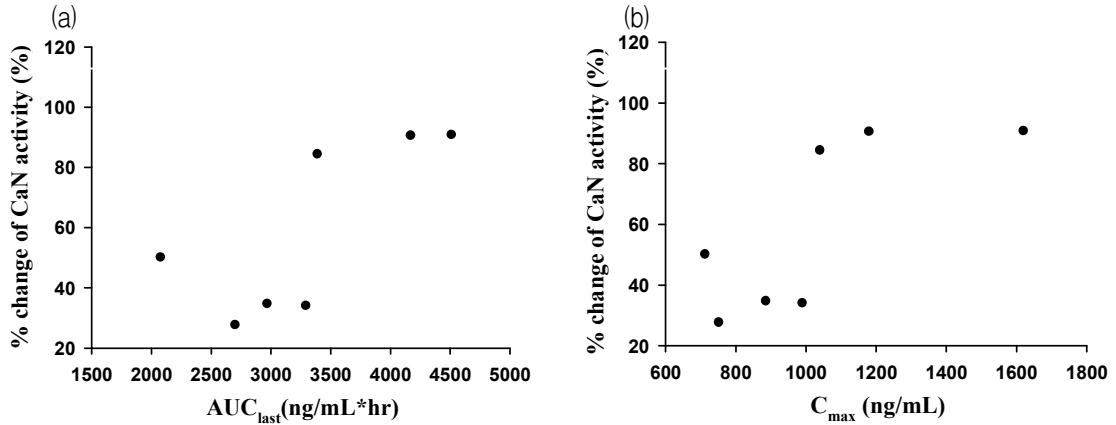
모든 피험자에서 싸이클로스포린 단회 투여 후 중대한 이상반응은 관찰되지 않았다.

## 고 찰

본 연구 결과 건강한 성인에게 싸이클로스포린을 단회 투여한 경우 투여 전에 비해 말초 혈액의 칼시뉴린 활성도가 감소하는 것을 모든 피험자에게서 확인하였고 기저치에 비해 평균 58.9% 감소한 것이 확인되었다. 또한 각 개인의 칼시뉴린 활성도의 퍼센트 변화와  $AUC_{last}$ , 칼시뉴린 활성도의 퍼센트 변화와  $C_{max}$ 는 각각 통계적으로 유의한 양의 상관관계가 있음을 관찰하여 말초 혈액에서 측정된 칼시뉴린 활성도가 싸이클로스포린의 약물농도와 직접적인 관련성이 있음을 확인할 수 있었다. 싸이클로스포린의 약동학적 개인

차의 모니터링을 위한 최적의 약물농도 측정 시점은 투약 후 2시간이라는 것이 잘 알려져 있다.<sup>14,15)</sup> 싸이클로스포린의 흡수가 주로 이루어지는 투약 후 4시간 동안이 약동학적 개인간의 차이가 가장 크게 나타나는 시기인데, 이 기간의 혈장농도-시간 곡선하 면적( $AUC_{0-4}$ )을 예측할 수 있는 단일 약물농도 측정 시점이 바로 투약 후 2시간인 것과 투약 후 2시간 시점의 농도가 임상적 결과를 예측하는데 유용하다는 사실이 다양한 장기 이식 환자를 대상으로 한 연구에서 증명되었다.<sup>15)</sup> 본 연구에서 싸이클로스포린 투약 후 시간 별 칼시뉴린 활성도의 평균 변화에서 가장 낮은 수치는 투약 후 15시간이 되는 시점에서 나타났다. 투약 후 2시간째 칼시뉴린 활성도는 측정하지 않았기 때문에 직접적인 비교는 불가능 하지만 본 연구 결과 2시간에 인접한 15시간 전후에 칼시뉴린 활성도가 가장 낮다는 것을 확인하였다.

건강한 성인을 대상으로 24시간 동안의 칼시뉴린 활성도 측정을 통한 칼시뉴린 활성도의 일주기리듬을 확인하는 연구에서 24시간 중 칼시뉴린 활성도의 최고치와 최저치의 차이는 약 10%가량 나타나는 것으로 보고되었다.<sup>16)</sup> 또 다른 연구



**Figure 4.** Plot of percent change of calcineurin activity (%) versus  $AUC_{last}$  (ng/mL\*hr) (a) and plot of percent change of calcineurin activity (%) versus  $C_{max}$  (ng/mL) (b) after administration of oral cyclosporine 200 mg (n=7).

에서 신 이식 환자를 대상으로 타크로리무스 투약 후 칼시뉴린 활성도를 측정된 결과 칼시뉴린 활성도의 퍼센트 변화(투약 전 기저치와 투약 후 최저치의 비교)가 약 60 % 가량 나타나는 것으로 보고되었다.<sup>17)</sup> 본 연구 결과 58.9 %의 칼시뉴린 활성도 감소는 기존 보고된 연구 결과와 비교할 때 싸이클로스포린 200 mg 단회 투여로도 정상적인 칼시뉴린 활성도의 일주기 리듬을 벗어난 칼시뉴린 활성도의 즉각적인 감소를 확인할 수 있었다. 본 연구에서 칼시뉴린 활성도의 퍼센트 변화에 대한 개인간의 변이는 CV 48.6 %로 기존에 보고된 것과 같이 상당히 차이가 컸다.<sup>18)</sup> 따라서 본 연구에 참여한 피험자 수 7명으로는 위의 결론을 확증하기에 한계가 있으므로 더 많은 피험자에게서 연구 결과를 검증할 필요성이 있다.

싸이클로스포린과 타크로리무스와 같은 칼시뉴린 억제제의 약효를 모니터링 하기 위한 방법은 크게 두 가지로 나누어진다.<sup>19,20)</sup> 한 가지는 칼시뉴린 억제제에 비 특이적인 면역력의 측정 방법으로 T 세포의 증식 정도를 직접 측정하거나 T 세포 표면

항원을 측정하는 방법 등이 이에 속한다. 이러한 방법을 적용한 연구로 CD4+ CD25+ T 세포의 증가가 심장 이식 환자에서 이식 거부의 정도와 연관성이 있다는 연구 결과가 있고, 골수이식 환자에서 세포 독성(cytotoxic) T 세포의 전구체가 많을수록 백혈병환자에서의 생존기간이 길어진다는 보고가 있다.<sup>21,22)</sup>

또 다른 방법은 칼시뉴린 억제제에 특이적인 약효 분석 방법으로 칼시뉴린 활성도를 직접 측정하거나 칼시뉴린 포스파타제 작용의 영향으로 생성되는 사이토카인의 발현 또는 생성 정도를 측정하는 방법이다. 칼시뉴린 활성도를 약효의 지표로 분석한 다양한 연구가 시행되었고 이를 통해 칼시뉴린 활성도와 혈중 싸이클로스포린의 농도 간에 역의 상관관계가 있다는 것과 싸이클로스포린 투약 후 2시간째 칼시뉴린이 최대로 억제된다는 것, 그리고 칼시뉴린 활성도의 개인 간 차이가 크다는 사실이 보고되었다.<sup>23-26)</sup> 또한 낮은 칼시뉴린 활성도가 골수 이식 환자에서 이식편대숙주반응의 증가와 연관성이 있다는 것, 간 이식 환자에

서 칼시뉴린 활성도가 임상 효과와 연관성이 있을 수 있다는 것 등이 보고되었다.<sup>27-29)</sup>

칼시뉴린 억제제의 약력학적 평가를 위한 많은 방법들이 제시되고 검증되고 있지만 현재까지 이러한 방법들이 임상 현장에서 상용적으로 사용되고 있지는 못하다. 엄격한 약동학적 모니터링에도 불구하고 이식거부나 부작용의 발생이 나타나는 상황에서, 표준화된 약력학적 평가를 임상에서 시행하는 것은 칼시뉴린 억제제의 효과적이고 안전한 사용에 많은 기여를 할 것이다. 이를 위해서는 칼시뉴린 억제제의 약력학적 효과를 예측하기 위한 가장 효과적인 방법이 무엇인가에 대한 해답을 찾기 위한 연구가 지속적으로 필요하다.

결론적으로 본 연구에 사용된 칼시뉴린 활성도 측정법은 더 많은 피험자와 환자에서의 검증이 된다면 칼시뉴린 억제제의 약효를 측정하고 개인별 적정 약물 용법을 결정하기 위한 약력학 모니터링에 활용될 수 있는 가능성이 있음을 확인하였다.

### 참고문헌

1. Klee CB, Crouch TH, Krinks MH. Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979;76(12):6270-6273.
2. Liu J, Farmer JD Jr, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell*, 1991;66(4):807-815.
3. Friedman J, Weissman I. Two cytoplasmic candidates for immunophilin action are revealed by affinity for a new cyclophilin: one in the presence and one in the absence of CsA. *Cell*, 1991;66(4):799-806.
4. Liu J, Albers MW, Wandless TJ, Luan S, Alberg DG, Belshaw PJ, Cohen P, MacKintosh C, Klee CB, Schreiber SL. Inhibition of T cell signaling by immunophilin-ligand complexes correlates with loss of calcineurin phosphatase activity. *Biochemistry*, 1992;31(16):3896-3901.
5. O'Keefe SJ, Tamura J, Kincaid RL, Tocci MJ, O'Neill EA. FK-506- and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin. *Nature*, 1992;357(6380):692-694.
6. Clipstone NA, Crabtree GR. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature*, 1992;357(6380):695-697.
7. Shaw KT, Ho AM, Raghavan A, Kim J, Jain J, Park J, Sharma S, Rao A, Hogan PG. Immunosuppressive drugs prevent a rapid dephosphorylation of transcription factor NFAT1 in stimulated immune cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995;92(24):11205-11209.
8. Park J, Yaseen NR, Hogan PG, Rao A, Sharma S. Phosphorylation of the transcription factor NFATp inhibits its DNA binding activity in cyclosporin A-treated human B and T cells. *J Biol Chem*, 1995;270(35):20653-20659.
9. Loh C, Shaw KT, Carew J, Viola JP, Luo C, Perrino BA, Rao A. Calcineurin binds the transcription factor NFAT1 and reversibly regulates its activity. *J Biol Chem*, 1996;271(18):10884-10891.
10. Crabtree GR. Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. *Science*, 1989;243(4889):355-361.
11. Shaw JP, Utz PJ, Durand DB, Toole JJ, Emmel EA, Crabtree GR. Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science*, 1988;241(4862):202-205.
12. Kahan BD, Shaw LM, Holt D, Grevel J, Johnston A. Consensus document: Hawk's Cay meeting on therapeutic drug monitoring of cyclosporine. *Clin Chem*, 1990;36:1510-1516.
13. Kahan BD, Grevel J. Optimization of cyclosporine therapy in renal transplantation by a pharmacokinetic strategy. *Transplantation*, 1988;46(5):631-644.
14. Nashan B, Cole E, Levy G, Thervet E.

- Clinical validation studies of Neoral C(2) monitoring: a review. *Transplantation*, 2002;73 (9 Suppl):S3-S11.
15. Levy G, Thervet E, Lake J, Uchida K; Consensus on Neoral C(2): Expert Review in Transplantation (CONCERT) Group. Patient management by Neoral C(2) monitoring: an international consensus statement. *Transplantation*, 2002;73(9 Suppl):S12-S18.
  16. Koefoed-Nielsen PB, Karamperis N, Jørgensen KA. 24-h monitoring of calcineurin phosphatase activity in healthy subjects. *Scand J Immunol*, 2005;62(3):309-311.
  17. Koefoed-Nielsen PB, Gesualdo MB, Poulsen JH, Jørgensen KA. Blood tacrolimus levels and calcineurin phosphatase activity early after renal transplantation. *Am J Transplant*, 2002;2(2):173-178.
  18. Yano I. Pharmacodynamic monitoring of calcineurin phosphatase activity in transplant patients treated with calcineurin inhibitors. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2008;23(3):150-157.
  19. Sommerer C, Giese T, Meuer S, Zeier M. Pharmacodynamic monitoring of calcineurin inhibitor therapy: is there a clinical benefit? *Nephrol Dial Transplant*, 2009;24(1):21-27.
  20. van Rossum HH, de Fijter JW, van Pelt J. Pharmacodynamic monitoring of calcineurin inhibition therapy: principles, performance, and perspectives. *Ther Drug Monit*, 2010;32(1):3-10.
  21. Chang DM, Ding YA, Kuo SY, Chang ML, Wei J. Cytokines and cell surface markers in prediction of cardiac allograft rejection. *Immunol Invest*, 1996;25(1-2):13-21.
  22. Speiser DE, Lölliger CC, Siren MK, Jeannet M. Pretransplant cytotoxic donor T-cell activity specific to patient HLA class I antigens correlating with mortality after unrelated BMT. *Br J Haematol*, 1996;93(4):935-939.
  23. Halloran PF, Helms LM, Kung L, Noujaim J. The temporal profile of calcineurin inhibition by cyclosporine in vivo. *Transplantation*, 1999;68(9):1356-1361.
  24. Fruman DA, Klee CB, Bierer BE, Burakoff SJ. Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporin A. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992;89(9):3686-3690.
  25. Piccinini G, Gaspari F, Signorini O, Remuzzi G, Perico N. Recovery of blood mononuclear cell calcineurin activity segregates two populations of renal transplant patients with different sensitivities to cyclosporine inhibition. *Transplantation*, 1996;61(10):1526-1531.
  26. Koefoed-Nielsen PB, Gesualdo MB, Poulsen JH, Jørgensen KA. Blood tacrolimus levels and calcineurin phosphatase activity early after renal transplantation. *Am J Transplant*, 2002;2(2):173-178.
  27. Pai SY, Fruman DA, Leong T, Neuberger D, Rosano TG, McGarigle C, Antin JH, Bierer BE. Inhibition of calcineurin phosphatase activity in adult bone marrow transplant patients treated with cyclosporine A. *Blood*, 1994;84(11):3974-3979.
  28. Sanquer S, Schwarzinger M, Maury S, Yakouben K, Rafi H, Pautas C, Kuentz M, Barouki R, Cordonnier C. Calcineurin activity as a functional index of immunosuppression after allogeneic stem-cell transplantation. *Transplantation*, 2004;77(6):854-858.
  29. Fukudo M, Yano I, Masuda S, Fukatsu S, Katsura T, Ogura Y, Oike F, Takada Y, Tanaka K, Inui K. Pharmacodynamic analysis of tacrolimus and cyclosporine in living-donor liver transplant patients. *Clin Pharmacol Ther*, 2005;78(2):168-181.