



Farmakogenetika:

- I. pojmy, historie a koncepty.
- II. potenciální aplikace v onkologii
- III. data MOÚ Brno a spolupracujících pracovišť

Dalibor Valík

Masarykův onkologický ústav,
Brno

...kolaborativní projekty

- Dr. J. O'Brien, BGL, Mayo Clinic,
- Prof. J. Štěřba, KDO FN Brno
- Dr. M. Radina, OC NJ
- Dr. D. O'Kane, DCBI, Mayo Clinic
- Dr. Steve Wong, Medical College of Wisconsin
- Dr. A. van Kuilenburg AMC Amsterdam

I. Adverse Drug Reactions

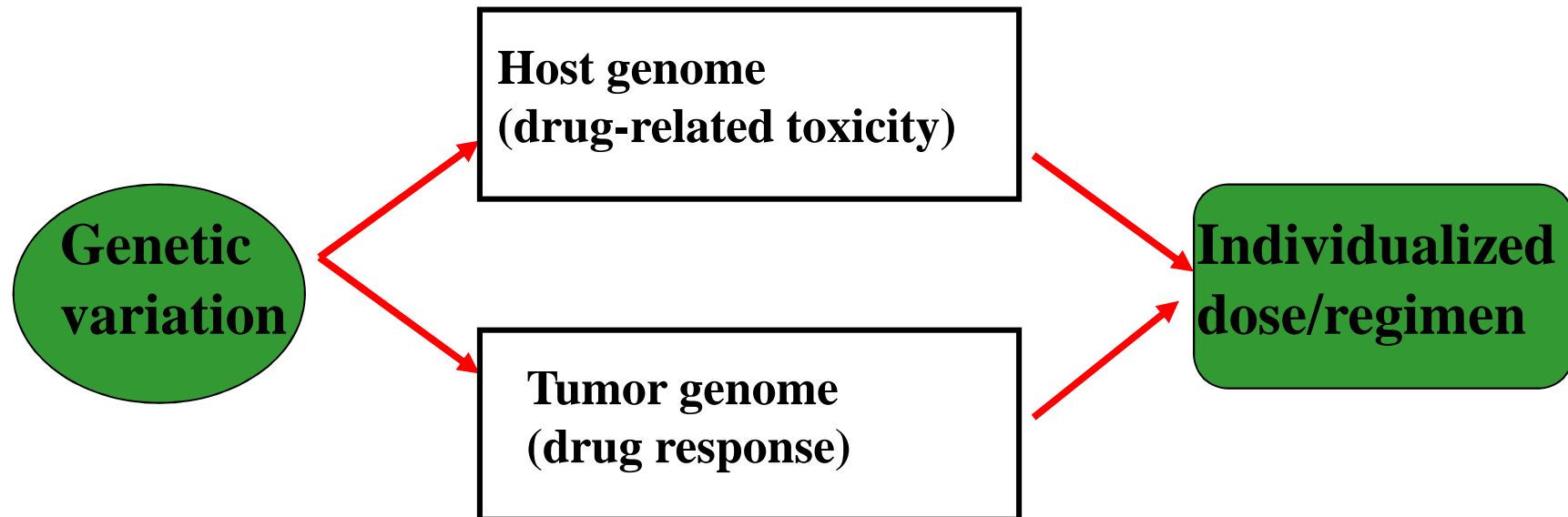
*(serious ADR defined as those req'd hospitalization,
were permanently disabling or resulted in death)*

- The overall incidence of serious ADR 6.7%
- Fatal ADR 0.32%
- In 1994, overall 2,216,000 hospitalized patients had serious ADR and 106,000 had fatal ADR

Lazarou et al., JAMA 1998

Clinical variables contributing to variation in drug response:

- Age
- Sex
- Diet
- **Organ function**



- významné osobnosti, data a koncepty
 - ...*osobnosti a data*
 - Mendel
 - » pojem dědičného transmisivního „faktoru“, ...dnes genu
 - Garrod
 - » pojem chemické individuality
 - Motulsky
 - » fúze biochemie, farmakologie a genetiky
 - Vogel
 - » pojem farmakogenetika

– *koncepty*

- „biomarker“:

» *měřitelnost, malá pravděpodobnost spontánní změny, správná reflexe studovaného jevu*

- „dědičná porucha jako modelové onemocnění“:

» *Garrod... whenever possible the genetic difference should be measured as a chemical test*

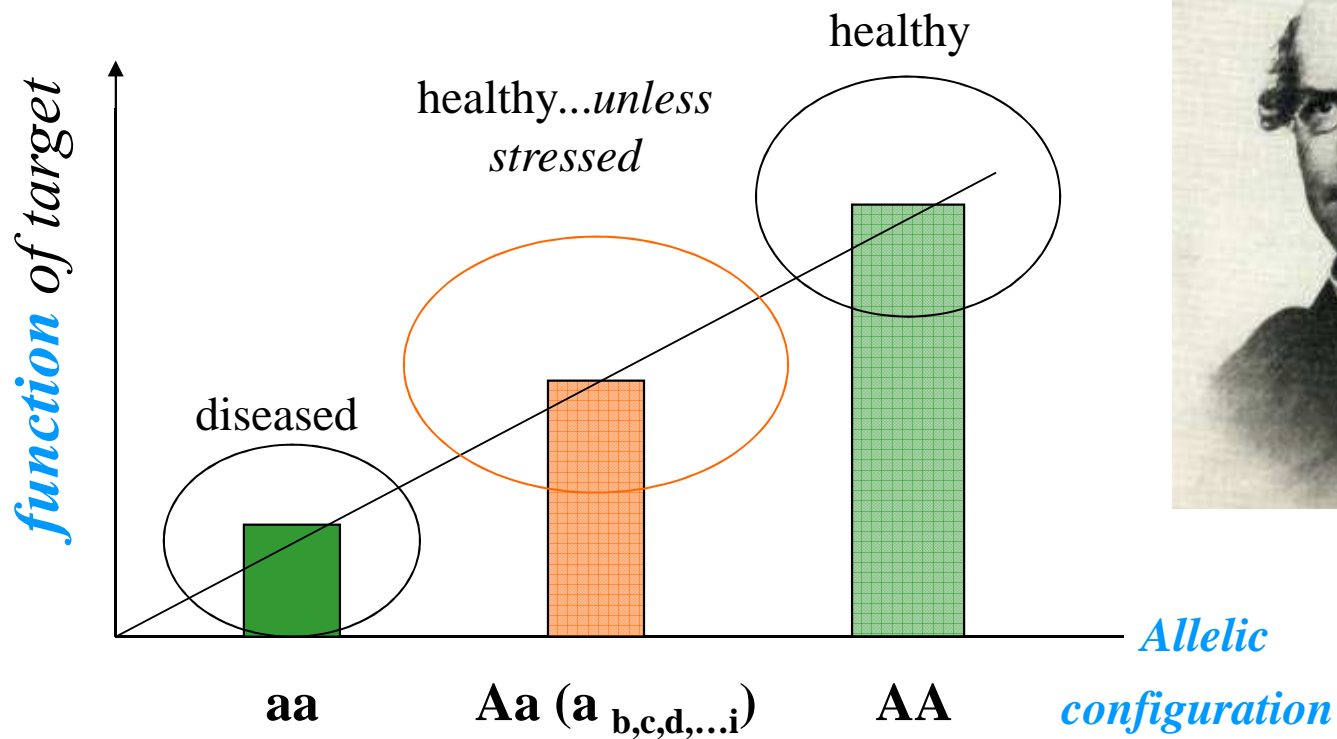
» *...if we knew enough, every gene would be assigned a specific chemical effect in the body*

- „reakce fáze I a II“.

» *Williams, 1963*

pharmacogenetic perspective

- „pharmacogenetic“ diseases as „siblings“ of inborn errors of metabolism:

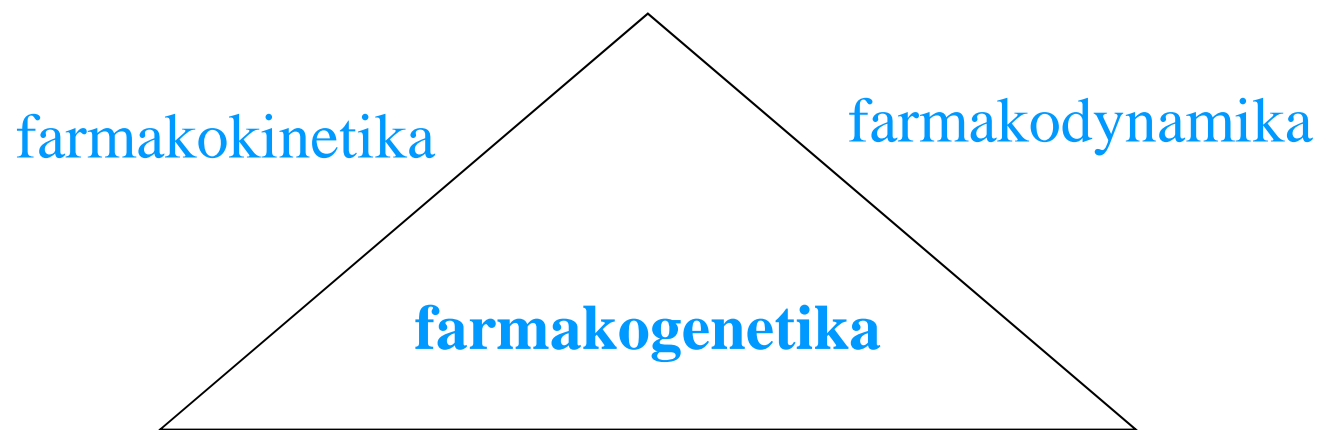


Farmakogenetika

Zabývá se individuálním genetickým vlivem na:

farmakokinetiku (polymorfní enzymy)

farmakodynamiku (polymorfní receptor)



...chronické, dlouhodobé medikace

- ...tam se nejvíce projeví sumační efekty (interakce, komorbidita, genetické vlivy, apod.)
 - psychiatrie
 - onkologie
 - antikoagulační terapie

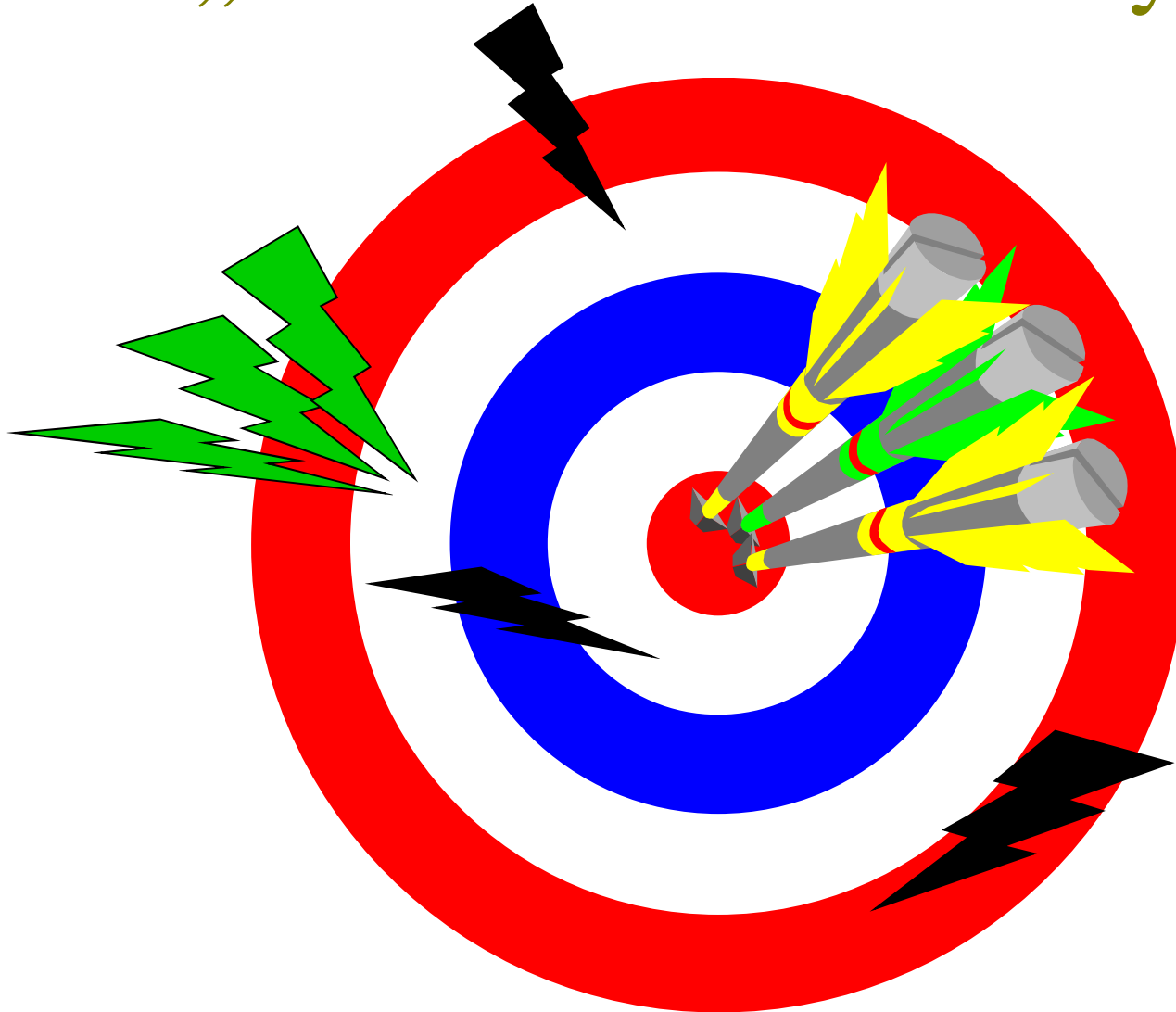
BĚŽNÁ KLINICKÁ PRAXE

stanovení dávky vychází v naprosté většině případů z přepočtu na tělesný povrch pacienta - (BSA - Body Surface Area)

LIMITY ??

....**stupeň korelace** mezi BSA a dalšími farmakokinetickými parametry jako např. Clearance nebo AUC (Area Under Curve)

„Precision vs accuracy“



Individualized dose



One Size? Doesn't Fit All!



One Size? Doesn't Fit All!

FARMAKOKINETIKA

akronym **LADME** v osudu léčiva

- **L(iberation)** = uvolnění z podané formy (tablety, čípky, im, iv aplikace)
- **A(bsorption)** = proces, kdy je molekula vychytána do systémové cirkulace, (*tento koncept neplatí pro iv podání léčiva*)
- **D(istribution)** = jakmile je lék absorbován a rozptýlen v plasmě může dále:
 - zůstat v krevním prostoru (vazba na proteiny)
 - opouštět krevní prostor a vstupovat do extravaskulární tekutiny
 - migrovat do různých orgánů

- M(etabolism)

- proces biotransformace léku většinou do podoby **hydrofilní, polárnější, a tak lépe eliminovatelné**

- hlavními orgány biotransformace jsou:

- játra, ledviny (mikrosomální enzymy)

- » koncept prodrug > active drug (CFM > 4-OH,CFM)

- E(limination)

- **finální exkrece léku**

- **ve formě parentální sloučeniny nebo biotransformovaných metabolitů**

- cesty eliminace

- moč, žluč, expirovaný vzduch, sliny, pot, mateřské mléko

METABOLICKÉ BIOTRANSFORMACE

• reakce fáze I (léčivo se proměňuje v polárnější metabolit připojením nebo odhalením funkčních skupin:

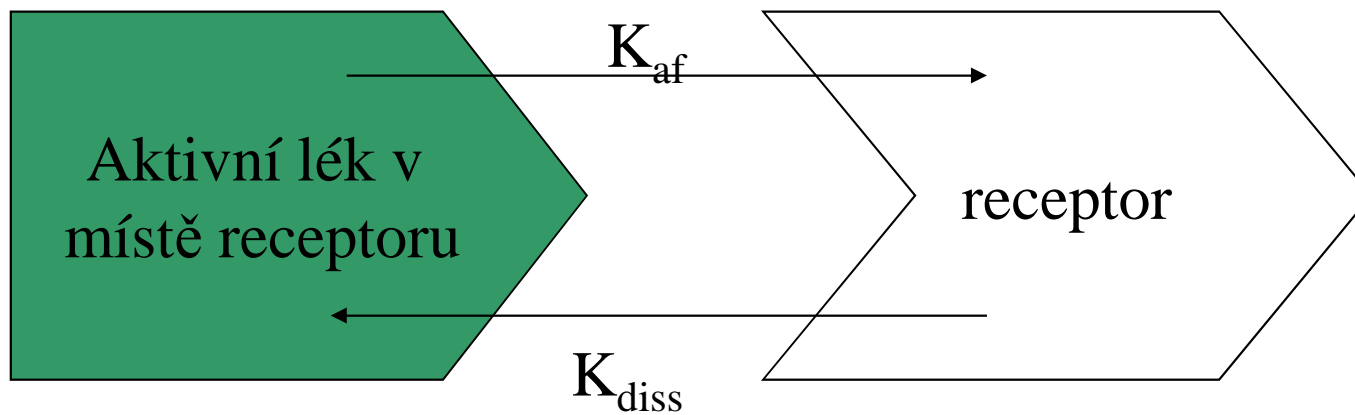
• -OH, -NH₂, -SH

• reakce fáze II (tvorba vysoce polárních konjugátů se snadnou eliminací):

• hlavním metabolickým orgánem jsou játra (ale i GIT, plíce, kůže, ledviny)

FARMAKODYNAMIKA

Zabývá se interakcí léčivo - receptor



II. potenciální aplikace v onkologii

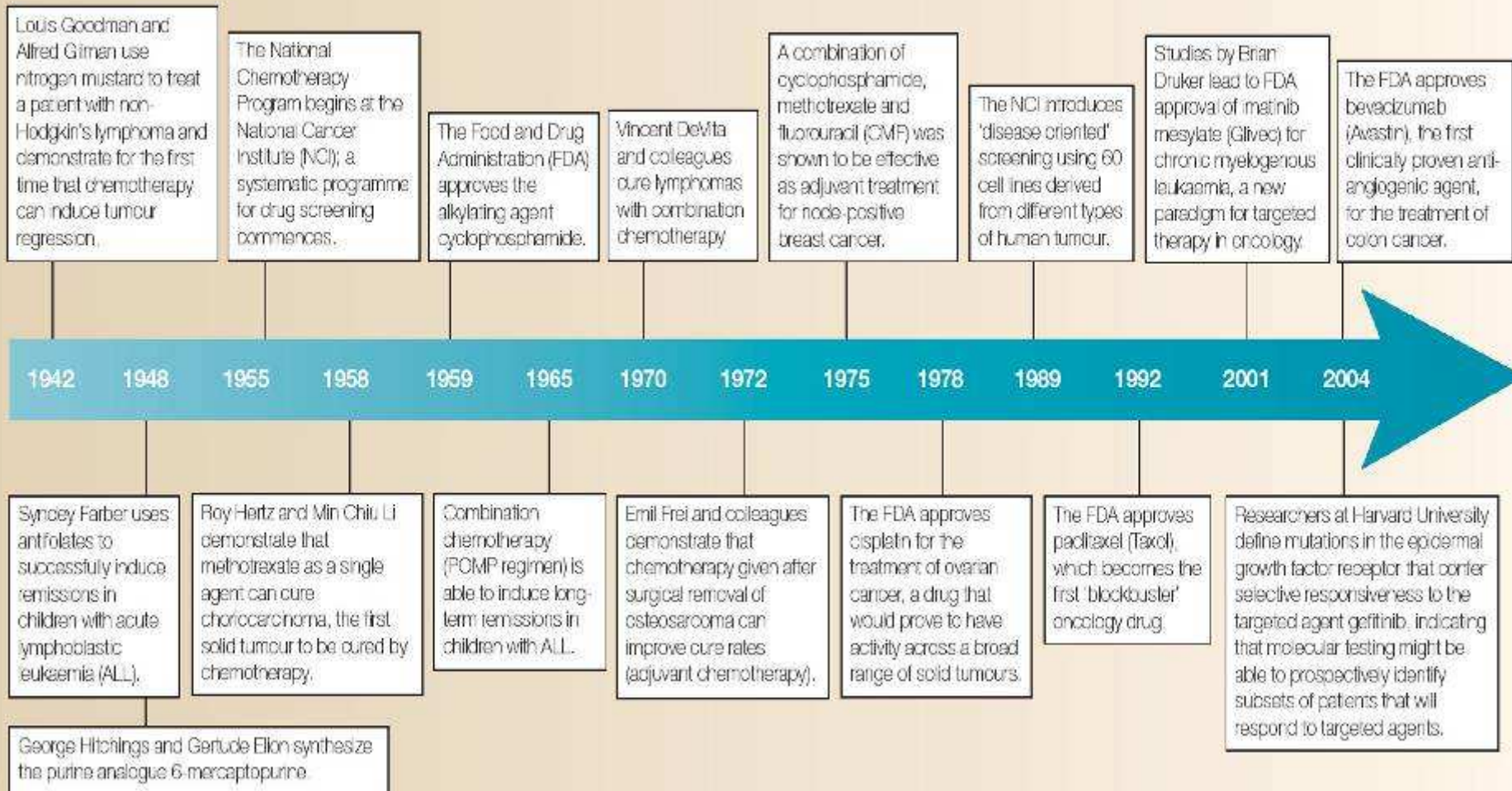
...pharmacological attempts to treat cancer

- ...date back to years of II. World War

- 1942 nitrogen mustard
- 1948 aminopterin (later, **methotrexate**), **6-mercaptopurine**
- 1957 **5-FU** synthesized by Duschinsky

» *Importantly: all of these compound still being key components of the respective treatment protocols*

Timeline | The history of chemotherapy



...chemotherapy = „guided toxicology“

- *essentially, all anticancer agents have narrow therapeutic index*
 - their toxicity can be regarded as
 - *general:*
 - an inherent feature of a cytotoxic compound(s) used
 - *individual:*
 - a feature of intraindividual variation, or susceptibility in „general“ toxicity

host response *versus* tumor response

- host response:
 - referred to as *pharmacogenetics/genomics*
- tumor response:
 - referred to rather as *„predictive oncology“*

patient as a host

- essentially, any tumor can be killed if sufficiently exposed to cytotoxic drug(s)
- however, this is seldom compatible with „in vivo“ achievable dosage enabling survival of a host
 - nevertheless, this has led to „dose escalation concepts“ leading to high-dose chemotherapy

tumor as target

- „targeted therapeutics“,
 - *focused against selective determinants present and/or active in the tumor, but not normal tissues*
 - » *! recent issues on EPO...*
- list of compounds is growing
 - *herceptin as a prototype drug, now heading to adjuvant chemotherapy*

Common comorbidities interfering with anticancer treatment

- Hypertension
 - Diabetes mellitus
 - Dyslipidemia
 - Heart disease and stroke
 - Chronic kidney disease
 - Drugs, alcohol and parapharmaceuticals abuse
 - Viral infections and their sequelae (hepatitis, etc)
- *...all often having detrimental influence on function of parenchymal organs important in metabolism*
- ...more significant in older patients

realizing complexities of pharmacogenetics

- ...we are facing to:
 - *polygenic models with significant nongenetic component* (typically: chronic diseases of parenchymal organs)
 - multiple mechanisms influence a single trait
 - ...SNPs not enough... (W.Evans, 2007)

*...příklady farmakogenetických determinant
protinádorové chemoterapie*

- ...připomeňme, že:
 - *...jde většinou o enzymy jaterní tkáně hostitele zapojené v reakcích fáze I. a II.*

CYTOCHROM P 450

- mikrozomální enzym zapojený v **I. fázi** metabolických přeměn při oxidativních procesech
- hemoprotein, ve své redukované formě (Fe^{++}) váže oxid uhelnatý a tvoří komplex maximálně absorbující světlo **vlnové délky 450 nm** (Omura, Sato 1964)
- řada izoenzymů - nomenklaturní systém založený na rozdílné sekvenci aminokyselin
- izoenzymy označovány **CYP** (**CYtochrom **P450**) **1A1****

CYP 2D6

- AR typ dědičnosti (3 - 10 % bělochů), popsána řada alelických variant
- porušeny cytochrom P450-dependentní oxidace debrisočinu, sparteinu a dalších asi 40 léčiv zahrnující zejména **psychofarmaka a beta-sympatomimetika**
- při snížené expresi CYP 2D6 resultuje porušená metabolizace ve zvýšenou plazmatickou hladinu léčiv a v korelaci s ní i ve zvýšené NÚL

Drugs Metabolized (in part) by CYP2D6

Beta Blockers:

carvedilol
S-metoprolol
propafenone
timolol

Antidepressants:

amitriptyline
clomipramine
desipramine
imipramine
paroxetine

Antipsychotics:

haloperidol
perphenazine
risperidone=>9OH
thioridazine
zuclopenthixol

alprenolol
amphetamine
aripiprazole
atomoxetine
bufuralol
chlorpheniramine
chlorpromazine
codeine (=>O-
desMeth)
debrisoquine
dexfenfluramine
dextromethorphan
duloxetine
encainide
flecainide
fluoxetine
fluvoxamine
lidocaine
metoclopramide

methoxyamphetamine
mexiletine
minaprine
nebivolol
nortriptyline
ondansetron
oxycodone
perhexiline
phenacetin
phenformin
promethazine
propranolol
sparteine
tamoxifen
tramadol
venlafaxine

<http://medicine.iupui.edu/flockhart/table.htm>

CYP2D6

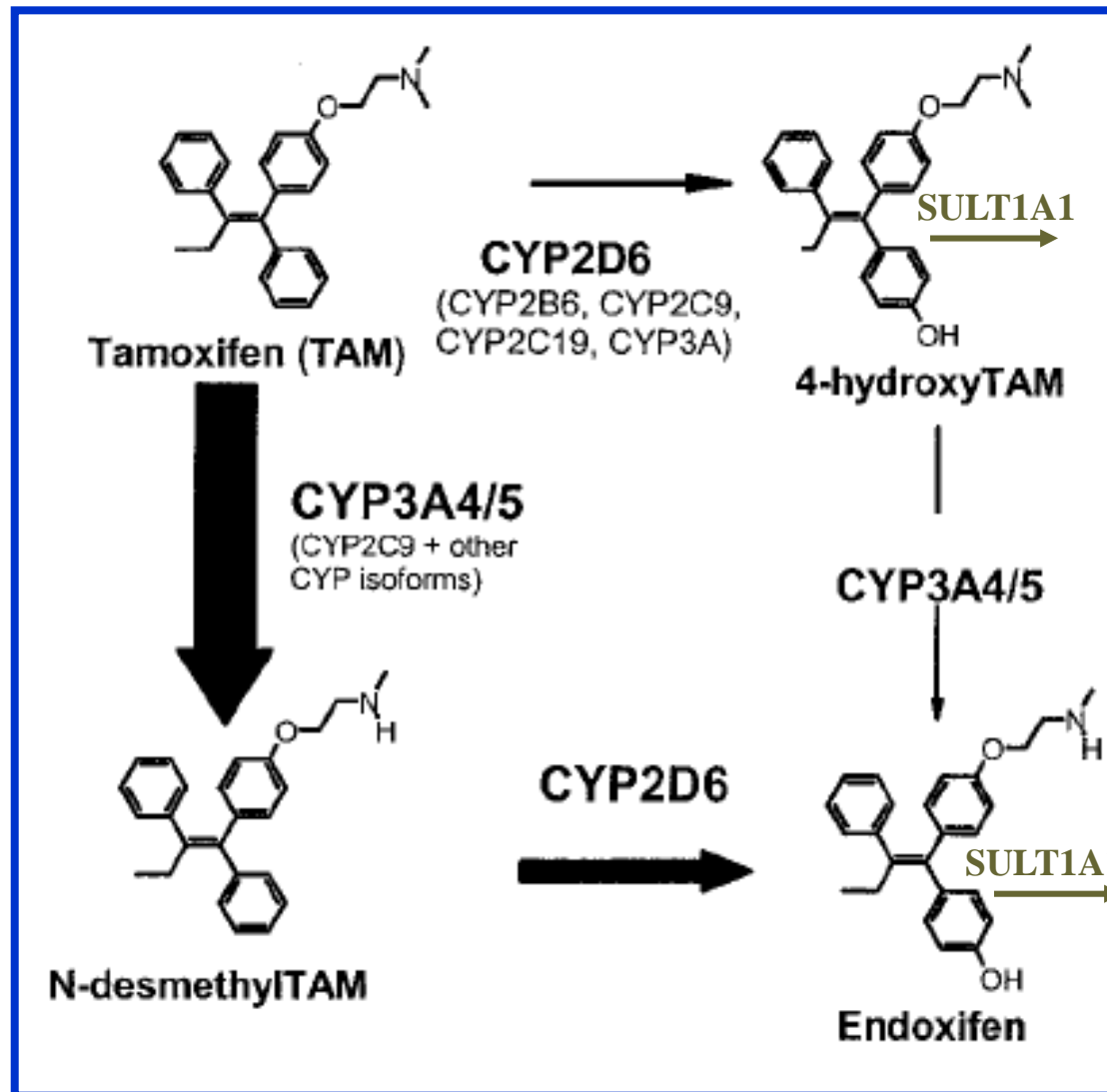
<u>Allele</u>	<u>Defining Change</u>	<u>Effect</u>	<u>Activity</u>
*1	None detected	None	Extensive (Normal)
*2 (*17)	1661, 2850C>T	AA changes	Normal/Decreased
*3	2549A>del	Frame-shift	None
*4	1846G>A	Splicing defect	None
*5	Deletion	Deleted	None
*6	1707T>del	Frame-shift	None
*7	2935A>C	H324P	None
*8	1758G>T	Stop Codon	None
*9	2613-2615delAGA	K281del	Decrease
*10	100C>T	P34S	Decrease
*11	883G>C	Splicing defect	None
*12	124G>A	Splicing defect	None
*17	1023C>T	AA Change	Decreased
.	.	.	.
*59	2291G>A	Decr. mRNA	Decreased

<http://www.imm.ki.se/CYPalleles/>

CYP2D6 Problems

- **Allelic drop-outs**
 - (currently ~0.1%)
- **Gene Deletions**
 - Both copies of the gene can be deleted
- **Gene Conversions**
 - CYP2D6 can be converted by CYP2D7P
 - Can produce intron 1 conversions or conversions elsewhere in the CYP2D6 gene
 - These may or may not amplify with or extend the usual primers
- **Neogenes**
 - Hybrid genes: 5'-CYP2D6/CYP2D7-3'
 - Hybrid genes: 5'-CYP2D7/CYP2D6-3'
- **CYP2D6 Duplications**
 - Which alleles are duplicated in heterozygous cases
 - Can be determined by fluorescence ratios in most cases
 - New test for gene duplications developed (J. Black)

Tamoxifen Prodrug Metabolism



Goetz, M. P. et al. J Clin Oncol; 23:9312-9318 2005
Copyright©2005 American Society of Clinical Oncology

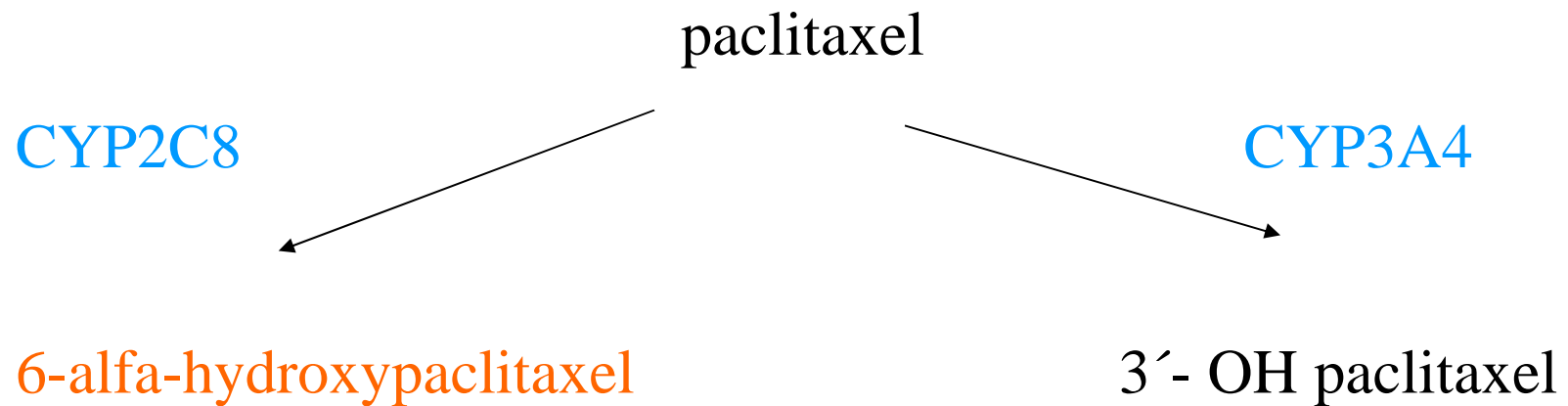
CYP 3A4

- původně popsán na příkladu rozdílné oxidace nifedipinu

Kleinbloesem CH., van Brummelen P., Faber H., 1984

- teniposid, etoposid
- cyklofosfamid, ifosfamid
- vinkristin, vinblastin, vindesin
- **paclitaxel a docetaxel**

Inter-individuální variabilita v metabolizaci paclitaxelu v závislosti na rozdílné expresi izoenzymů P 450



URIDIN DIFOSFÁT GLUKURONYLTRANSFERASA (UGT)

- početnější rodiny enzymů katalyzujících glukuronidaci řady endogenních substrátů a xenobiotik
- UGT1 (glukuronidace bilirubinu a fenolů)
- UGT2 (NSAID, morfin, zidovudin)

UGT1 a IRINOTECAN, CPT 11

- derivát camptothecinu, inhibice topoisomerázy I

irinotecan



karboxylesteráza

SN38

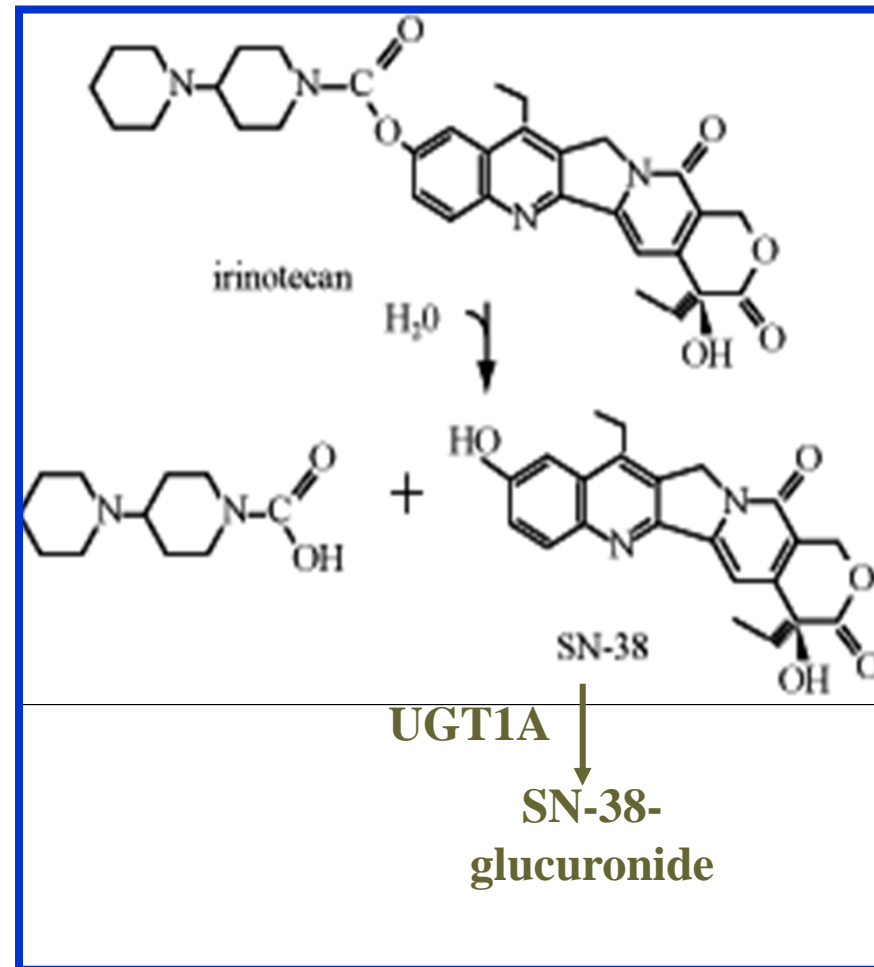


UGT 1A1

SN38 glukuronid

Irinotecan Summary

- CYP3A metabolizes Irinotecan in part
- Irinotecan activated by **carboxylesterases**
- **SN-38 is active drug**, blocks DNA replication
- SN-38 inactivated by **glucuronidation**
- SN-38 conjugate **secreted into bile and the intestines**



Tissue Distributions

Liver	
1A1	1A5
1A3	1A7
1A4	1A8
1A9	1A10
2B4	
2B7	
2B10	
2B11	
2B15	

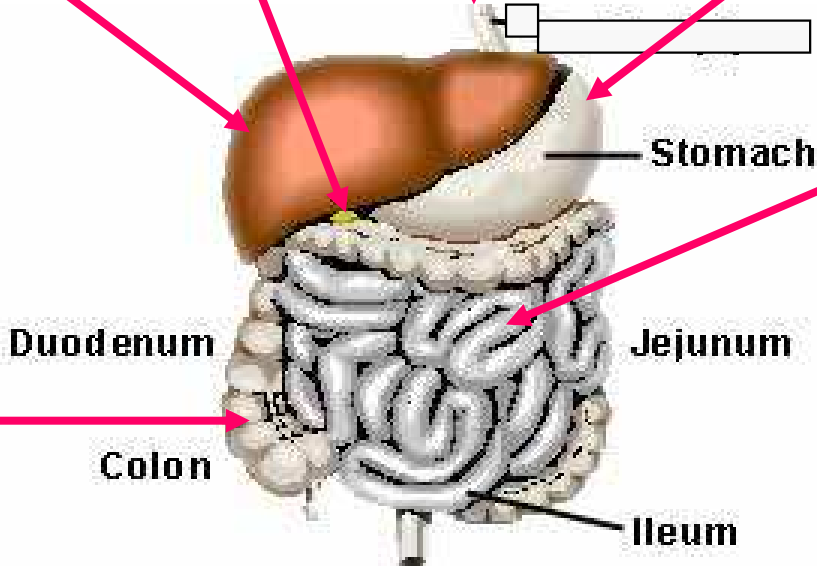
Biliary	
1A1	1A5
1A3	1A9
1A4	
1A6	
1A10	

Esophagus	
1A7	1A1
1A8	1A3
1A9	1A4
1A10	1A5
2B7	1A6
2B10	2B4
2B15	

Stomach	
1A1	1A4
1A3	1A5
1A6	1A8
1A7	1A9
1A10	

Colon	
1A1	1A5
1A3	
1A4	
1A6	
1A8	
1A9	
1A10	
2B7	

Intestines	
1A1	1A6
1A4	2B4
1A8	



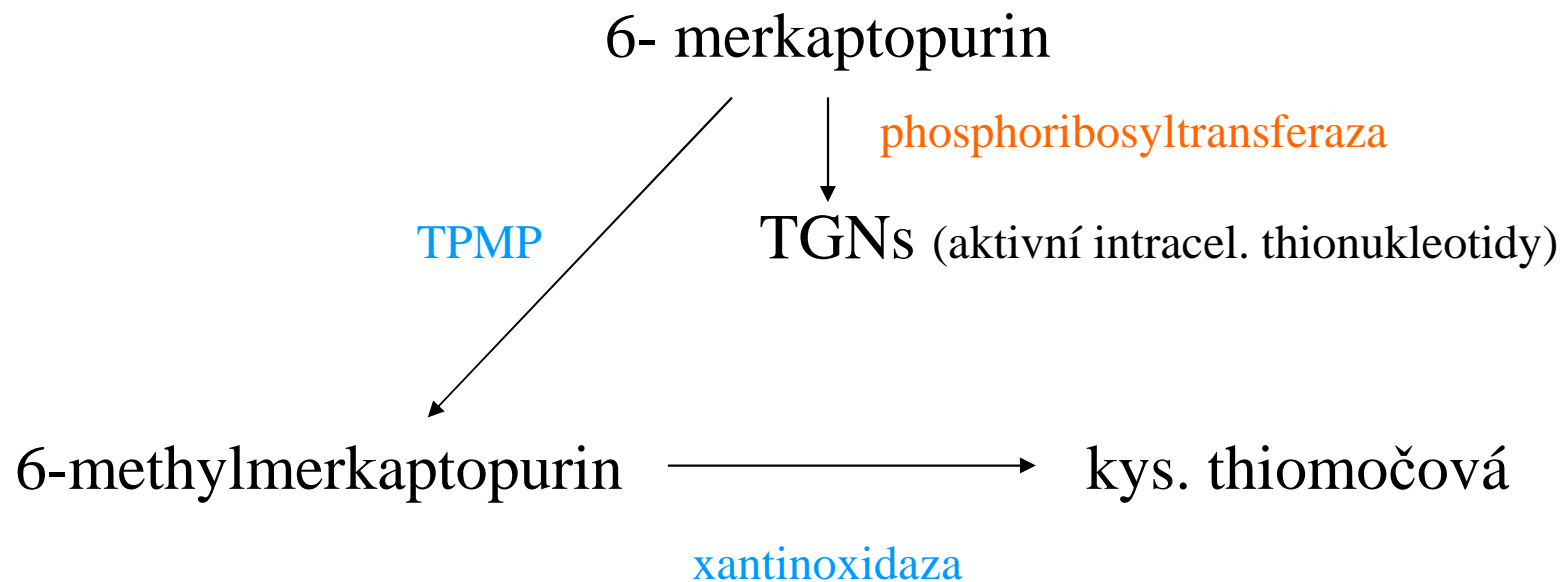
UGT1A1 Deficiencies

- Many mutations identified in this gene (>60), leading to inherited unconjugated hyperbilirubinemias (**Gilbert and Crigler-Najjar syndromes**)
- Most common deficiency is insertion of an extra dinucleotide TA in a TA-repeat in the promoter of UGT1A1 (**Gilbert**)
- This decreases gene expression and reduces enzymatic activity to 30% to 50% of normal

UGT1A1 TA Promoter Repeats



THIOPURIN METHYLTRANSFERASA (TPMP)



TPMP - př. genetického polymorfismu

bělošská populace : 89 % vysoká, 11 % střední a 1 ze 300
nízká aktivita

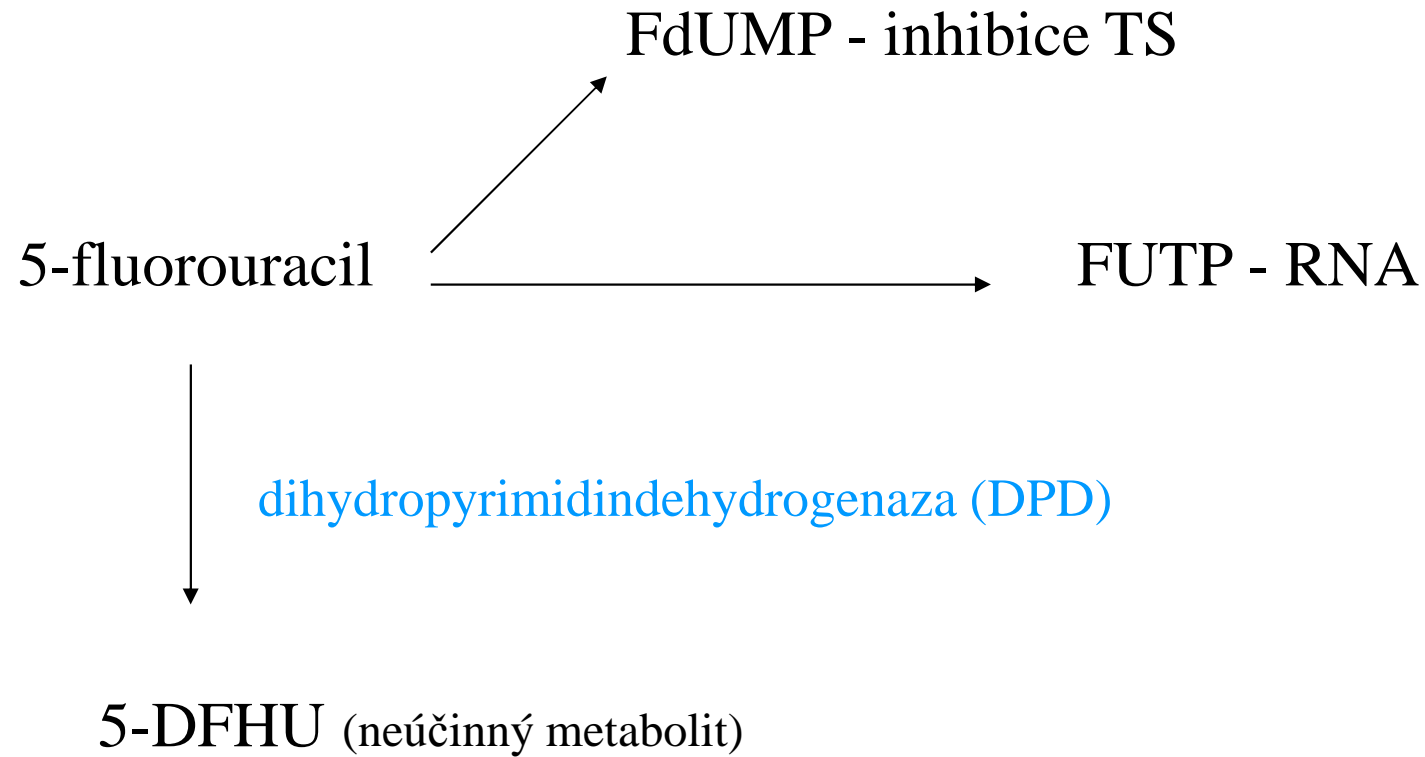
THIOPURIN METHYLTRANSFERASA (TPMP)

- TPMP aktivita stanovována v erytrocytech
 - pozorována i inverzní korelace s hladinou thioguaninových nukleotidů
- gen lokalizována na 6. chromozomu,
 - izolovány 2 deficientní mutantní alely TPMP*2, Ala to Pro kodon 80 a TPMP*3, Ala to Thr kodon 154 a Tyr to Cys kodon 240
- genotypizace se udávala v 80 % korelaci s fenotypem

N-ACETYLTRANSFERASA (NAT)

- acetylační fenotyp známý již z 50-tých let
- 2 základní izoenzymy NAT1 a NAT2 (genetický polymorfismus objeven v roce 1990 a 1993)
- bělošská populace : 50 % pomalých acetylátorů
- 10 % asiátů nebo 5 % eskymáků
- fenotyp pomalých acetylátorů spojen s vyšším rizikem určitých typů nádorů ?? (moč. měchýř, střevo)
- inhibitor topoizomerázy II **amonařid** (studie MJ Rataina doporučila rozdílné dávkování podle acetylačního fenotypu :250 mg/m u pomalých resp. 375 mg/m u rychlých acetylátorů

5-FLUOROURACIL a (DPD)



DIHYDROPYRIMIDINDEHYDROGENAZA

- 10 - 20 % 5-FU se vylučuje nezměněno močí
- až 80 % 5-FU je metabolizováno na 5-FDHU pomocí DPD
- ?? % zůstane k dispozici pro biotransformaci na fluoropyrimidinnukleotidy pro vlastní cytotoxický efekt ??

....je obtížné dosáhnout klinické odezvy bez navození významné systémové toxicity....

DIHYDROPYRIMIDINDEHYDROGENAZA

3 - 5 % populace je nosičem heterozygotní(ch) mutace(í) genu DPD



snížená aktivita DPD



závažná toxicita ??

dominantní role DPD v játrech ? - korelace s PBMC ? - role DPD v tumoru ?

Farmakogenetika 2012...kde pramení deziluze ...?

– ...pojmy:

» farmakogenetika versus prediktivní onkologie

– ...často pouze supplement fenotypových testů:

» Warfarin+INR, UGT1A1+bilirubin, antihypertensiva+TK

– ...relevantní biomarkery:

» prof. Lindpaintner... *“genotype may be the wrong place to look for biomarkers for drug response...”* (BMJ 2007:3,334)

– ...čas:

» tamoxifen versus inhibitory aromatázy,...*co se bude používat v klinice ?*

Metody ve farmakogenetice

- **aktivita** limitujícího enzymu/receptoru
 - (složité, ale „definitivní“)
- identifikace **DNA změny** genu limitujícího enzymu
 - jednoduché, *ale musí být splněna asumpce, že mutace (PMF) se přímo odrazí v aktivitě, pouze asociace nemusí nutně být klinicky významná*
- sledování „**downstream**“ **produktu(ů)**
„farmakogeneticky“ podmíněné reakce, např. SN-38, OH-taxany, apod.)

Pharmacogenetics - SNP genotyping by DNAVision - Mozilla Firefox

Spolub Úpravy Zobrazi Historie Záložky Nástroje Nápožedá

http://www.dnavision.be/pharmacogenetics.php?gclid=CMB3n_ezSpACRQJEMAdgyewDg

Hotmail Mastri odkazy Windows Media Windows



Pharmacogenetics
The right medicine for the right patient

THE COMPANY | PRESS ROOM | CONTACT US | PHARMACOGENETICS SNP GENOTYPING | PHARMACOGENOMICS EXPRESSION PROFILING | PERSO MEDICINE | BIO BANKING | BIO PHARMA | ANIMAL GENETICS | FOOD QUALITY | DNA SEQUENCING | MY DNAVISION

DNAVISION YOUR GENOMIC SOLUTIONS

Pharmacogenetics - SNP genotyping

Pharmacogenetics is the study of inter-individual variations in DNA sequence related to drug response.

DNAVision, a leading global provider of **applied pharmacogenetic and pharmacogenomic services**, helps pharmaceutical companies and clinical research organizations effectively integrate pharmacogenetics into their drug development program and thus deliver safer, more effective products to the market more quickly.

[Technical brochure: SNP genotyping at DNAVision](#)

Both **discovery and clinical genotyping services** are available at a very low cost per single nucleotide polymorphism (SNP). After identifying candidate genes or regions of interest using **whole genome technologies**, scientists may test **specific genes** associated with **disease or drug response** using **targeted genotyping** solutions from **Affymetrix** or focused multiplex assays using **SNPlex** technology from **Applied Biosystems** or other custom SNP genotyping solutions like **pyrosequencing, sequencing, TaqMan, dHPLC, Snapshot, ...**

To guarantee the quality of our results, we comply with the international drug development standards required by regulatory authorities. We are the **first laboratory in Europe to be ISO17025 accredited** in pharmacogenetics and pharmacogenomics. We are also **CLIA registered** and also support **pre-clinical GLP compliant studies**.



PHARMACOGENETICS

Pharmacogenetics is the study of interindividual variations in DNA sequence related to drug response.



DNAVISION
YOUR GENOMIC SOLUTIONS

www.dnavision.be

Expression

Expression analysis (mRNA / MicroRNA)

using latest technologies :

- Affymetrix
- Agilent
- RT-PCR
- ...

> please click here

DNAVISION

Brochure

Your complete solution for DNA genotyping and expression profiling (mRNA/microRNA).

> click here for a description of our services (.pdf)

DNAVISION

Target discovery by mapping of disease genes.

Target identification

- > Whole genome SNP genotyping **AFFYMETRIX** Authorized Service Provider
- > CGH (Comparative Genomic Hybridization) **Agilent Technologies**

Hotovo

Start | Total Commander 5.51 - ... | Microsoft PowerPoint - [F... | Pharmacogenetics - S...

11:16

„!“

Common comorbidities interfering with anticancer treatment

- Hypertension
 - Diabetes mellitus
 - Dyslipidemia
 - Heart disease and stroke
 - Chronic kidney disease
 - Drugs, alcohol and parapharmaceuticals abuse
 - Viral infections and their sequelae (hepatitis, etc)
- *...all often having detrimental influence on function of parenchymal organs important in metabolism*
- ...more significant in older patients

...emphasis on significance of *clinical toxicity*

- **6-MP** – myelosuppression
- **Erbitux** – rash
- **MTX** – mucositis (but not CNS toxicity ?), ALT,
- **5-FU** – myelotoxicity, GI toxicity,
 - ...possibly others ?
- ...historically, attempts to dose chemotherapy according to the neutrophil nadir between cycles have been made

...we may never be in a situation to get reliable „early warning“ signs



we may rather go towards evaluating

- **rate phenomenons:** rates of drug activation and elimination relations on an individual basis
 - irinotecan > SN38 > SN38 glucuronide
- **biomarkers**, if available
 - pretreatment plasma folates, Hcys, antifolates, their biotransformation
 - » *the most known example: warfarin, CYP2C9/VKOR and INR*
- **downstream phenomenons**
 - such as induction of critical cellular events (p53 ?), provided that those events relate to the action of a drug
 - „collateral damage“
 - » treatment induced disturbances in plasma low-molecular proteome etc.

evidence-based medicine

versus

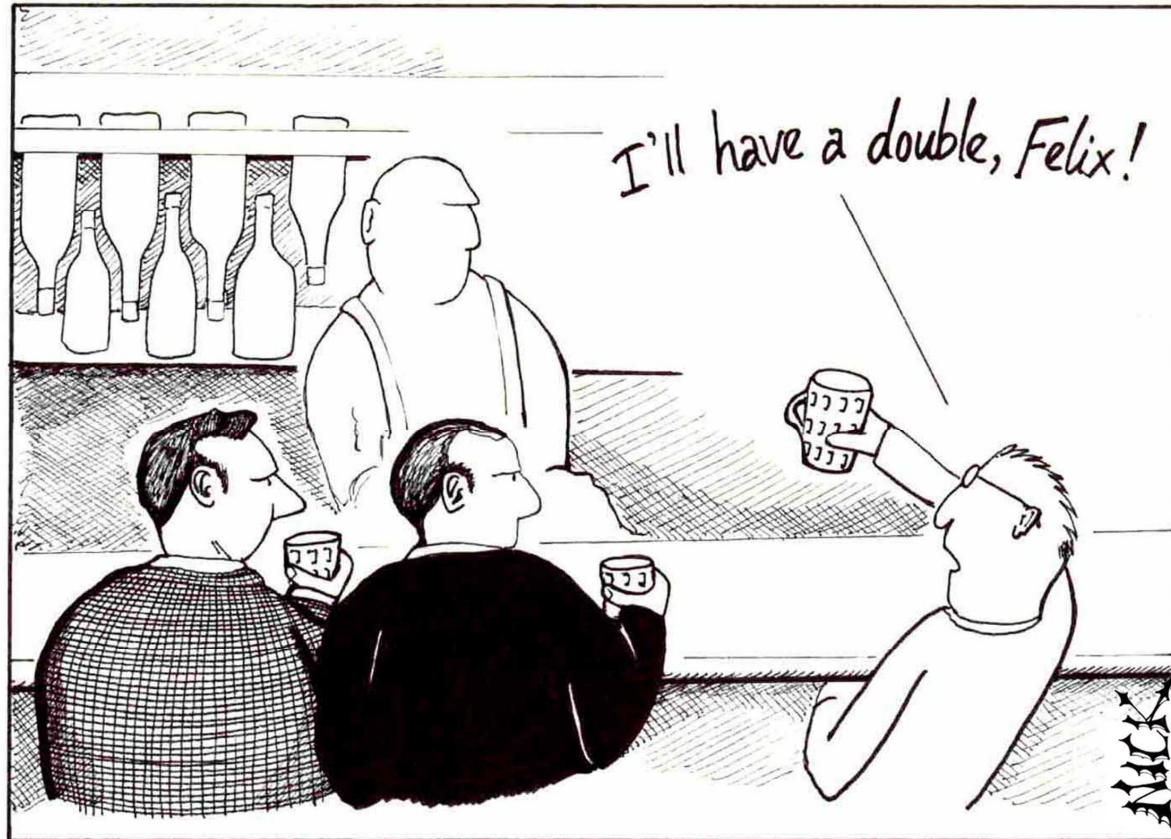
personalized medicine

- >...can these concepts be compatible ..?
 - EBM is built on robust group (populational) statistics, which has led to treatment protocols
 - » *whereas personalized medicine operates with rate of deviation from „group average“*

- >>?...relevance of studying personalized medicine using standard clinical trial methodology
 - *...back to studying „personifiable“ variations...*

 - **to adopt some degree of toxicity as efficacy marker...?**

*...one sometimes needs to find the place to get
inspired*



Cambridge, 1953. Shortly before discovering the structure of DNA, Watson and Crick, depressed by their lack of progress, visit the local pub.