



Farmakogenetické a prediktivní aspekty protinádorové chemoterapie:

historie, současnost a možnosti dalšího rozvoje

D a l i b o r V a l í k

Masarykův onkologický ústav, Brno
LF FÚ ACIU, Brno
Klinika dětské onkologie LF MU, Brno

nežádoucí účinky terapie *(Lazarou et al., JAMA 1998)*

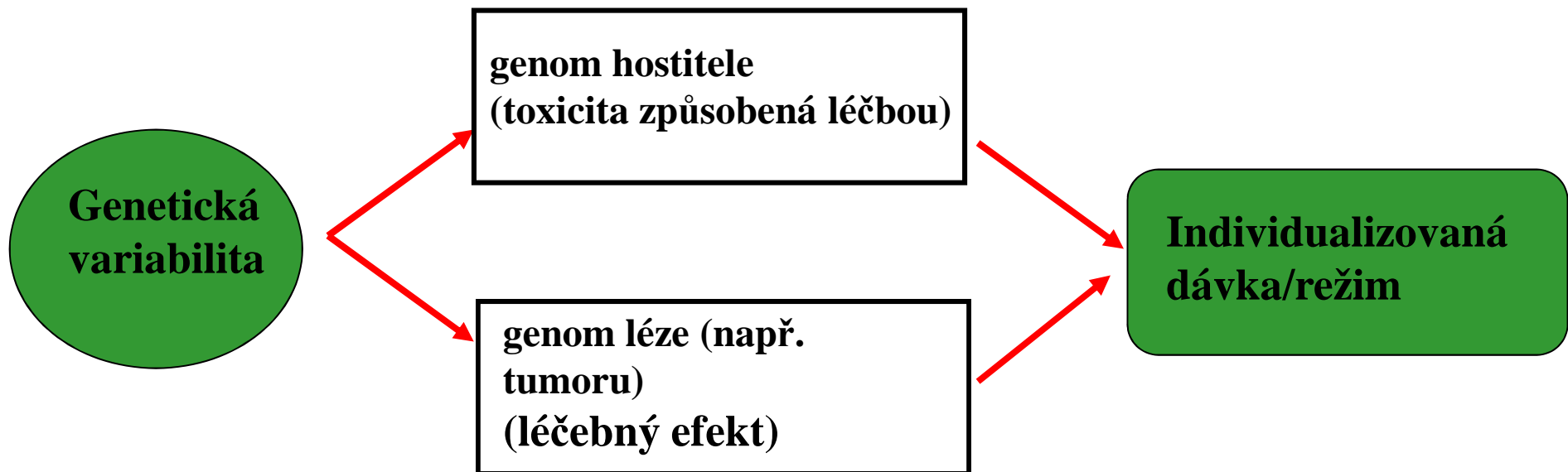
*(závažné nežádoucí účinky:
...definované jako ty, které vyžadují hospitalizaci nebo trvale poškodí
pacienta nebo vyústí v jeho smrt)*

» = adverse drug reactions (ADR)

» ...v roce 1994, v úhrnu 2,216,000 hospitalizovaných pacientů v USA mělo závažnou ADR and 106,000 zemřelo na ADR...

Faktory variability v odpovědi na na xenobiotikum:

- věk
- pohlaví
- dieta
- **funkce orgánů**



- významné osobnosti, data a koncepty
 - ...*osobnosti a data*
 - Mendel (1873)
 - » pojem dědičného transmisivního „faktoru“, ...dnes genu
 - Garrod (1902)
 - » pojem chemické individuality
 - Motulsky (1958)
 - » fúze biochemie, farmakologie a genetiky
 - Vogel (1960)
 - » 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*

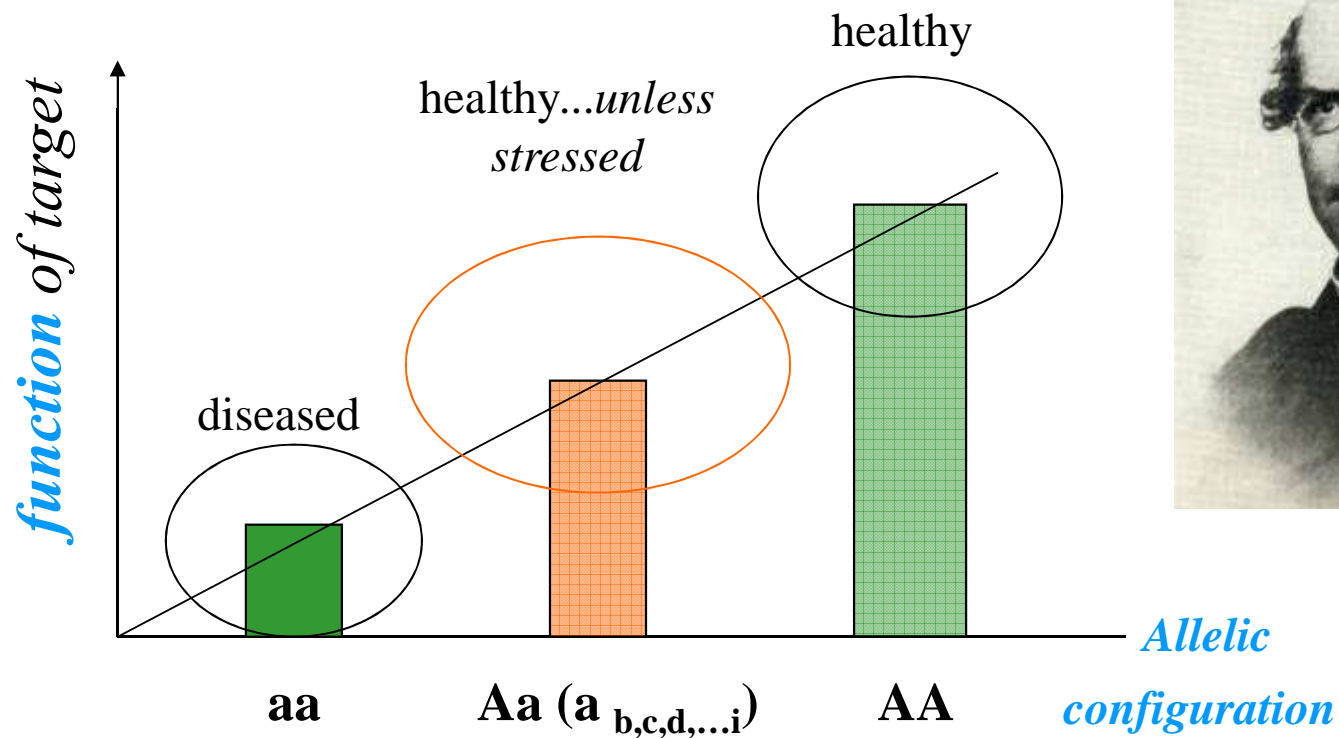
» *...if we knew enough, every gene would be assigned a specific chemical effect in the body*

– „reakce fáze I a II“.

» *Williams, 1963*

pharmacogenetics through perspective of metabolic diseases

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



(Valik AACCC, Baltimore, 2003)

DÁVKOVÁNÍ TERAPIE:

...BĚŽNÁ KLINICKÁ PRAXE

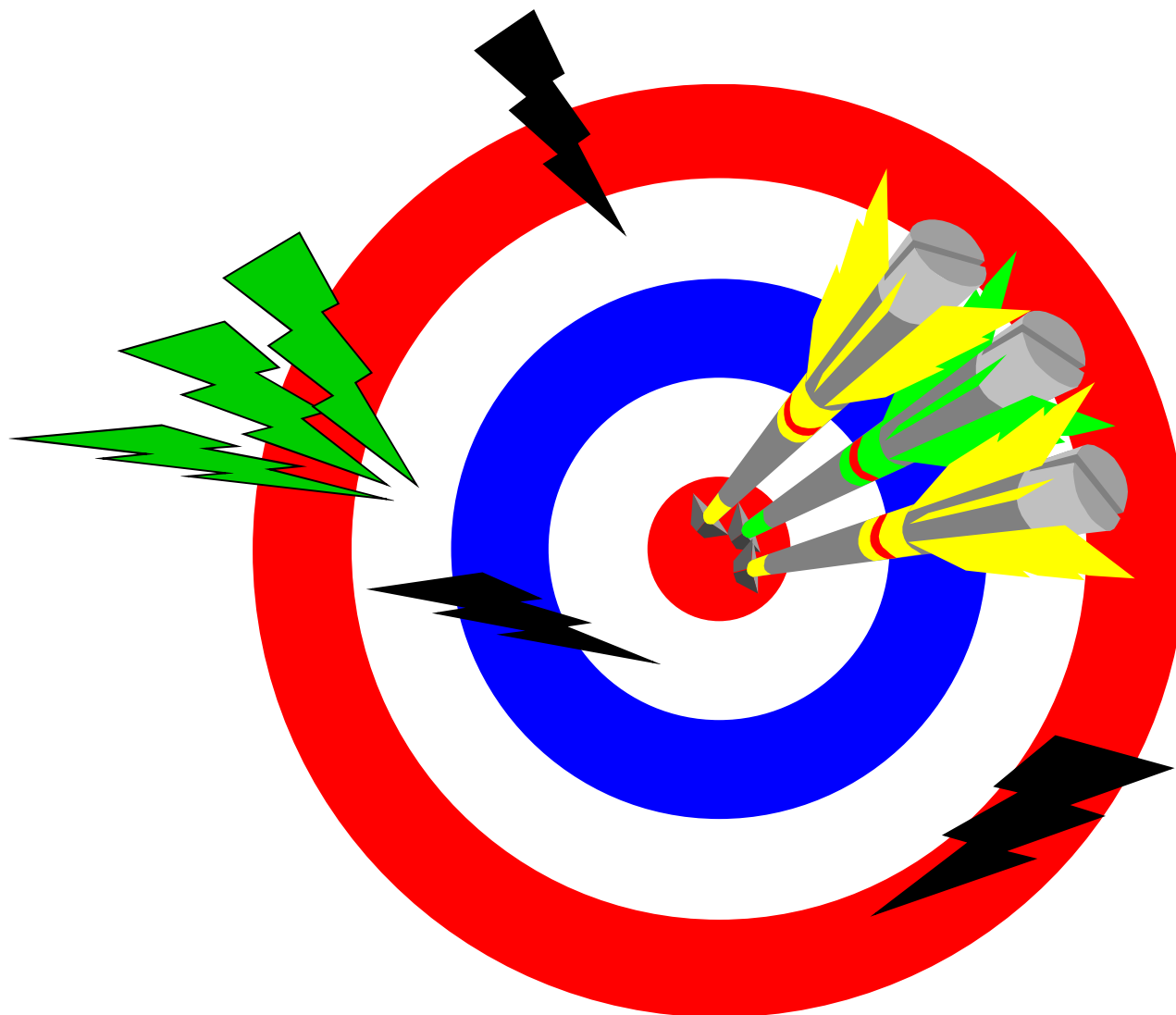
stanovení dávky vychází v naprosté většině případů z přepočtu na tělesný povrch pacienta

- (BSA - Body Surface Area)
- *...co hůře, někdy dokonce hmotnost*

LIMITY ??

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

„přesnost versus správnost“



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

akronym LADME v osudu léčiva

- **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:

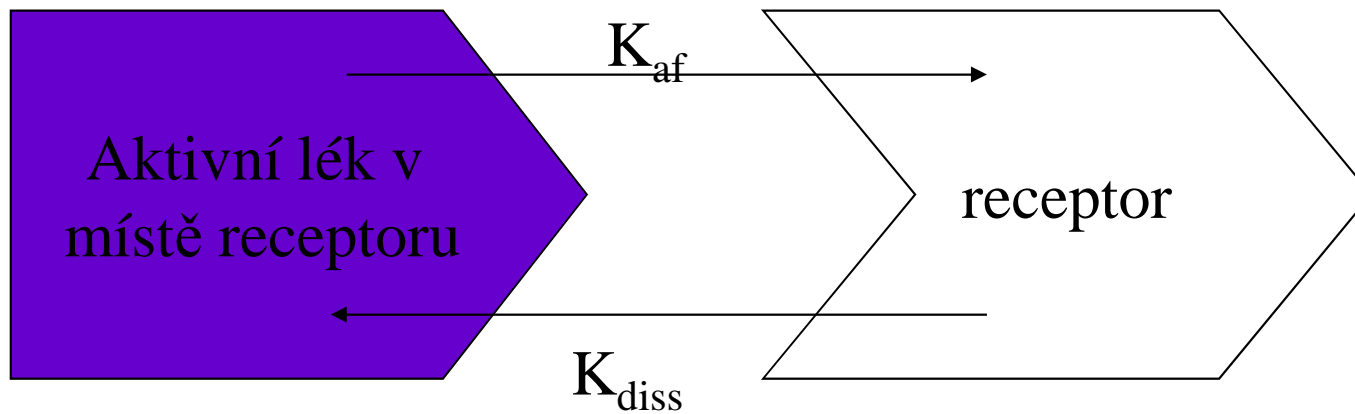
• **-OH, -NH₂, -SH**

• 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

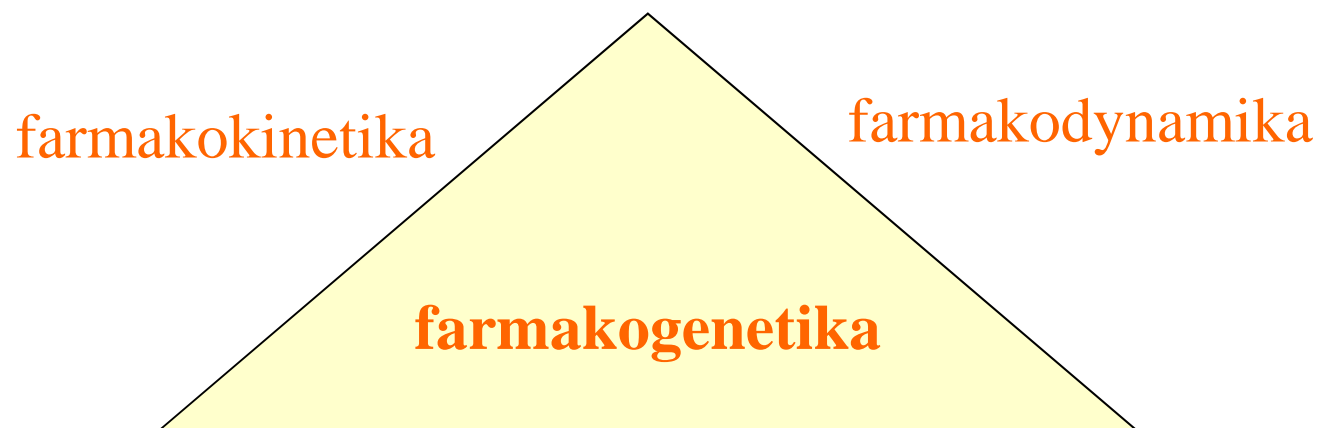


Farmakogenetika

Zabývá se individuálním genetickým vlivem na:

farmakokinetiku (polymorfní metabolické enzymy)

farmakodynamiku (polymorfní receptor)



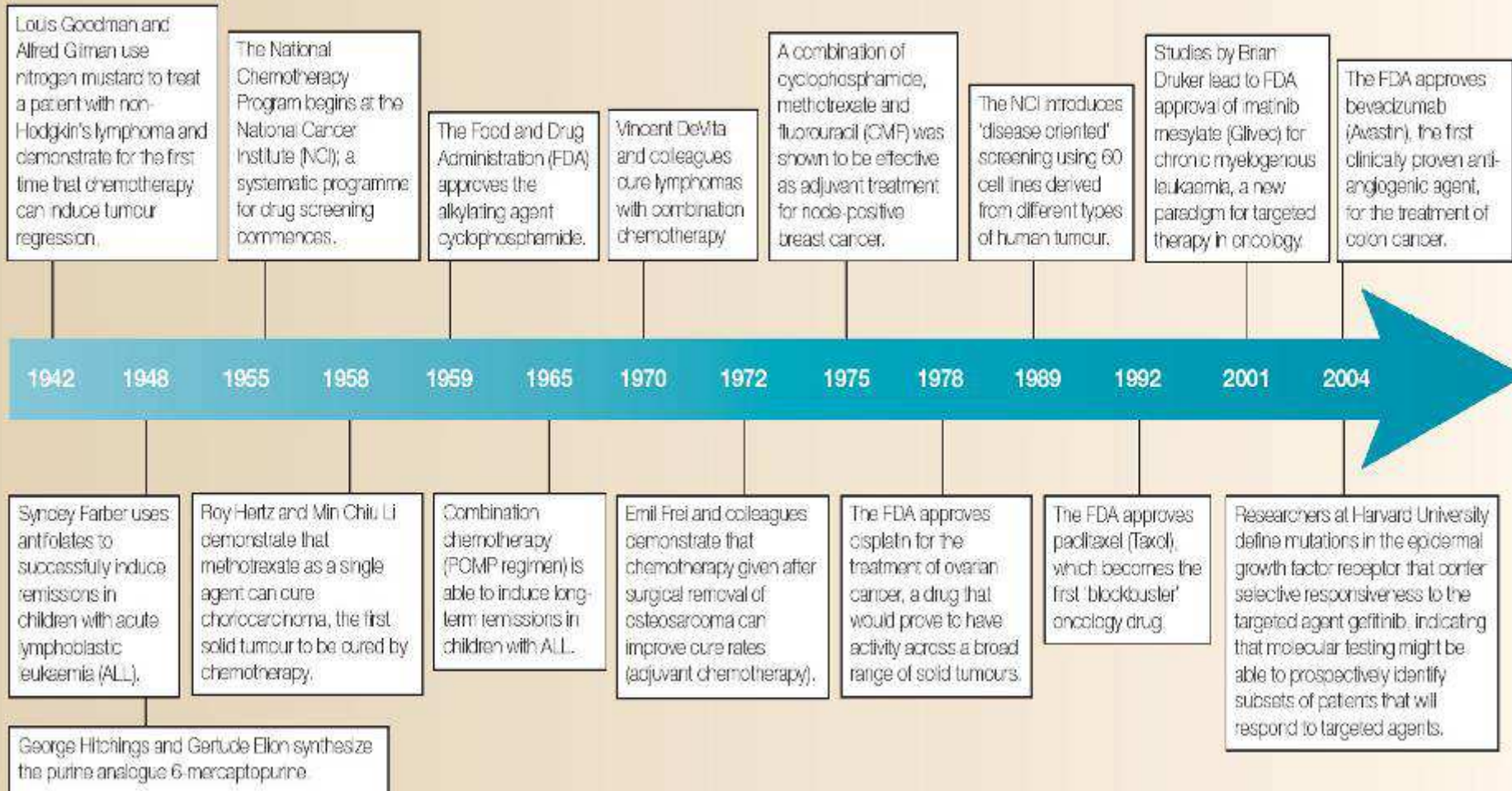
kde nás farmakogenetika může zajímat

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

...protinádorová chemoterapie
= „řízená toxikologie“

- ...v zásadě všechny protinádorové léky mají *úzké terapeutické rozmezí*

Timeline | The history of chemotherapy



hovoříme-li o “personalizaci” medicíny:

..pojmy: i) odpověď hostitele versus
ii) odpověď léze

- odpověď hostitele:
 - označujeme jako *farmakogenetiku/genomiku*
- odpověď tumoru:
 - označujeme spíše jako „*prediktivní onkologii*“

...i) pacient jako hostitel

– v zásadě lze zlikvidovat jakýkoli nádor, jestliže jej vystavíme dostatečné expozici cytotoxickým látkám

- *...takový koncept je ale stěží kompatibilní s dávkováním „in vivo“ umožňujícím přežití hostitele*

– ...přesto se objevila schémata jako „dose escalation concepts“ vedoucí k tzv. **high-dose chemoterapii**

...ii) tumor jako cíl

- „cílená terapie“,
 - *fokusovaná na selektivní determinanty přítomné nebo aktivní v tumoru, nikoli v normální tkáni*
 - *...cave !! recentní události s EPO...*
 - seznam používaných látek se rozšiřuje
 - *herceptin jako prototypový lék*

... klinický problém: *četné komorbidity interferující s protinádorovou léčbou*

- hypertenze
 - diabetes mellitus
 - dyslipidémie
 - onemocnění srdce a mozkové příhody
 - chronické onemocnění ledvin
 - požívání léků alkoholu a parafarmaceutických preparátů
 - virové infekce a jejich následky (hepatitis, etc)
- *většinou mající nepříznivý vliv na funkci **parenchymových orgánů** důležitých v metabolismu*
- *a současně*
 - *vedoucí k **polymedikaci***
-významné u starších nemocných

...tzn. v současnosti před námi stojí

- *polygenní modely s významnou negenetickou komponentou*

– (typicky: *chronické choroby parenchymových orgánů*)

– „multiple mechanisms influence a single trait“

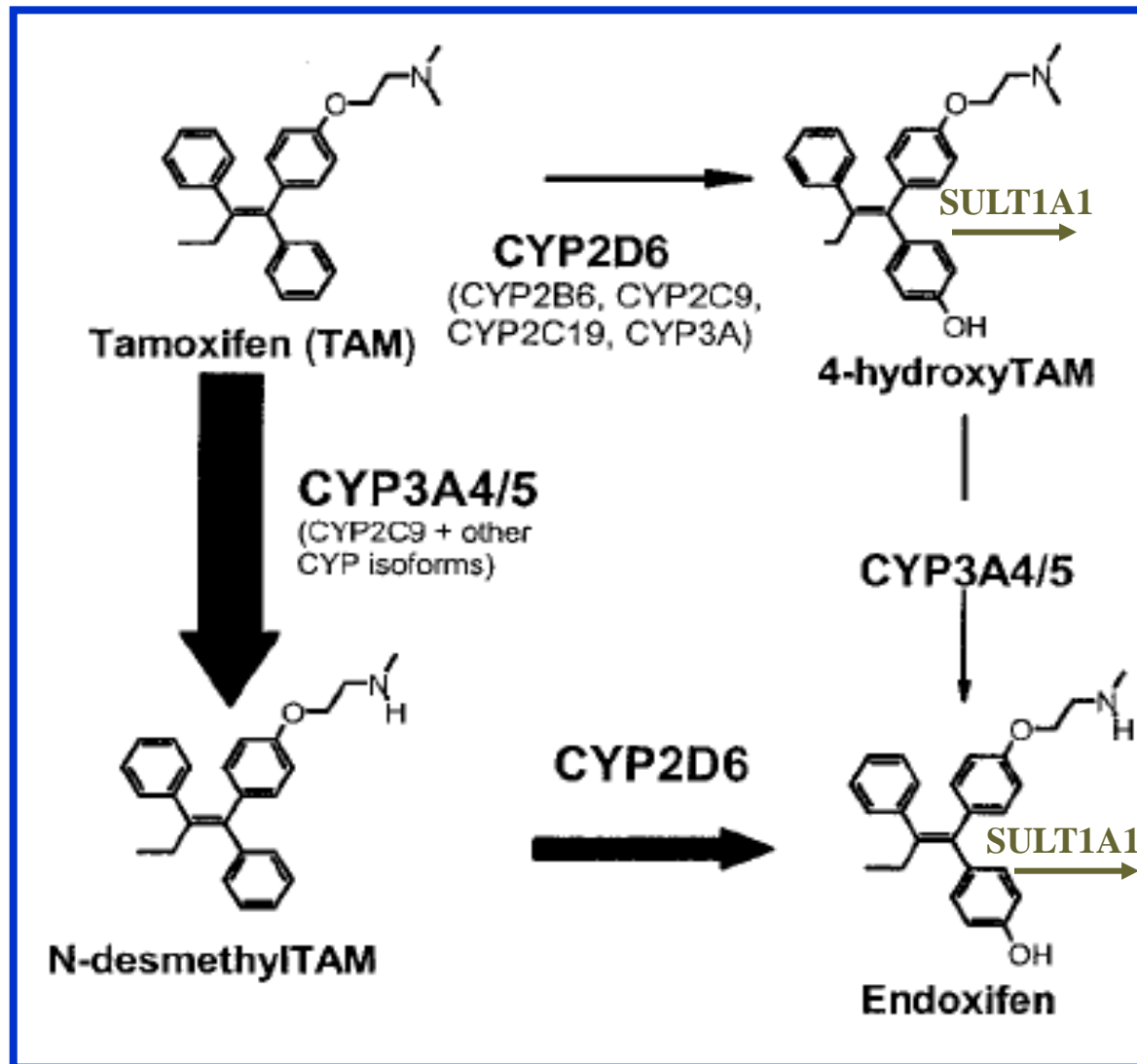
– „...SNPs probably not enough...“ (*W.Evans, AACCC 2007*)

*...příklady hlavních farmakogenetických
determinant protinádorové chemoterapie*

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****

Tamoxifen Prodrug Metabolism



Goetz, M. P. et al. J Clin Oncol; 23:9312-9318 2005

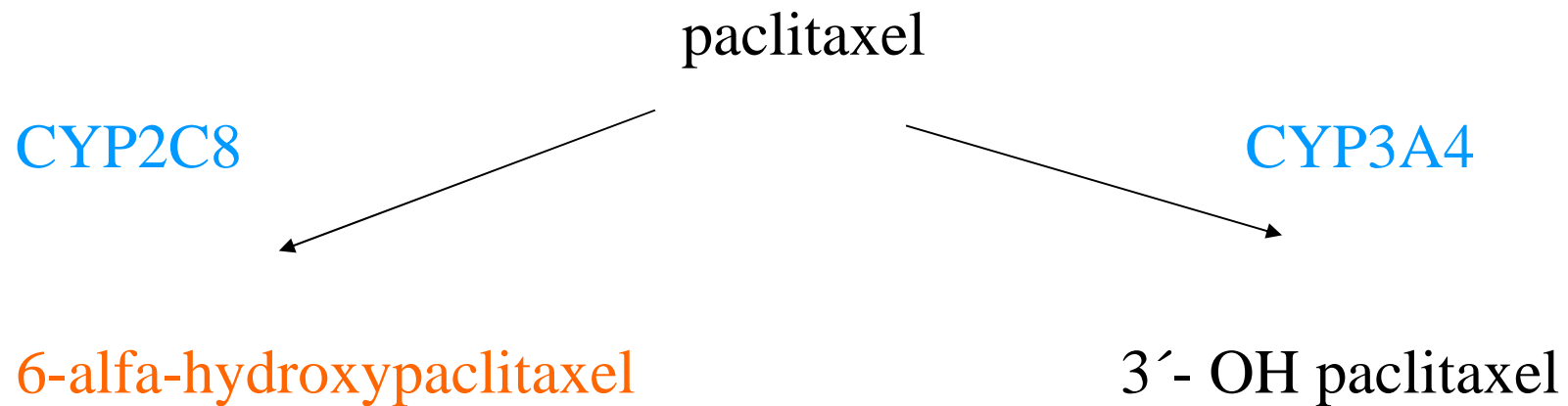
CYP 3A4

- 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



UGT1 a IRINOTECAN, CPT 11

- derivát camptothecinu, inhibice topoisomerázy I

irinotecan



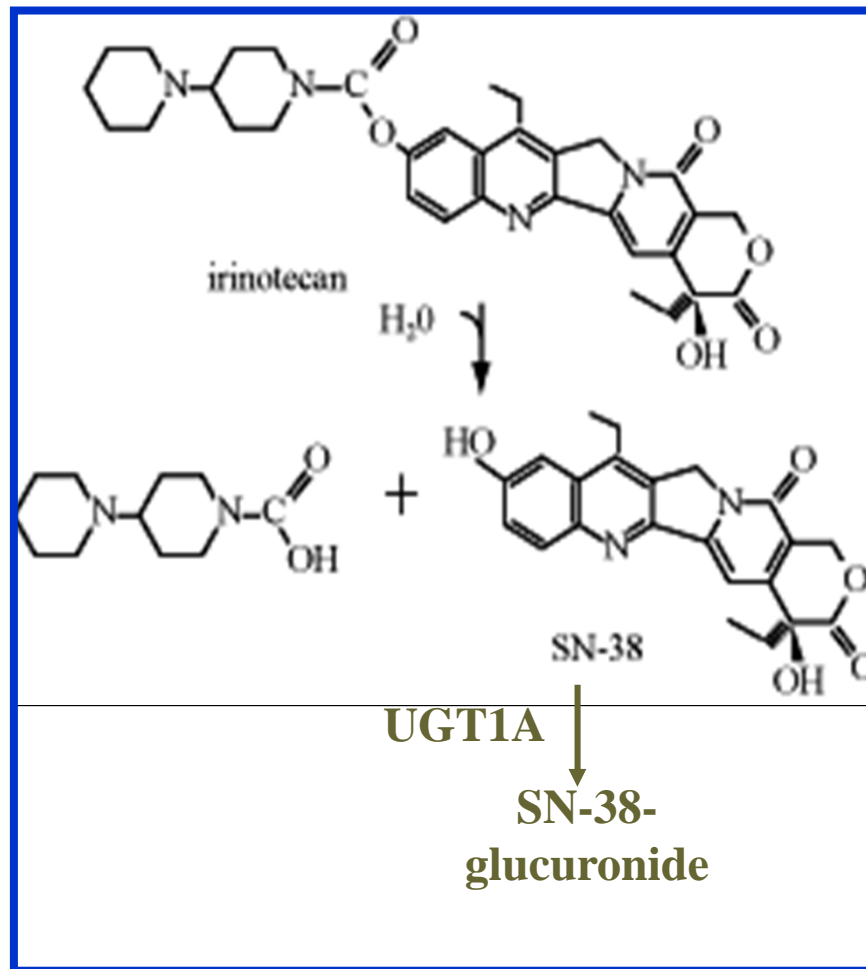
karboxylesteráza

SN38



UGT 1A1

SN38 glukuronid



DIHYDROPYRIMIDINDEHYDROGENÁZA

- 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....

...naše projekty

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

Fluoropyrimidiny v terapii kolorektálního
karcinomu:
data MOÚ

plasma AUCs (5-FU, DHFU)

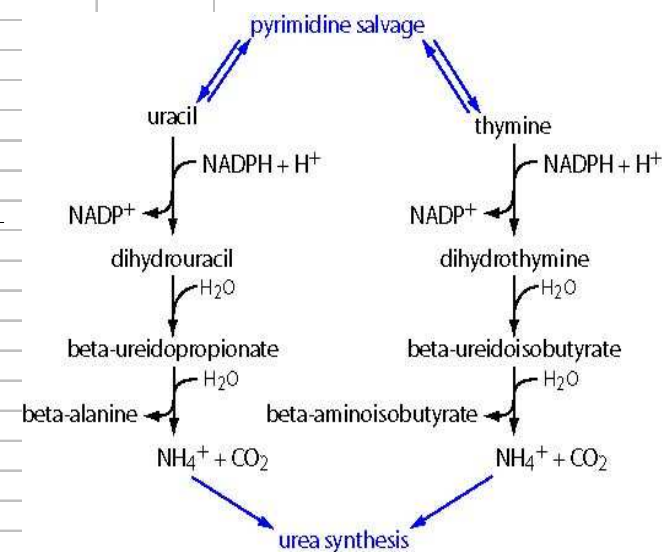
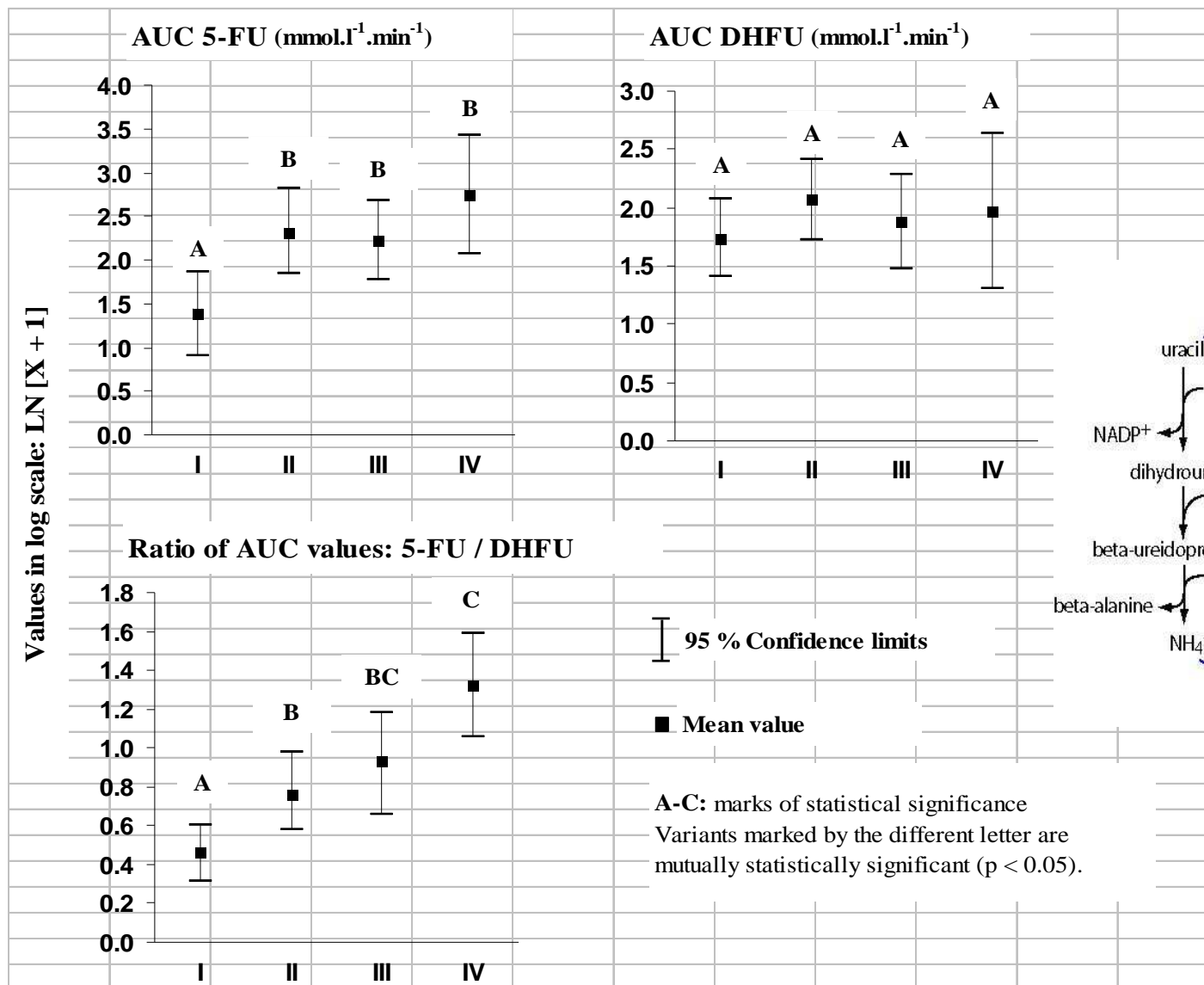


Table 5. Genomic data in relation to CHT-related adverse effects (pilot examination, N = 23)

	Adverse effects severity score ¹ - all % calculated within columns -		p level ²
	I-II (N = 8)	III - IV (N = 15)	
Total number of mutations per patient			
1	0 %	20 %	0.180
2 - 3	50 %	40 %	
4 - 5	50 %	40 %	
Exon sequence variants³			
Exon 2			
c. 85 T>C (T85C)	75.0 %	40.0 %	0.127
Exon 6			
c. 496 A>G (A496G)	75.0 %	40.0 %	0.103
Exon 7			
IVS7-118 A>G	50.0 %	46.7 %	0.878
Exon 23.3A			
c. 3947 G>A (G3947A)	75.0 %	46.7 %	0.126
Exon 23.3B			
c. 3959 C>T (C3959T)	75.0 %	53.3 %	0.185
c 4079 T>C (T4079C)	0 %	6.7 %	
c. 4059 T>C (T4059C)	0 %	6.7 %	

¹ Score aggregating frequency and grade of toxic events, increasing from degree I (no toxic effects of CHT) to IV (severe effects of high grade, elevated in time); see also Table 2.

Groups III and IV were summed due to similarity of data.

² p level of applied statistical tests: M-L χ^2 test for association between genomic data and toxicity scoring

³ Only exons with relatively frequent mutations that allow statistical processing are included.

komentář k průběžným výsledkům ...

- **nejlepším indikátorem toxicity byla AUC_{5-FU}/AUC_{DHFU}**
 - nejde bohužel o *prediktivní* test
 - » *je to ale pravděpodobně jediný test schopný také odhalit deficienci DHP (van Kuilenburg, Clin.Cancer Res, 2003)*
- **pozorovali jsme významnou interindividuální variabilitu v genu pro DPYP**
 - *avšak bez vztahu ke klinicky manifestní toxicitě*
- **studie je prospektivní > shromaždíme data o vztahu k efektu**

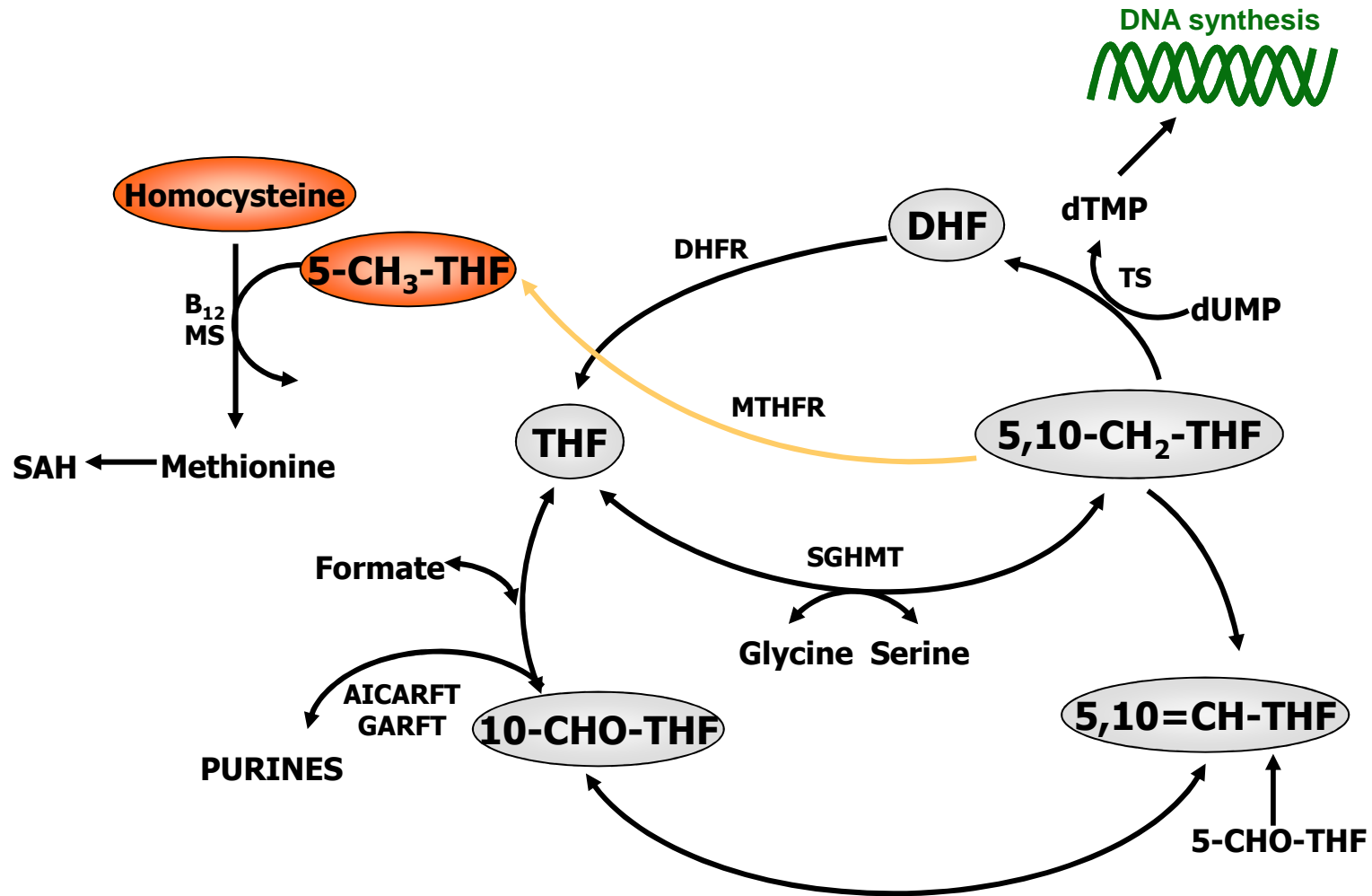
Biomarkery odpovědi na terapii v dětské onkologii

high-dose methotrexate

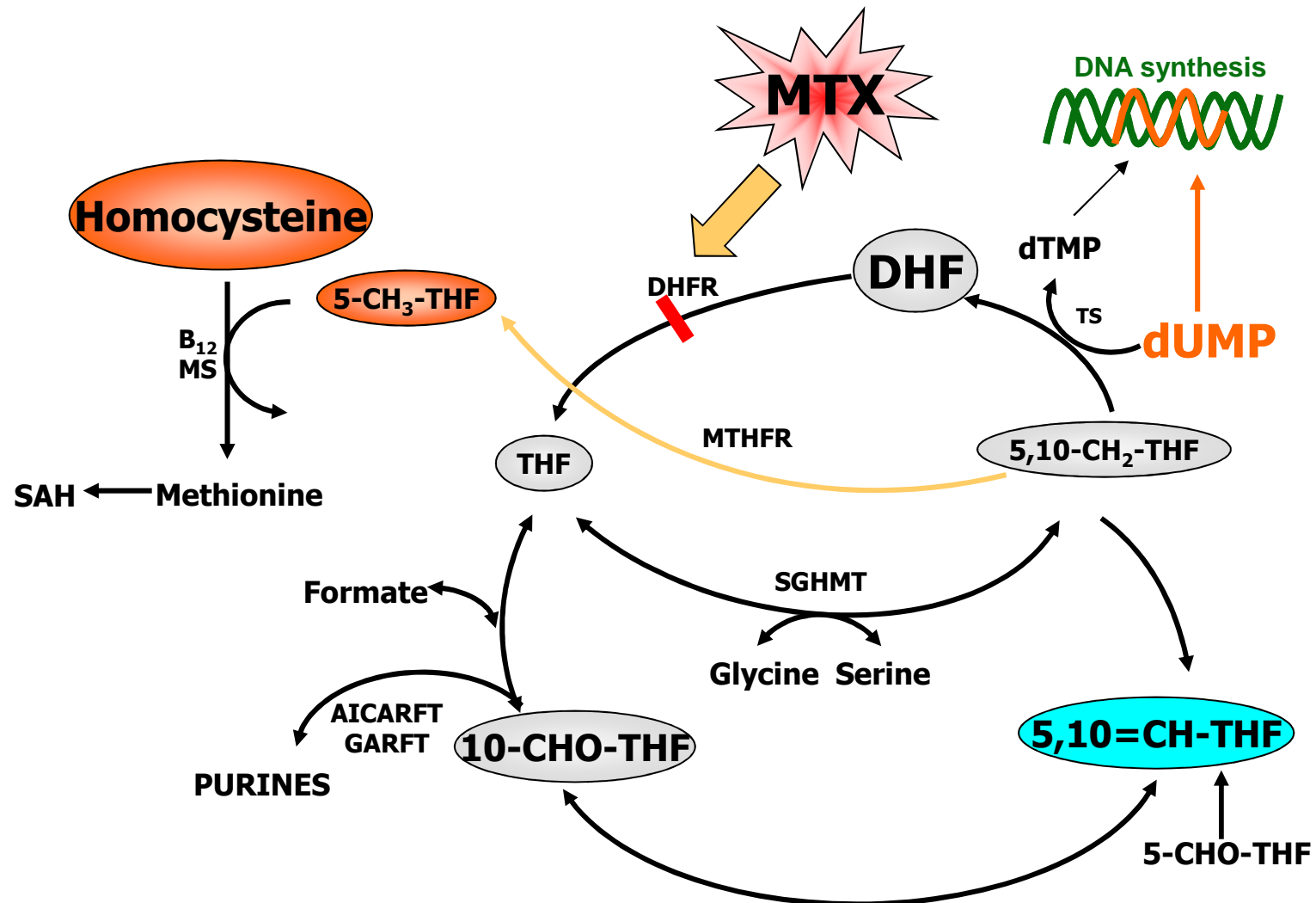
úroveň studia:

*genetická – MTHFR ,
proteomická – SELDI-TOF ,
metabolomická – plasmatické biomarkery
celulomická – exprese p53*

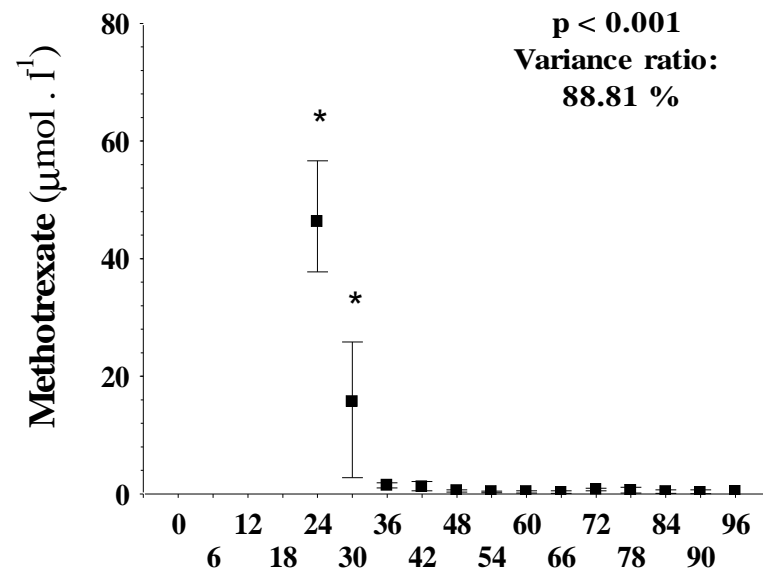
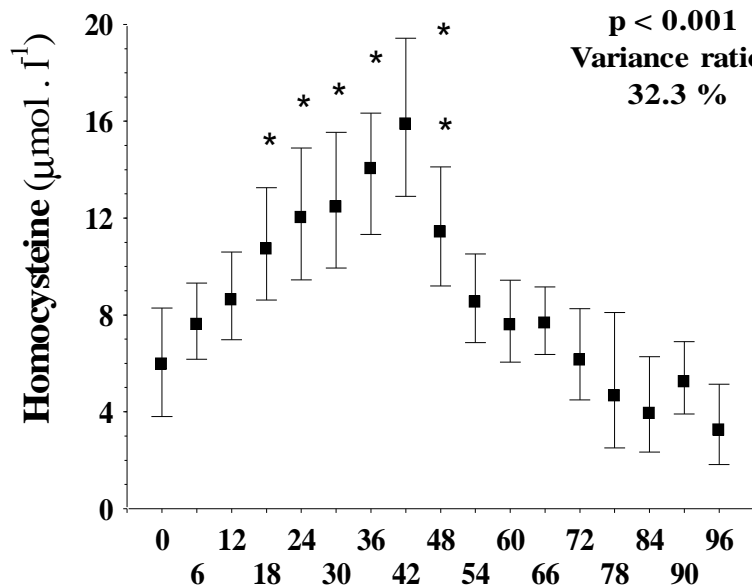
...souhrn fyziologie folátů



...po podání methotrexátu



BLOCK 1



BLOCK 2

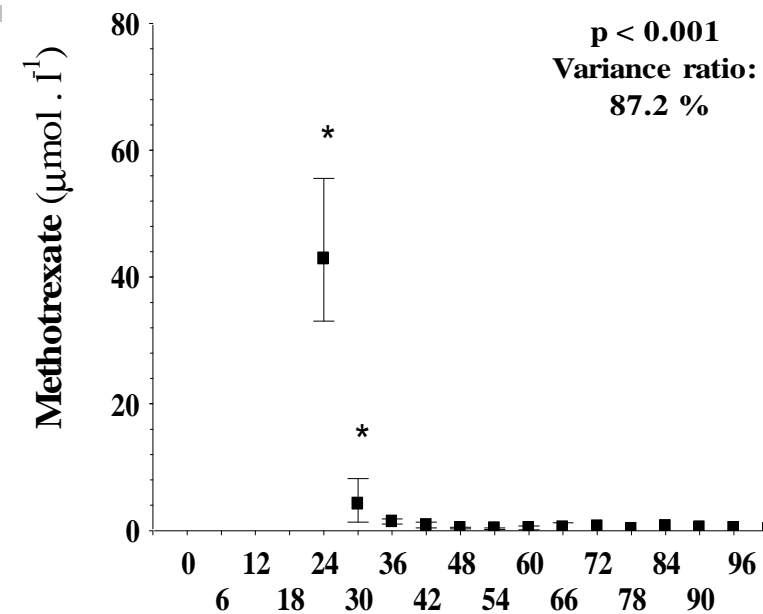
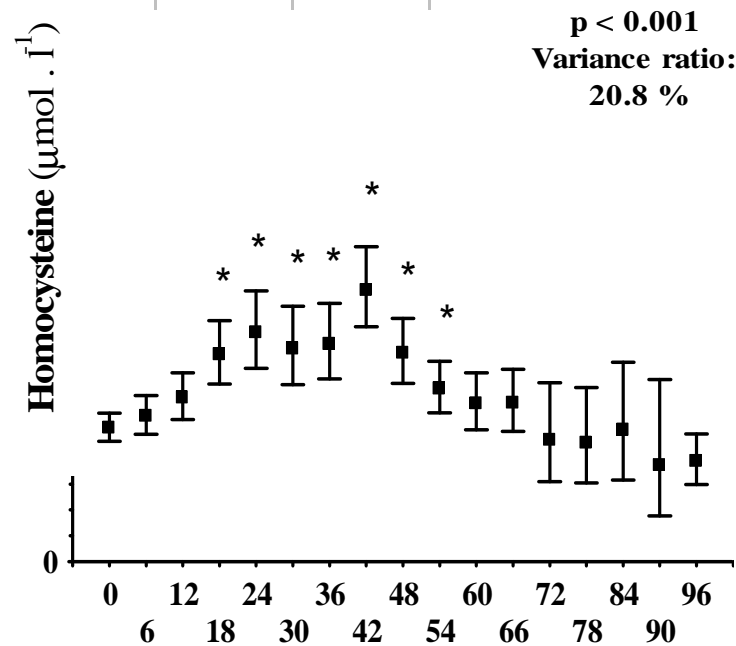
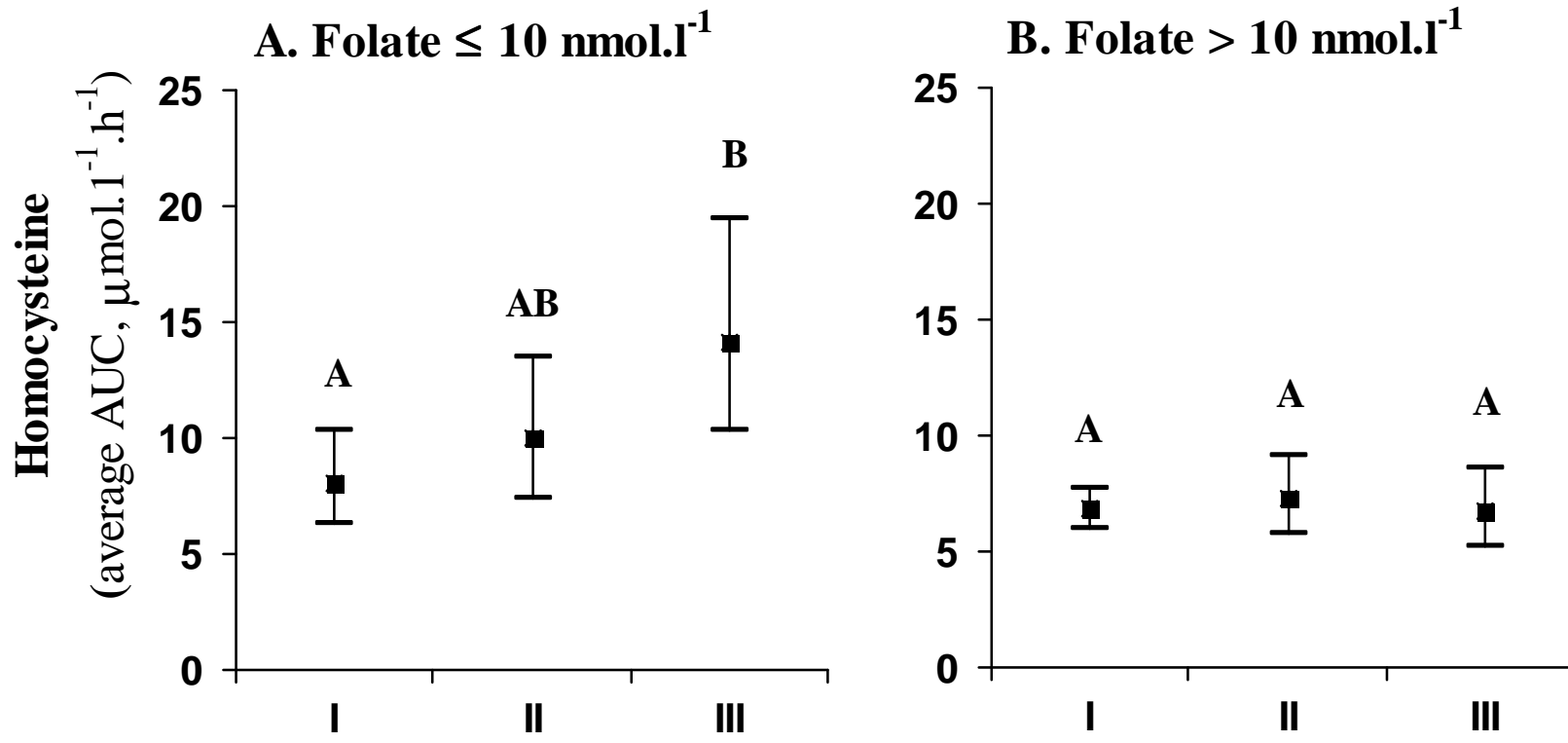


FIGURE 1A

┆ 95 % Confidence limits

■ Geometric mean



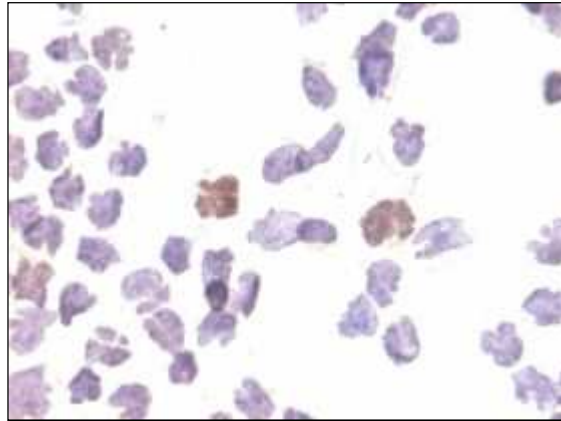
Methotrexate (average AUC total, $\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{h}^{-1}_{0h-?}$)

I. < 1000 ; **II.** $1000 - 1599$; **III.** ≥ 1600

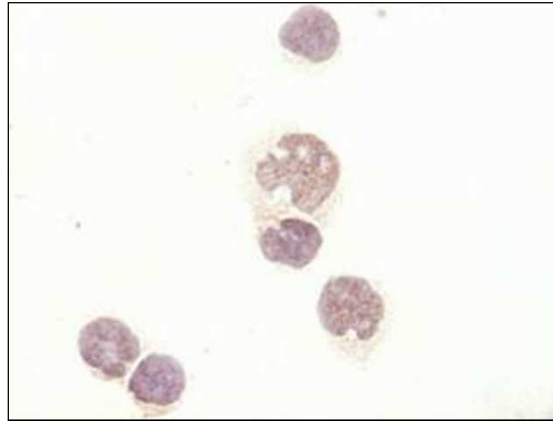
I 95 % Confidence limits

■ Geometric mean

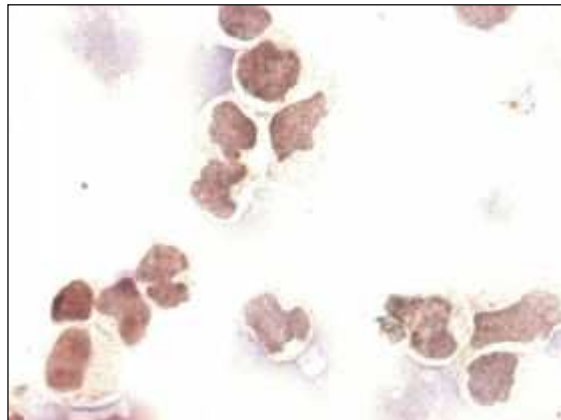
ex vivo induction of p53 (bone marrow blast cells, prior to any therapy)



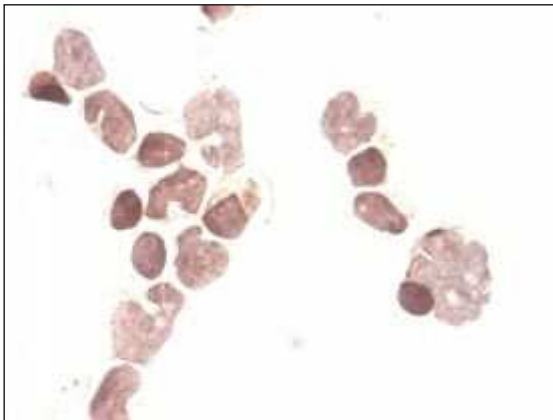
Control, 0 hrs.



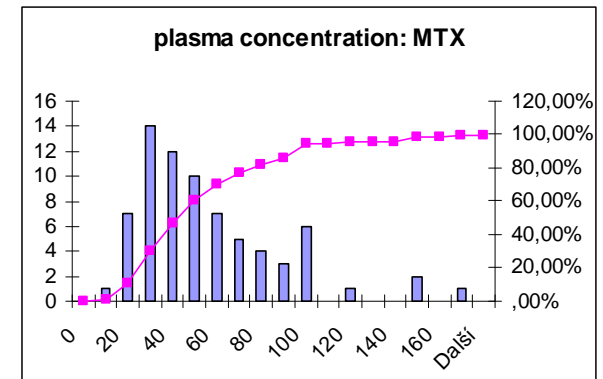
Control, 24 hrs.



Methotrexate 40μmol, 24hrs.



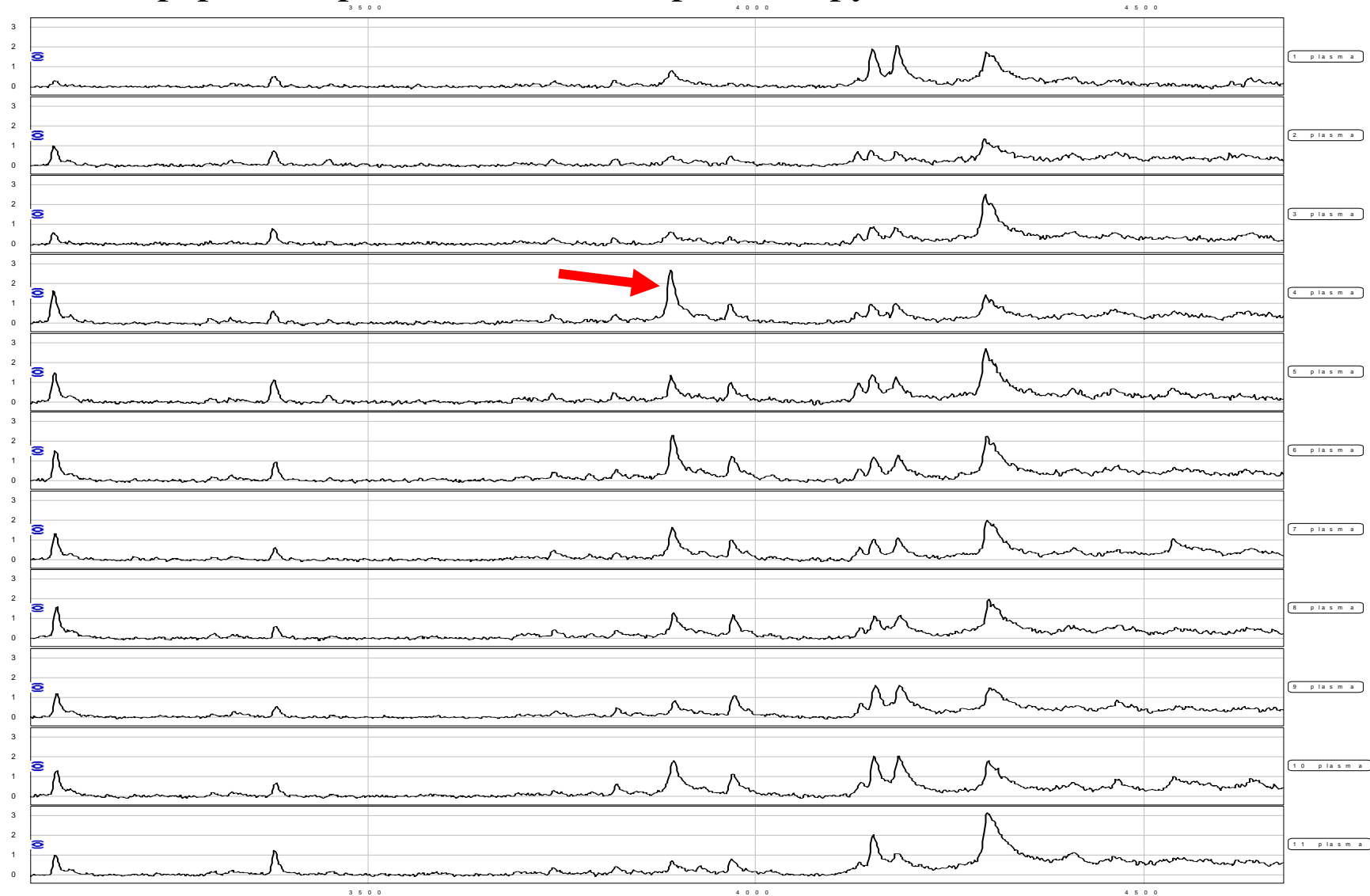
Methotrexate 120μmol, 24 hrs.



SELDI TOF mass spectrometry Chip CM10, pH = 6, : plasma specimens during MTX administration;

apparent difference at the molecular weight 3800Da.

This new peptide or protein is induced upon therapy with HDMTX



Skarby TV, et al: High leucovorin doses during high-dose methotrexate treatment may reduce the cure rate in childhood acute lymphoblastic leukemia.

Leukemia. 2006 Nov;20(11):1955-62.

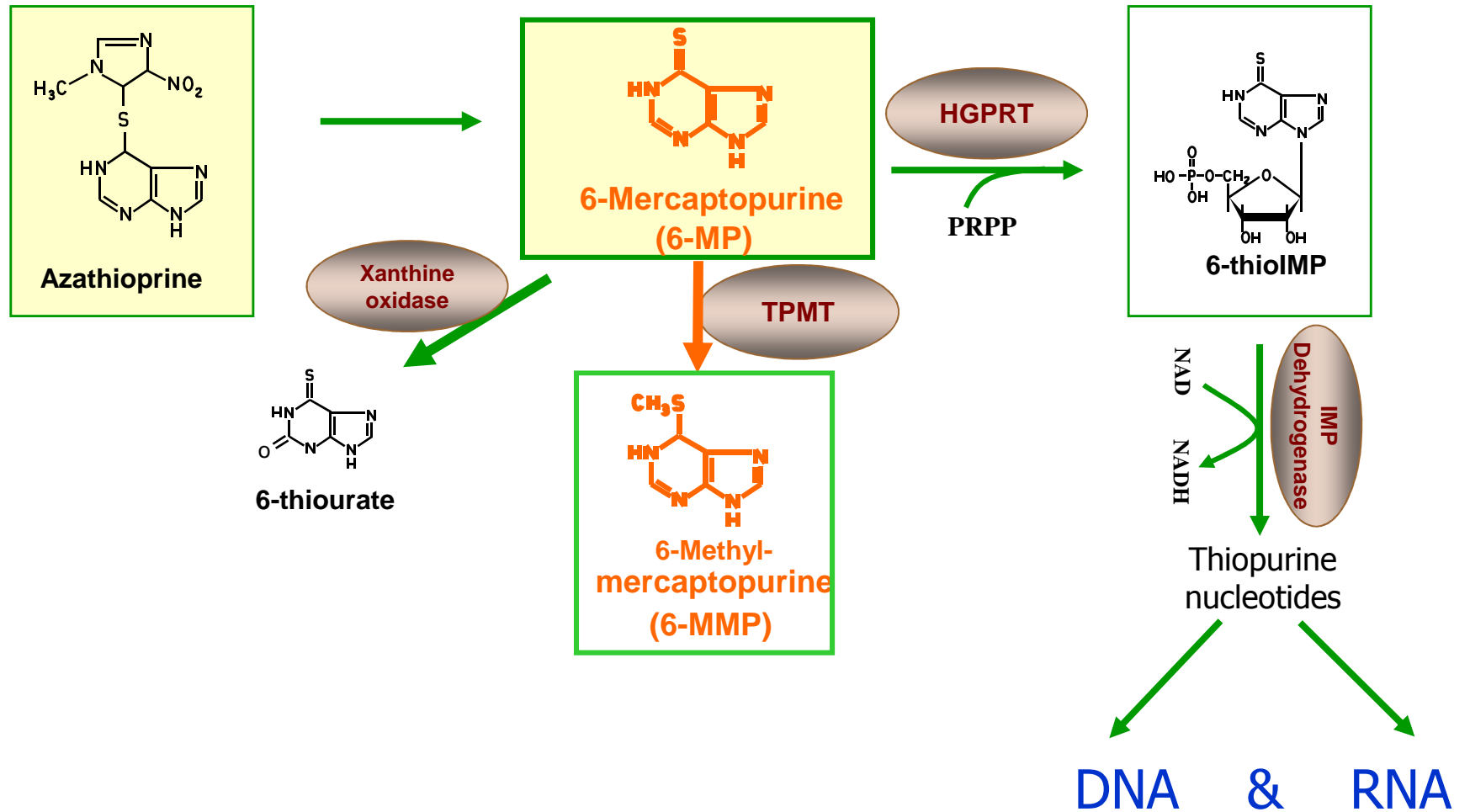
- HDMTX treatment of 445 children with ALL.
- ...that **high LV dose is related to higher risk for relapse. Doubling of the LV dose increased the relapse risk by 22% (95% confidence interval 1-49%, P = 0.037).**
- ...results suggest that high doses of LV increase the risk for relapse despite the fact that they were correlated with high MTX levels and longer MTX elimination time.

“...Our philosophy [is] that chemotherapeutic agents are not only ends in themselves but also serve as tools for unlocking doors and probing Nature’s mysteries”

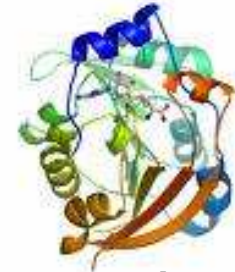
Dr. Gertrude Elion Nobel lecture 1988



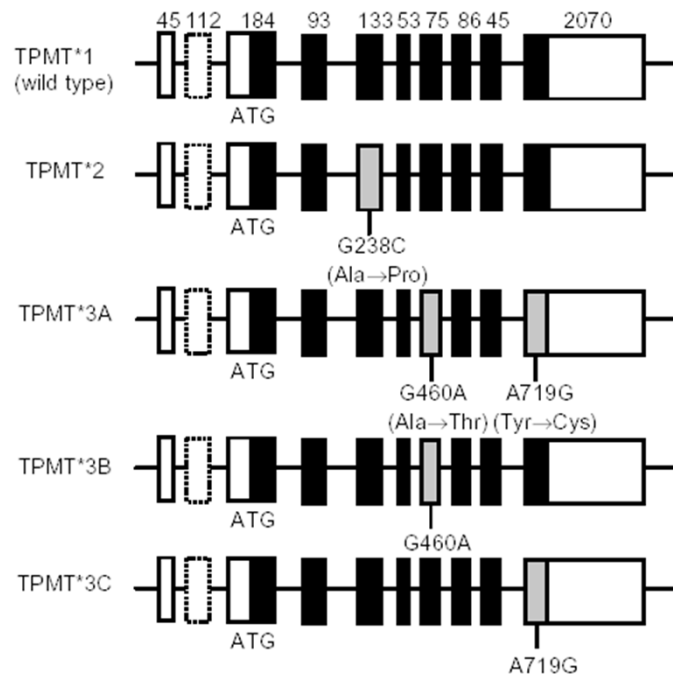
Metabolism of 6-MP



TPMT (Thiopurin S-methyltransferáza)



- **deficit** či **snížená enzymová aktivita** (1:300) - důsledek přítomnosti funkčních polymorfismů v kódující oblasti genu TPMT (6p22.3)
 - v bělošské populaci 89% osob normální aktivita a 11% snížená aktivita
 - do dnešní doby popsáno 27 funkčních polymorfismů
 - nejčastěji se vyskytují deficitní alely označované **TPMT*3A** (55%), **TPMT*3C**, **TPMT*2** a méně častá **TPMT*3B**

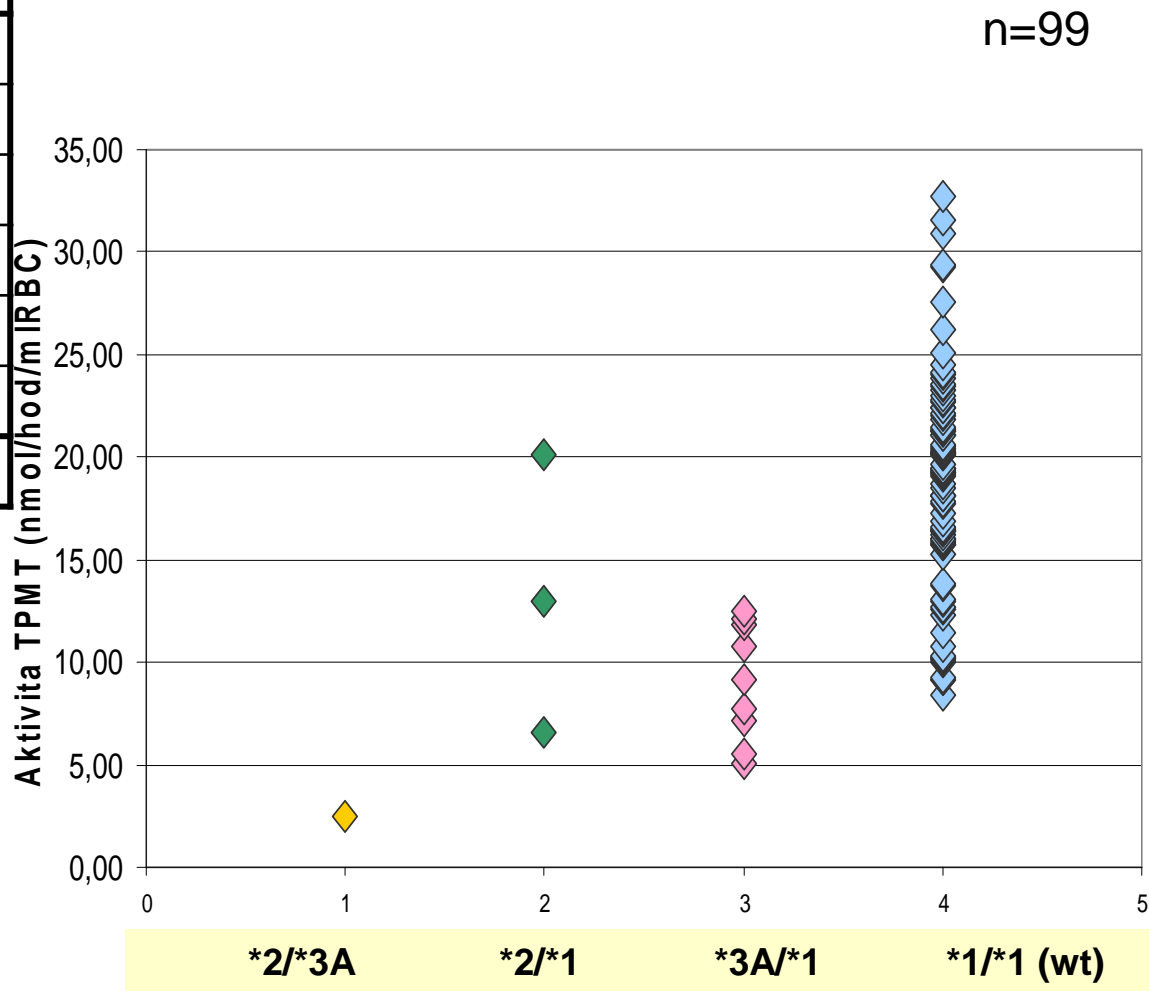
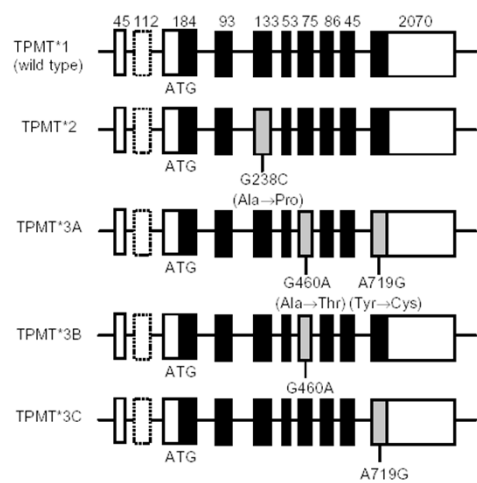


Gen TPMT má délku 34 kb, skládá se z 10 exonů a 9 intronů a je lokalizován na chromozomu 6p22.3
Mezi nejběžnější polymorfizmy patří G238C, G460A, A719G

Předpokládá se značná míra korelace genotypu TPMT s fenotypem, který byl stanoven měřením erytrocytární TPMT aktivity

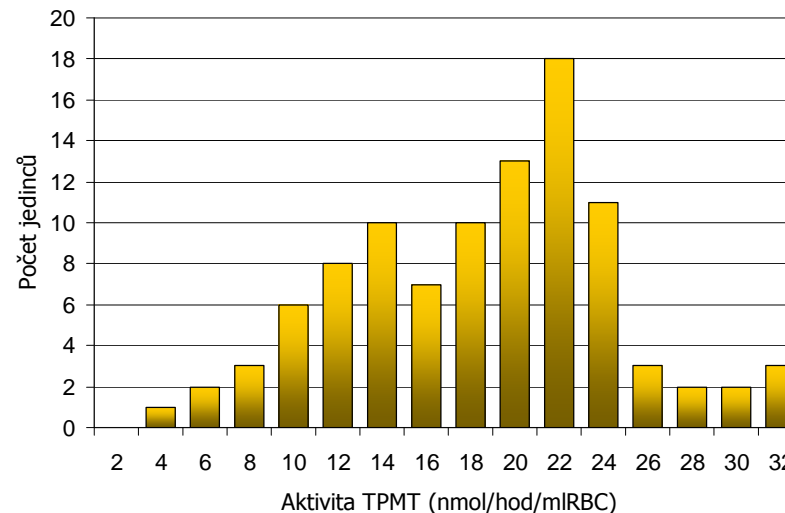
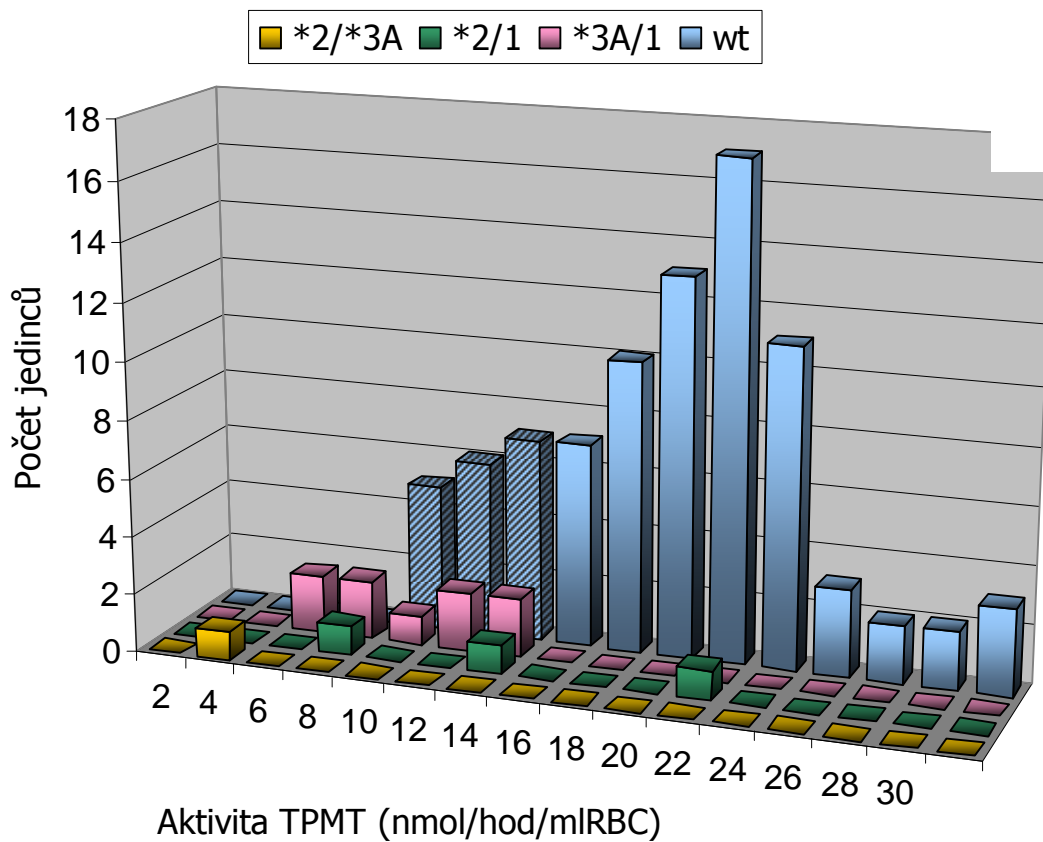
Rozložení aktivity enzymu TPMT v našem souboru v závislosti na zjištěném genotypu

Genotyp TPMT	Počet pacientů
*1/*1 (wt)	86 (87%)
*2/*1	3 (3%)
*3A/*1 (*3B/*3C)	9 (9%)
*3A/*2	1 (1%)
*3B/*1	0 (0%)
*3C/*1	0 (0%)
Celkem	99



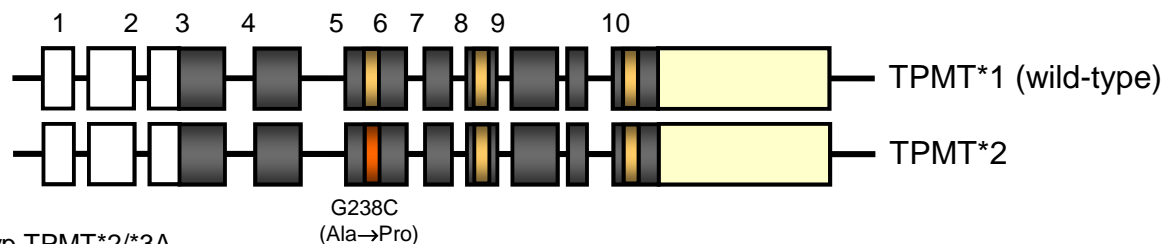
Rozložení aktivity enzymu TPMT v závislosti na zjištěném genotypu

n=99

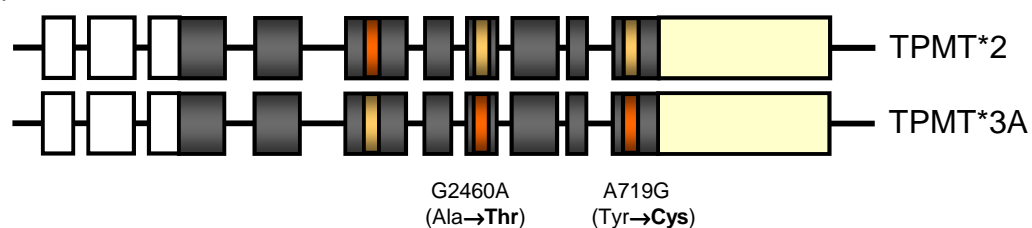


Vzhledem k tomu, že uvedené polymorfizmy a nerovnoměrné rozložení aktivity TPMT v populaci může způsobovat velké rozdíly v účinnosti léčby, je komplexní farmakogenetické vyšetření zahrnující stanovení aktivity TPMT a příslušného genotypu před začátkem léčby velmi dobrým nástrojem pro určení vhodného dávkování léčiva.

Otec pacienta – genotyp TPMT*1/*2



Pacient – genotyp TPMT*2/*3A



Gen TPMT má délku 34 kb, skládá se z 10 exonů a 9 intronů a je lokalizován na chromozomu 6p22.3. Šedé úseky znázorňují exony s otevřeným čtecím rámcem, bílé úseky pak nepřekládající se části genu, zelené boxy jsou vyšetřované lokusy v exonu 5, 7, a 10, oranžové boxy představují lokusy, kde byla detekována mutace. Otec pacienta je nositelem mutace TPMT*2 (asociována se sníženou aktivitou enzymu) - heterozygotní genotyp TPMT*2/*1 s aktivitou enzymu 13,4 nm/hod/ml_{RBC}. Pacient je složený heterozygot pro všechny tři sledované mutace v genu TPMT. Výrazně snížená aktivita TPMT (2,4 nmol/hod/ml_{RBC}) koresponduje se zjištěným genotypem.



Search Mayo Medical Laboratories

Search

Home New User? Sign In

Test Catalog

Browse by Disease:

- # A B C D E F
- G H I J K L M
- N O P Q R S T
- U V W X Y Z

Browse by Test Name:

- # A B C D E F
- G H I J K L M
- N O P Q R S T
- U V W X Y Z

NEW TESTS

Search:

- Test Name
- Disease
- Everywhere
- Test Number

Go

Reset search tips >

Download test catalog

PRINT PAGE EMAIL PAGE

Search Results for Rochester catalog

Change catalog

91565 Overview: Promethus TPMT Genetics
 ... Customer Service. Client Welcome Center. About Us. Print Page Email Page. Print Friendly View Unit Code 91565: Promethus TPMT Genetics. ... Promethus TPMT Genetics ...

80291 Overview: Thiopurine Methyltransferase (TPMT), Erythrocytes
 ... Client Welcome Center. About Us. Print Page Email Page. Print Friendly View Unit Code 80291: Thiopurine Methyltransferase (TPMT), Erythrocytes. ... TPMT. ...



US005856095A

United States Patent [19]

[11] Patent Number: 5,856,095

Evans et al.

[45] Date of Patent: Jan. 5, 1999

[54] IDENTIFICATION OF TWO NOVEL
MUTANT ALLELES OF HUMAN
THIOPURINE S-METHYLTRANSFERASE,
AND DIAGNOSTIC USES THEREOF

[75] Inventors: William E. Evans; Eugene Y.
Krynetski, both of Cordova, Tenn.

[73] Assignee: St. Jude Children's Research
Hospital, Memphis, Tenn.

[21] Appl. No.: 514,921

[22] Filed: Aug. 14, 1995

[51] Int. Cl.⁶ C12Q 1/68; C12P 19/34;
C07H 21/04

[52] U.S. Cl. 435/6; 435/912; 435/810;
536/24.31; 536/24.33; 536/23.5; 935/8;
935/9; 935/78

[58] Field of Search 435/6, 912, 810;
536/24.33, 23.5; 935/8, 9, 78

Heim, M., and Meyer, U.A., "Genotyping of Poor Metabo-
lisers of Debrisoquine by Allele-Specific PCR Amplifica-
tion," *Lancet* 336:529-532 (1990).

Hollander, A.A.M.J., et al., "Beneficial Effects of Conver-
sion from Cyclosporin to Azathioprine After Kidney Trans-
plantation," *Lancet* 345:610-614 (Mar. 11, 1995).

Honchel, R., et al., "Human Thiopurine Methyltransferase:
Molecular Cloning and Expression of T84 Colon Carcinoma
Cell cDNA," *Molec. Pharmacol* 43:878-887 (1993).

Jin, A., et al., "New Restriction Endonuclease CviRI
Cleaves DNA at TG/CA Sequences," *Nucl. Acids Res.*
22(19):3928-3929 (Sep. 25, 1994).

Köhler, G., and Milstein, C., "Continuous Cultures of Fused
Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity," *Nature*
256:495-497 (1975).

Krynetski, E.Y., et al., "A Single Point Mutation Leading to
Loss of Catalytic Activity in Human Thiopurine S-methyl-
transferase," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:949-953 (Feb.
1995).

Krynetski, E.Y., et al., "High Yield Expression of Function-
ally Active Human Liver CYP2D6 in Yeast Cells," *Phar-*

závěr...farmakogenetické vyšetření statutu/dráhy TPMT

- Proč...?:
 - dávkování, toxicita
- Jak...?:
 - komplexním korelativním vyšetřením genotyp/fenotyp
- Je-li dostatečno...?:
 - není (!), pro úplnost je třeba ještě farmakodynamický parametr v čase, tj zde vyšetření thioguaninových nukleotidů v průběhu léčby

Farmakogenetika 2011...

kde pramení jistý skepticismus ...?

– **...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)

– **...faktor času:**

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

evidence-based medicine

versus

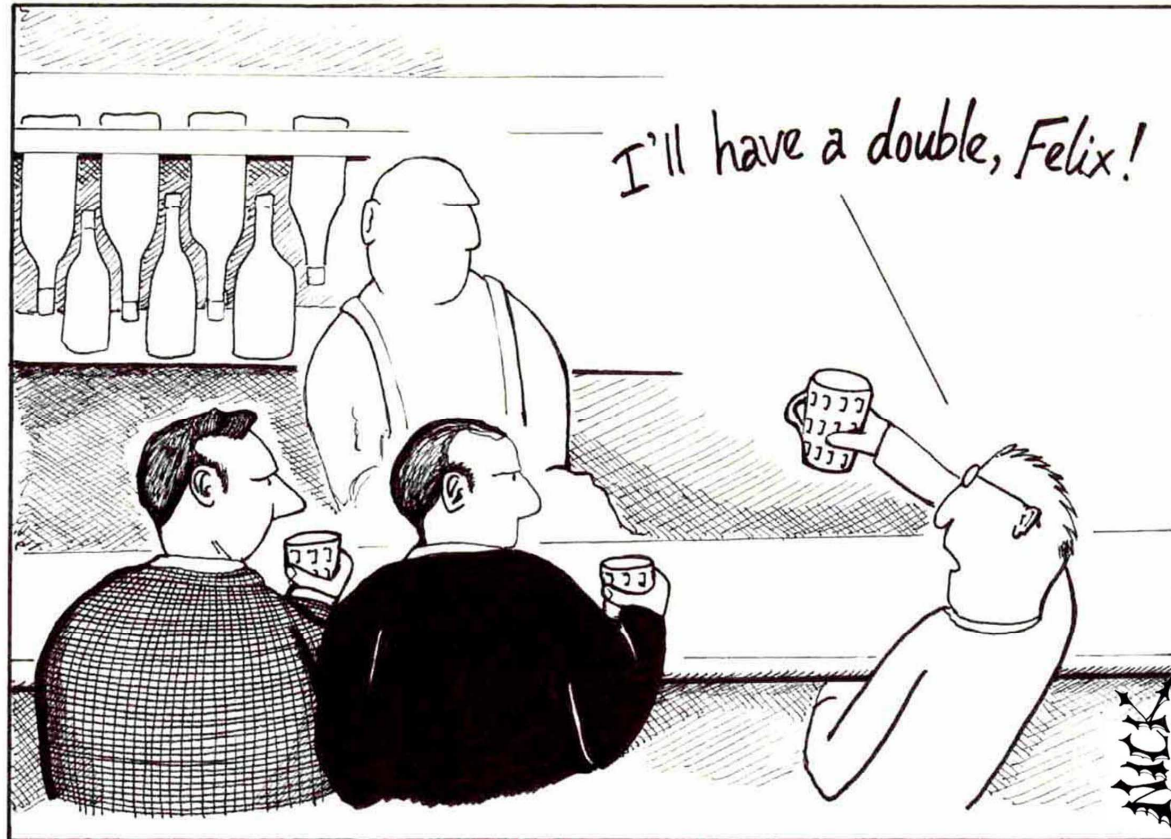
personalized medicine

- >...mohou-li být tyto dva koncepty vůbec kompatibilní?
 - EBM je postavena na robustních skupinových statistikách, které vedly k vývoji protokolů
 - *whereas personalized medicine operates with rate of deviation from „group average“*
- >>?...lze-li studovat personalizovanou medicínu pomocí standardních metod klinických zkoušek
 - *...čas znovu studovat „personifikovatelné“ proměnné, vč klinických známek (individuální toxicita, apod.)*
 - **to adopt some degree of toxicity as efficacy marker...?** (Capizzi 1997)

...závěrem

- *...co bychom potřebovali v klinice:*
 - I) prediktivní a individualizovanou informaci o:
 - toxicitě
 - lékových interakcích – *jak potenciace tak suprese*
 - II) individuálně interpretovatelnou informaci o
 - adjustaci dávky – *nejlépe i v čase*
- výstupy:
 - pravděpodobně nepůjde o jeden metodický přístup
 - *nástroje: analýza drah, biomarkery, (genetické, solubilní, klinické ?)*

...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.