

# **ELEMENTY FARMAKOGENETYKI W BADANIACH KLINICZNYCH**

Jacek Spławiński

Narodowy Instytut Leków

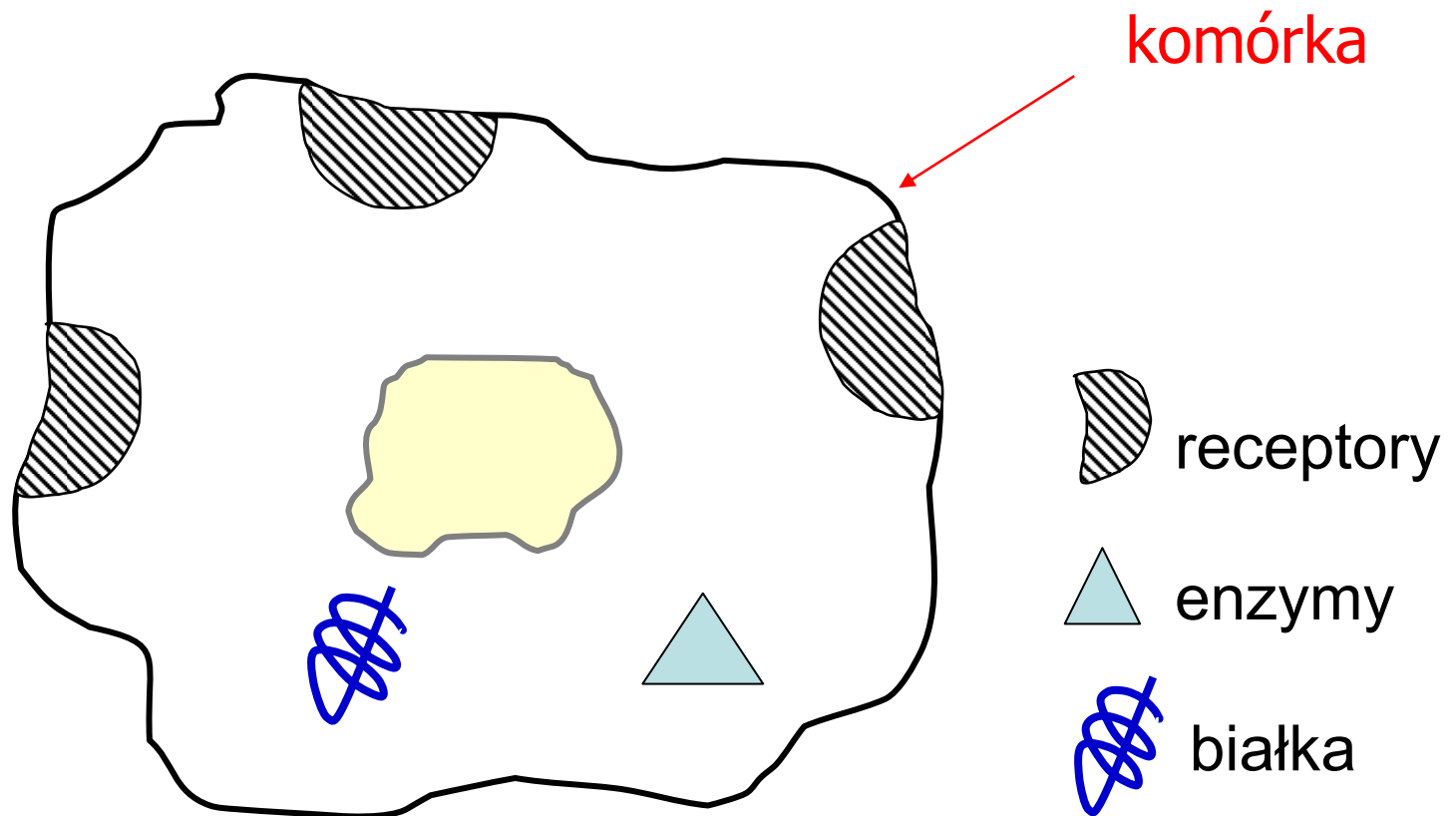
[jaceksplawinski@yahoo.com](mailto:jaceksplawinski@yahoo.com)

# **PLAN WYSTĄPIENIA**

**Aby omówić elementy farmakogenetyki w badaniu klinicznym pozwolę sobie przedstawić:**

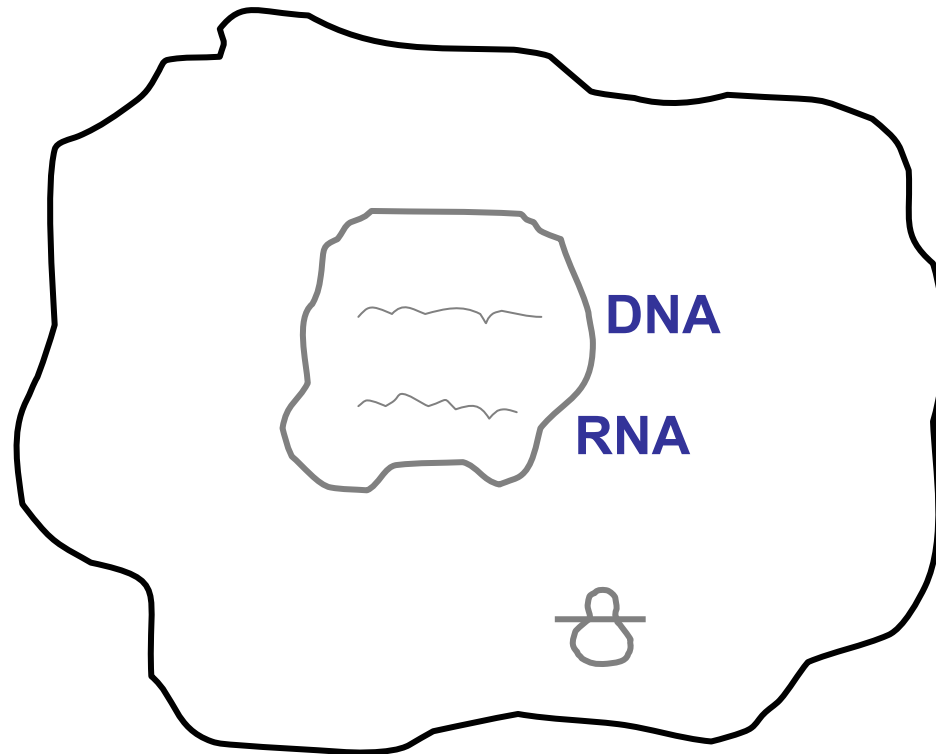
- krótką historię farmakogenetyki**
- definicje**
- mechanizm powstawania polimorfizmu**
- wyjaśnić dlaczego polimorfizm jest ważny**
- przedstawić badania farmakogenetyczne przed klinicznymi**
- omówić elementy farmakogenetyki w badaniach klinicznych**
- wyjaśnić jak należy integrować farmakogenetykę do badań klinicznych**
- opisać jakie znaczenie ma farmakogenetyka dla medycyny personalnej (osobistej)**

# FARMAKOLOGIA



**XIX – XX w.**

# FARMAKOLOGIA



**XXI wiek**

# **FARMAKOTERAPIA: ZMIANA FRONTU XIX – XXI wiek**

**Było:**

- **identyfikacja fenotypu**
- **poznanie konsekwencji fenotypu**
- **stosowanie leków dla populacji**

**Jest:**

- **identyfikacja genotypu**
- **stosowanie leków personalnych (osobistych)**

**Będzie:**

- **naprawianie błędów genetycznych („grzebanie” w genomie)**

# **ZMIENNOŚĆ ODPOWIEDZI NA LEK**

**Następujące fakty dobitnie pokazują, że odpowiedź na lek nie jest jednorodna:**

- obecność „responders” i „non-responders” w badaniu (i w praktyce) klinicznym**
- obecność pacjentów słabo lub silnie reagujących na lek („hypo- lub hyper- reactive”)**
- występowanie idiosynkrazji**

**Nawet u tego samego osobnika odpowiedź na lek może być różna przy różnej okazji: zmienność dotycząca tego samego osobnika to „intravariance”**

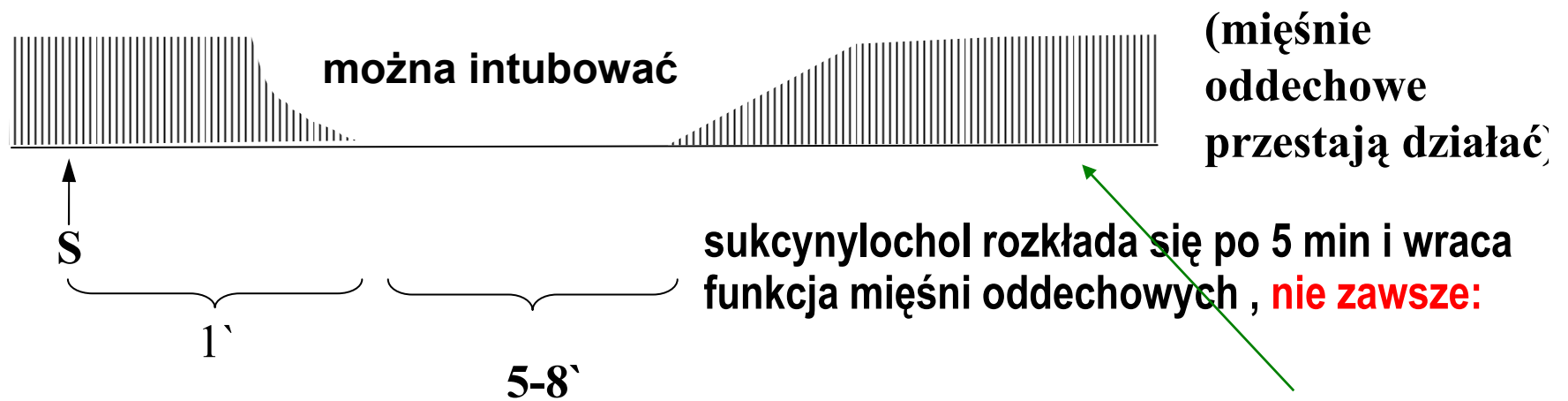
**Zmienność wynikająca z różnej reakcji różnych osobników to „intervariance”**

**Zmienność w odpowiedzi na lek pochodzenia genetycznego to „intervariance”**

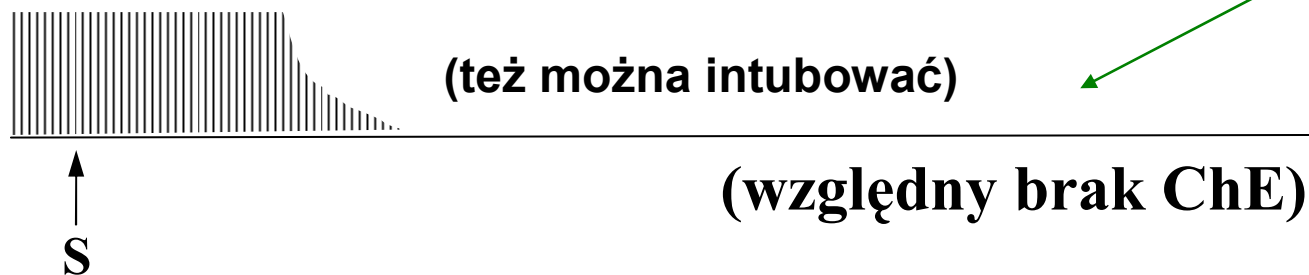
**Zasada: gdy intravariance jest duża, nie ma interwariancji**

# JAK TO SIĘ ZACZĘŁO?

Było to tak: aby chorego intubować podano sukcylocholinę



zdarza się (**genetyczny brak cholinesterazy**):



Chory oddycha i nie:

# **BRAK AKTYWNOŚCI CHOLINESTERAZY**

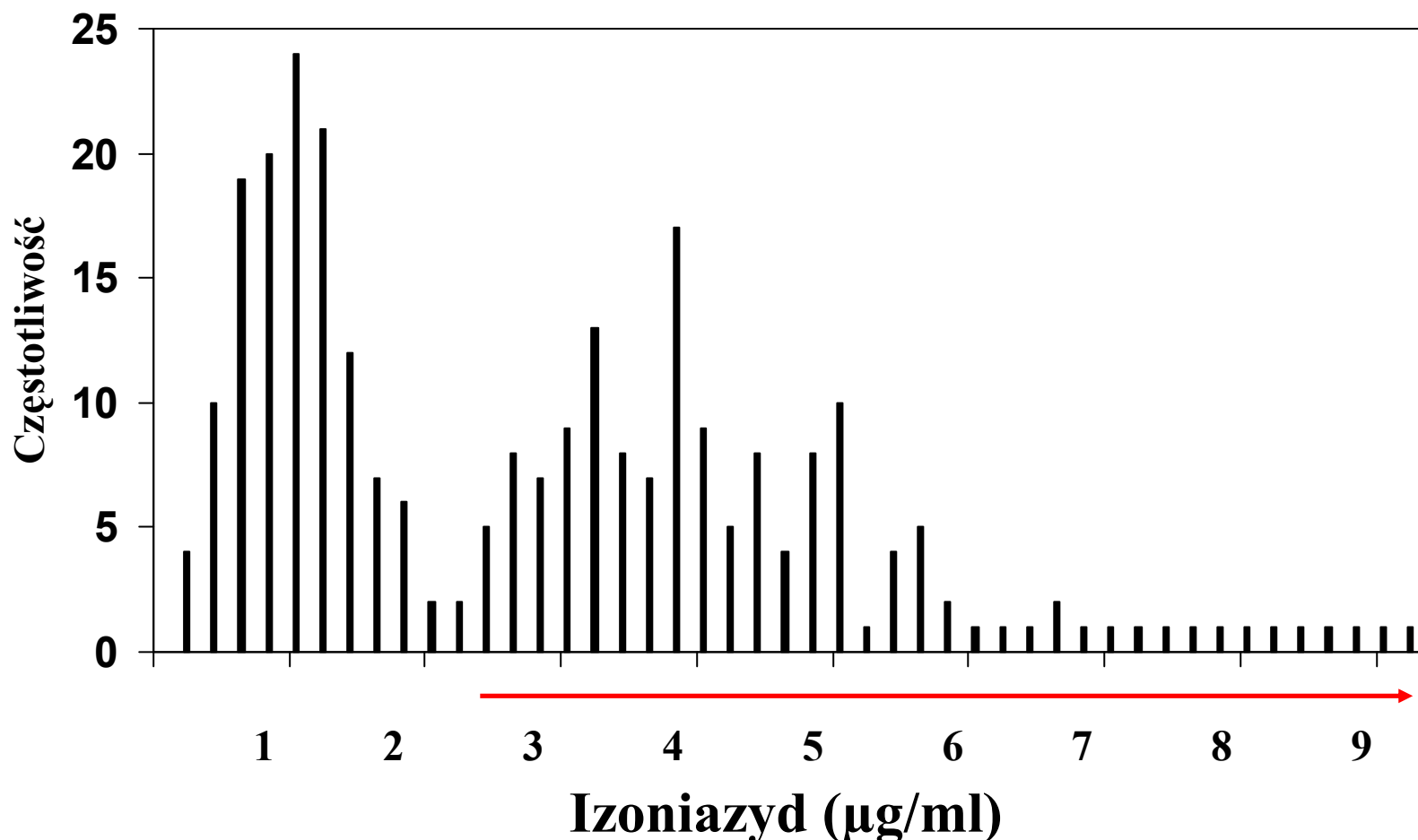
**Obecny jest enzym o nieprawidłowej funkcji i  
sukcynylocholina nie jest rozkładana**

**Przyczyny:**

- **cecha recesywna, autosomalna (jeden z 22 chromosomów); **dwie nieprawidłowe formy genów (homozygoty)** muszą być obecne aby wystąpiła cecha (szanse 1:4)**
- **występuje ok. 1:3000**
- **przedłużone działanie sukcynylocholiny z 4 min do 4 godz**
- **pacjent nie może samodzielnie oddychać (pamiętacie Państwo „łowców skór” ?) ale zachowuje świadomość**

# **INNY PRZYKŁAD Z HISTORII**

# „ACETYLATORZY”



Stężenie w osoczu u 267 osób po doustnym podaniu 9.8 mg/kg: stężenie wyższe aniżeli 2.5 mg/ml (**czzerwona strzałka**) oznacza „wolnych acetylatorów”

# **GENY SĄ WAŻNE !**

**Zdrowie zależy od:**

- **styl życia, w 50% (doktor przypomina: wino, kobieta i trening)**
- **środowisko (fizyczne, społeczne, pracy, nauki) w 20%**
- **genów, w 20%**
- **służby zdrowia, w 10%**
- **(w tym leków, ok. 2-5%)**

# SKĄD POCHODZĄ „WOLNI ACETYLATORZY”

Enzym N-acetylotransferaza (gen kodujący: *NAT*) należy do wątrobowych enzymów fazy II

Fenotyp „wolny acetylator” należy do recesywnej cechy autosomalnej występującej często w naszej rasie

Zmienność w obrębie *NAT2* jest przyczyną polimorfizmu obserwowanego w reakcji acetylacji: izoniazydu, sulfonamidów, prokainamidu i hydralazyny

Większość zmienionych alleli *NAT2* ma dwie lub trzy **mutacje punktowe**, np. *NAT2\*5B* różni się od dzikiego *NAT* w trzech nukleotydach, pozycje: 341, 481, 803

Konsekwencje *NAT2\*5B*: mniej (nie aktywność) białka *NAT* i stąd wyższy poziom izoniazydu i wysoka toksyczność wątroby oraz nefrotoksyczność

Genotypowanie mutacji *NAT2* czyli odpowiedź na pytanie czy izoniazyd będzie działał lub czy wywoła toksyczność

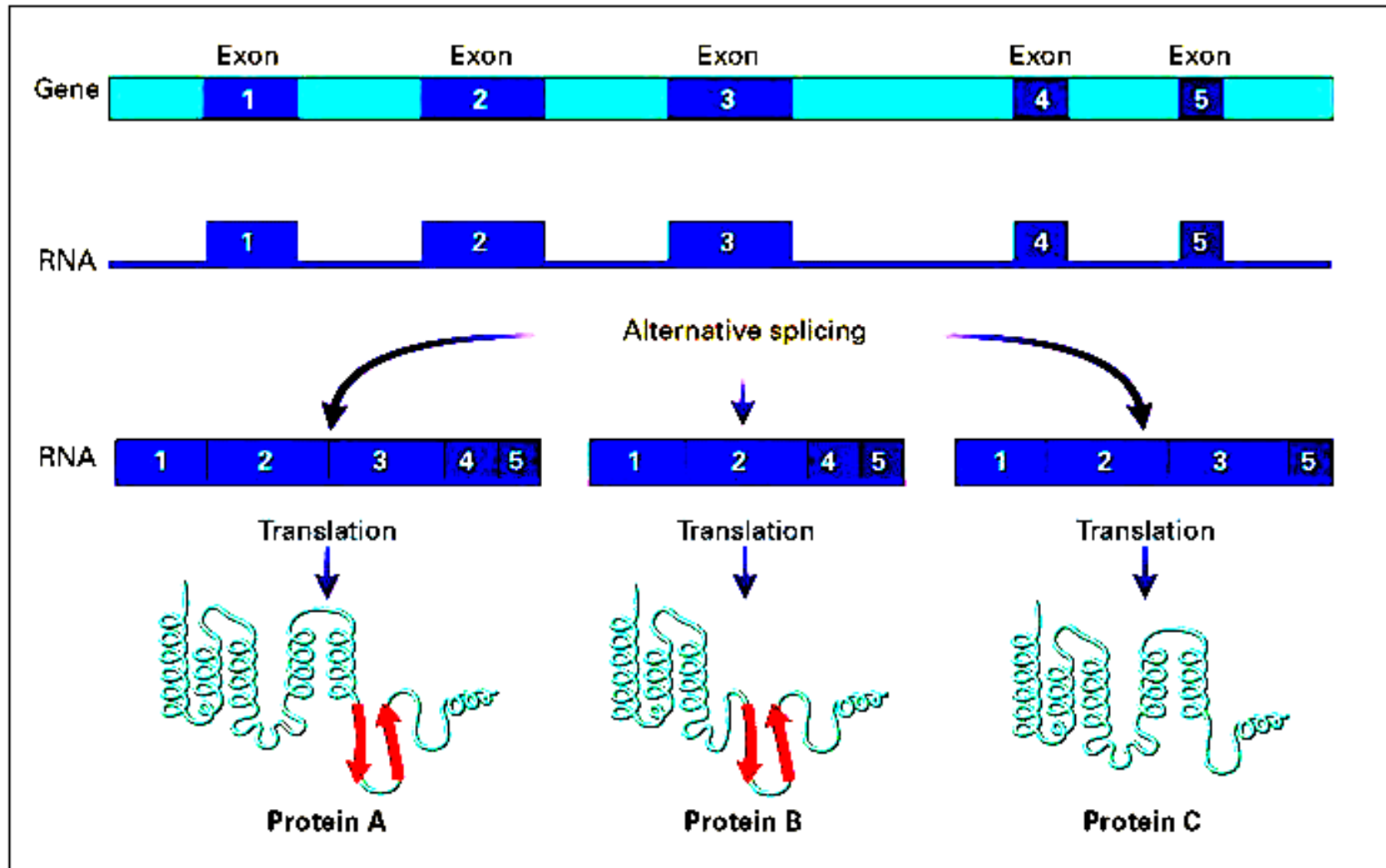
# **WOLNY LUB SZYBKI METABOLIZM**

**Toksyczność leków wiąże się z poziomem leku we krwi**

**Wolny metabolizm, lub – w krańcowych przypadkach – brak metabolizmu powoduje wzrost stężenia leku we krwi, przekraczający poziom przy którym występują działania niepożądane**

**Przeciwnie, szybki metabolizm może prowadzić do sytuacji w której poziom leku we krwi nie osiąga stężenia terapeutycznego i lek po prostu nie będzie działał**

# KIEDY DOCHODZI DO MUTACJI ?



podczas transkrypcji czyli przepisywania kolejności zasad: możliwa synteza kilku białek (A, B, C) z jednego genu, izoformy

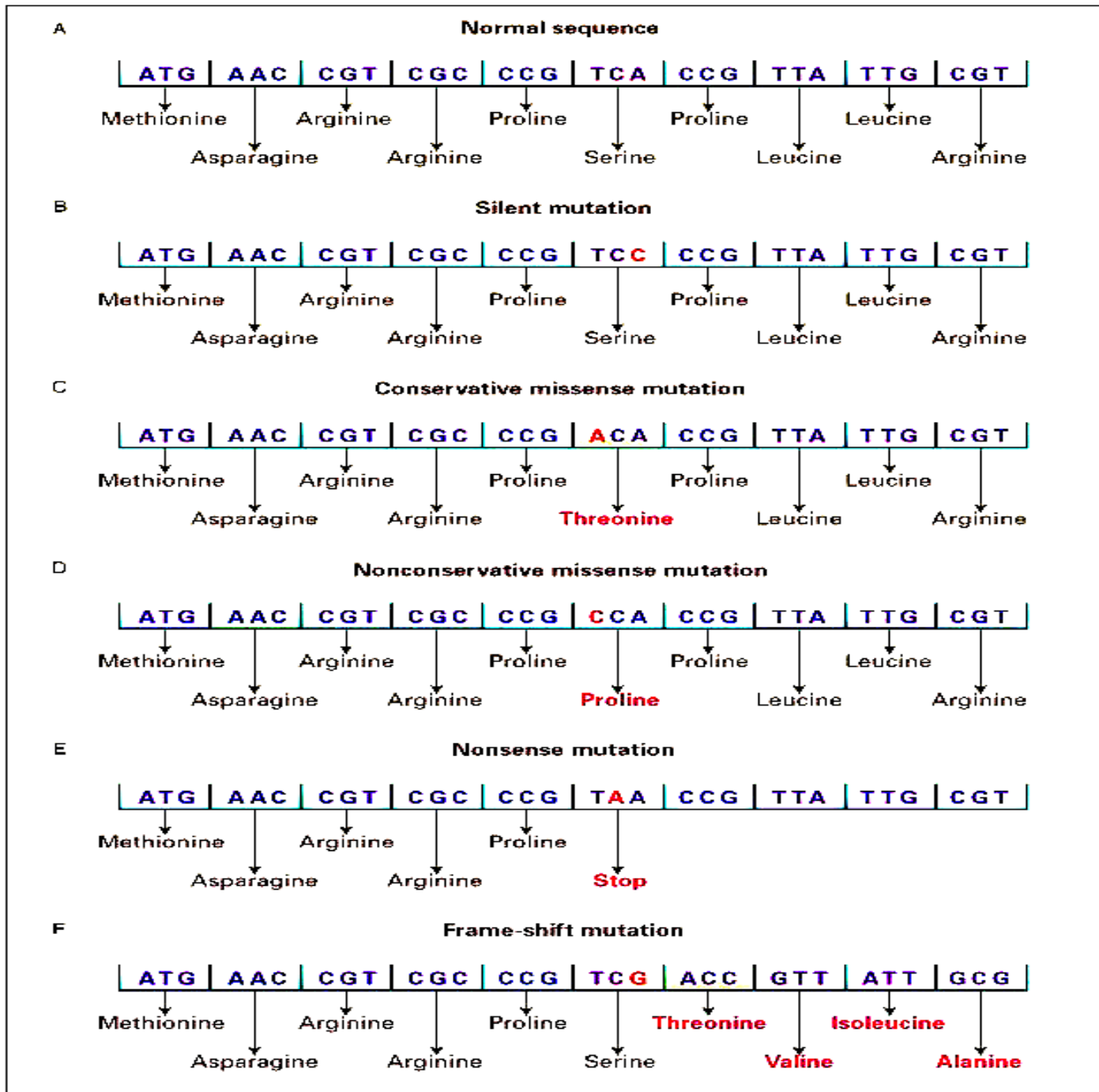
# **JAK POWSTAJĄ MUTACJE PUNKTOWE ?**

# **MUTACJE PUNKTOWE**

**Mutacja punktowa to zmiana pojedynczego nukleotydu w DNA (lub RNA) w wyniku: substytucji, delecji lub insercji**

- **Efekty mutacji:**

- **mutacja „cicha” (bez wpływu na ekspresję genu)**
- **mutacja „missense”, zmiana sensu (zmiana pojedynczego nukleotydu w kodonie = zmiana fenotypu białka)**
- **mutacja „nonsens” (zmiana trójki kodującej aminokwas na jeden z trzech kodonów STOP = krótsze białko)**
- **mutacja zmiany ramki odczytu (w wyniku insercji lub delecji dochodzi do zmiany całej sekwencji białka poniżej mutacji )**



**C**, cytozyna

**A**, adenina

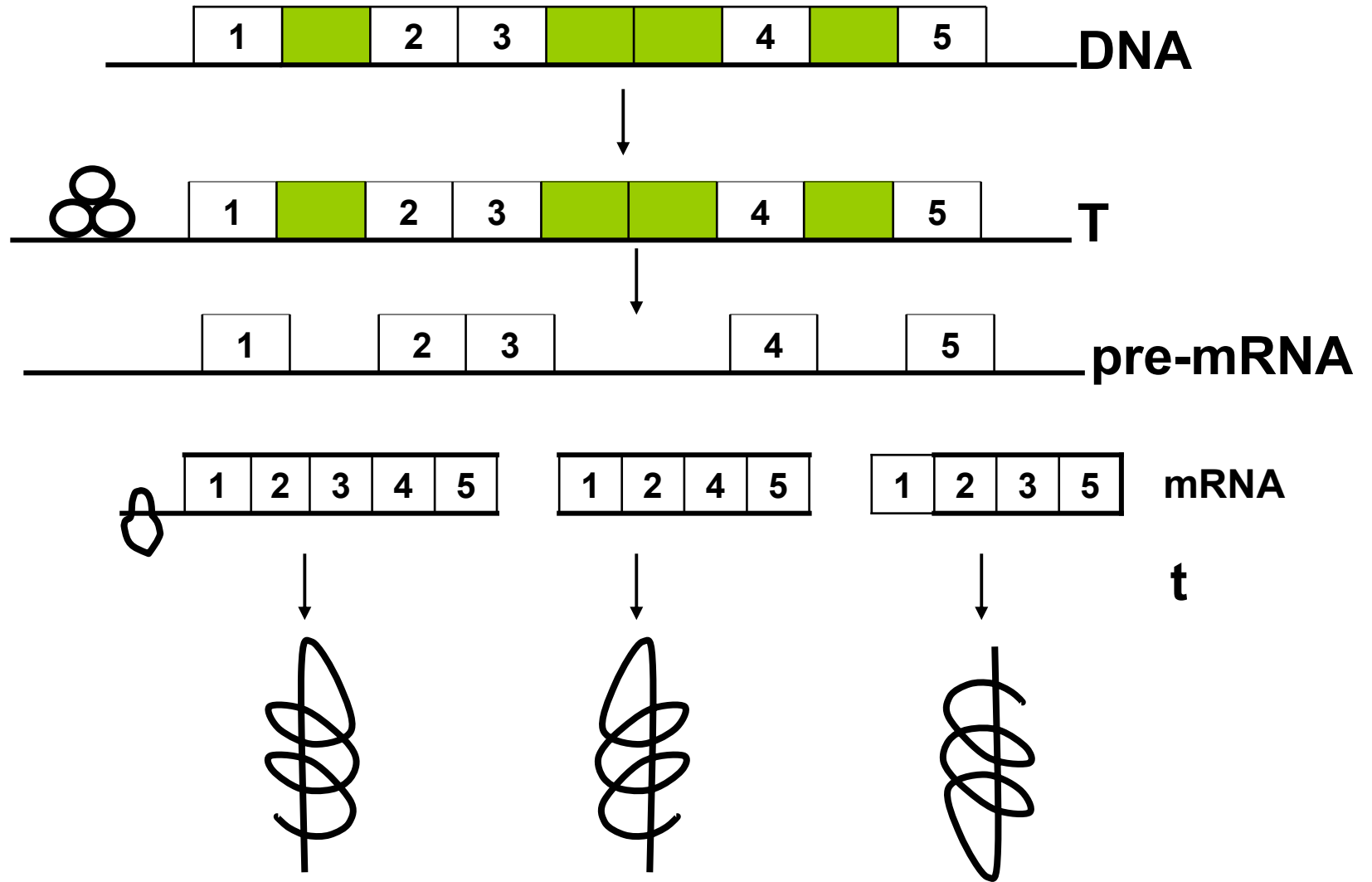
**G**, guanina

**B**: m. „cicha”: zasada  
A zamieniona na C

m. konserwatywna:  
nie wpływa na fenotyp

pozostałe m: zmiana  
ilość lub aktywność  
białka (izoformy)

# EKSPRESJA



# **POLIMORFIZM GENETYCZNY**

**Oznacza występowanie w populacji dwóch lub więcej alleli tego samego genu i jest efektem zmian (mutacji) sekwencji DNA**

**Do polimorfizmu dochodzi w wyniku selekcji, która działa przez faworyzowanie homozygot lub heterozygot zwiększając częstość występowania rzadkiego allelu**

**Częstość rzadkiego allelu, któremu sprzyja środowisko wzrasta ponieważ osobniki lepiej przystosowane mają przewagę przy rozmnażaniu a allele szkodliwe hamują reprodukcję i ich częstość zmniejsza się**

**Ewolucja jest zmianą częstości genów w wyniku selekcji**

**Zmienność genetyczna jest warunkiem ewolucji a różne reakcje na leki to „pokłosie” tej zmienności**

# DEFINICJE

## FARMAKOGENETYKA i FARMAKOGENOMIKA

Termin „farmakogenetyka” został wprowadzony przez F Vogela w 1959 i zdefiniowany jako badanie roli genetyki w odpowiedzi na leki

Nie ma precyzyjnych definicji

**Farmakogenetyka (PGx):** badanie wpływu mutacji pojedynczego genu na odpowiedź na lek

**Farmakogenomika:** badanie wpływu zmian w kilku genach (genom – materiał genetyczny zawarty w jądrowym DNA) na odpowiedź na lek (termin ten obecnie odnosi się do badania choroby i badań epidemiologicznych)

# **ZNACZENIE FARMAKOGENETYKI (PGx)**

**Czynniki genetyczne decydujące o odpowiedzi na lek:**

- **zmienność genów kodujących enzymy metaboliczne**
- **zmienność genów kodujących receptory**
- **zmienność genów kodujących transportery i inne białka**

**Stąd odpowiedź na lek może wynikać ze zmienności:**

- **dotyczących farmakokinetyki (np. metabolizmu leku)**
- **dotyczących farmakodynamiki (np. receptory)**

**Konsekwencje:**

- **wzmożona toksyczność**
- **brak odpowiedzi**

# WPŁYW POJEDYNCZEJ MUTACJI

Różne są skutki mutacji i wynikającego stąd polimorfizmu dla działania leków

Najczęściej skutki te dotyczą metabolizmu leków, rzadziej farmakodynamicznej odpowiedzi i jeszcze rzadziej transportu leków do komórek i narządów (pod warunkiem, że jest to transport aktywny)

Ogólnie: skuteczność leku zwykle zależy od więcej niż jednego enzymu, receptora itd. – stąd ograniczona rola PGx w przewidywaniu skuteczności. **Inaczej z bezpieczeństwem leku**

Polimorfizm w obrębie enzymów przez które „przechodzą” leki (zarówno zmiana funkcji jak i liczby cząsteczek enzymu) najczęściej dotyczy cytochromu CYP2D6 i CYP2C19 –  
metabolizm przez **1** enzym → poziom leku

# CHARAKTERYSTYKA CYTOCHROMU P450 (CYP)

Jest hemoproteiną obecną w mikrosomach komórek wątrobowych (także: nabłonek jelitowy i płuca), nazwa od absorpcji światła (450nm) w formie zredukowanej

Prawdopodobnie wszystkie CYP wykazują polimorfizm, p. <http://www.imm.ki.se/CYPalleles/>

Funkcja: CYP jest końcową oksydazą, która prowadzi do utleniania (w połączeniu z flawoproteiną) wielu leków

Liczba izoform (izoenzymów) CYP jest olbrzymia, do klasycznych należą: CYP2D6 (**beta-blokery**, **antydepresanty**, **antypsychotyki**, inne: kodeina, **dekstrometorfan**, **ondasentron**, **tamoksifen**, **tramadol**) i CYP2C19 (**PPI**, **antydepresanty**, **przeciwdrgawkowe**, inne: **progesteron**)

# KONSEKWENCJE

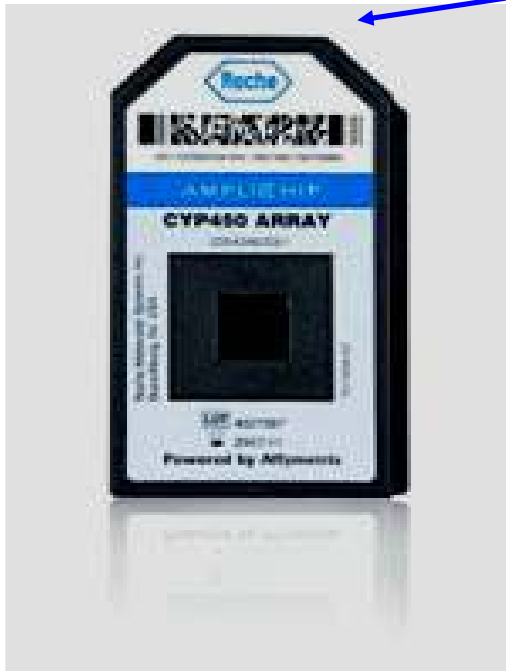
**Jeśli występowała toksyczność (osobnik należał do PM, poor metabolizer), nie rzadko zgony, wtedy karna odpowiedzialność, stąd firmy:**

- **„uciekają” z produkcji leków metabolizowanych via CYP2D6 („2D6-liability”)**
- **rozwijają izomery (najczęściej leki są racematami) aby zmniejszyć zmienność dotyczącą poziomu leku we krwi (ocenianą na podstawie AUC): AUCPM do AUC<sub>EM</sub> dla R-omeprazolu wynosi 7.5 a dla S-omeprazolu 3.1 (lek metabolizowany przez CYP2C19)**

# IDENTYFIKACJA

Aby przewidzieć możliwe interakcje (wzmoczony lub osłabiony metabolizm: EM i PM) w badaniu klinicznym (1000 próbek DNA) należy wykonać genotypowanie (koszt: \$ 130 czyli 0.3 / genotyp!) [ale dla jednego chorego, który – np. chce uniknąć toksyczności – koszt: \$ 130, bo tyle kosztuje „czip”]

The world's first microarray-based pharmacogenomic test for clinical use.



**AmpliChip CYP450 Test** provides comprehensive detection of gene variations — including deletions and duplications — for the CYP2D6 and CYP2C19 genes, which play a major role in the metabolism of an estimated 25% of all prescription drugs. It is intended to be an aid to clinicians in determining therapeutic strategy and treatment dose for therapeutics

# BADANIA NIE-KLINICZNE

Wykonywane przed badaniami klinicznymi (najczęściej *in vitro*):

- pozwalają wytypować najważniejsze metabolity i **enzymy**,
- odpowiadają na pytanie **czy polimorfizm enzymatyczny będzie miał znaczenie dla** danej substancji aktywnej
- umożliwiają firmie podjęcie decyzji czy dalej rozwijać lek
- pozwalają ocenić metabolizm zależny od dawki
- pozwalają zmierzyć kinetykę enzymatyczną
- stanowią część ustalenia „profilu farmakologicznego”

Modele: **mikrosomy wątrobowe**, **hepatocyty wątrobowe**, **skrawki wątroby**, zwierzęta transgeniczne, **linie komórkowe**

Ograniczenia: izoenzymy metabolizujące leki znajdują się również w innych tkankach (np. nabłonek jelitowy)

# **BADANIA KLINICZNE**

**Badania PGx są szczególnie ważne w przypadku leków o wąskim indeksie terapeutycznym (rozwój nowego leku to > \$ 800 mln, przy tym koszt testów, czipów, to „pikuś”)**

**Podstawa to odpowiedź na pytanie czy dla danego leku obserwuje się polimorfizm i jakie ma on znaczenie kliniczne**

# **PIERWSZE WNIOSKI**

**Odpowiedź na lek:**

- **taka jak średnia w populacji (norma ?)**
- **brak odpowiedzi (skuteczności)**
- **nadmierna (toksyczna)**

**może wynikać z opisanych wyżej zmienności – polimorfizm w ekspresji genów – i zostać odkryta przez:**

- **badanie lekarskie (objawy przedmiotowe pojawiające się po podaniu leku)**
- **badanie ekspresji genów, czyli szukanie polimorfizmu (w teście farmakogenetycznym pozwalającym wykryć zmienność przed podaniem leku)**

# **FAZA I**

**Najważniejsza w badaniach PGx (czy lek działa tak jak w badaniach nie-klinicznych? jaka jest PK ? jaka jest dawka ?):**

- ustalenie genotypu**
- potwierdzenie metabolizmu (enzymy i metabolity określone w badaniach nie-klinicznych)**
- ustalenie czy enzym lub cel wykazuje polimorfizm**
- znalezienie potencjalnych celów działania leku**

# **STWIERDZENIE POLIMORFIZMU**

**Stwierdzenie polimorfizmu umożliwia:**

- **uwzględnienie osobników nietypowych w badaniu**
- **zastosowanie różnych dawek**
- **ocenę wielkości zmienności PK (wynikającej z polimorfizmu genów kodujących enzymy)**
- **ocenę klinicznych konsekwencji**
- **ustalenie relacji pomiędzy zmiennością między- i wewnątrz osobniczą**

# **FILOZOFIA PODEJŚCIA DO BADAŃ**

**Identyfikacja osób, które mogą inaczej „niż reszta” reagować na lek – najczęściej są to osoby wyposażone w enzymy, receptory, transportery kodowane przez polimorficzne geny**

**Badanie powinno być „czułe” na wykrycie „outliersów”: czy w protokole badania nie należy umieścić działu „zmiennosc odpowiedzi na lek” ?**

**Takie osoby powinny znaleźć się w badaniu ! Nie można wybierać grup idealnie homogennych: średni efekt działania leku jest ważny ale równie ważne są „brzegi” krzywej**

**A to dlatego, że **pierwszym celem badania** jest ochrona pacjenta przed toksycznym działaniem leku**

# ESTIMATION OF DRUG-INDUCED TOXICITY

Paracelsus: „All drugs are poisons it is the matter of the dose”

Country	Drug-induced hospitalization per yr	Drug-induced fatalities per yr
Germany	120 000	8 000
Australia	300 000	14 000
USA	1 000 000	50-100 000

*(JAMA – 2001)*

**Leki w USA są czwartą przyczyną wszystkich zgonów**

# **Randomised trial of effect of alendronate**

**(Lancet 1996, 348;1535)**

## **Inclusion criteria:**

- women 55-81,**
- low BMD with at least one vertebral fracture**

## **Exclusion criteria:**

- peptic ulcer disease (bleeding or 2> ulcers in last 5 yrs),**
- dyspepsia,**
- abnormal renal function,**
- major medical problem precluding participation for 3 yrs,**
- severe malabsorption,**
- uncontrolled hypertension,**
- myocardial infarction,**
- unstable angina,**
- disturbed thyroid or parathyroid function,**
- use of HRT.**

**(relative hazard of hip fracture on alendronate: .72 (.58 to .99)**

# PYTANIE

**Jak widać były to staruszki, które przesiadują w przychodniach ortopedycznych (bez chorób serca, przewodu pokarmowego, nerek, wątroby, bez chorób hormonalnych i w dobrym zdrowiu, ale ze złamanym kręgosłupem)**

**Czy tak bardzo homogenna grupa nie była pozbawiona osób u których alendronian zachowuje się „inaczej” ?**

# **KING IS NAKED**

**Gdy zmienna odpowiedz na lek jest wynikiem „odmienności” genetycznej – osobnicy z dolnego i górnego ramienia krzywej dawka-odpowiedź stają się bezcenni !**

**Konieczne jest wykrycie „outliersów” i pytanie: w jaki sposób takie osoby powinny znaleźć się w badaniu ?**

## **FAZA II**

**Miejsce na badanie zależności efektu od dawki w podgrupach określonych genetycznie**

**Z tego względu: randomizacja zgodnie z genotypem (?)**

**Tu należy określić jaka dawka dla odpowiedniej podgrupy**

**W badaniach ery „przed PGx” dawkowanie dobierano na zasadzie błędów i trafień; teraz na podstawie wyników PGx**

**Określenie dawki do badań fazy III**

## **FAZA III**

**Identyfikacja i badanie pacjentów u których występuje polimorfizm w genach kodujących enzymy metabolizujące lub punkty uchwytu działania leku**

**Możliwe: przeprowadzenie stratyfikacji wg genotypów**

**Stwierdzenie związku pomiędzy genotypem a odpowiedzią na lek nakazuje dokładne badanie tych osób**

**Faza III pozwala na ocenę wartości używanego „czipu” do identyfikacji genotypów z izoenzymami**

**Kiedy, ze względu na obecny polimorfizm, stosowanie leku jest niebezpieczne (wynik fazy II) może okazać się konieczne wykluczenie zidentyfikowanych osób z badania**

## **FAZA IV**

**Ponieważ w badaniu fazy III nie można wykryć wszystkich działań niepożądanych i ponieważ można przypuszczać, że działania takie są związane z obecnością polimorfizmu enzymów metabolizujących, warto rozważyć pobieranie próbek krwi od chorych u których takie działanie wystąpiło.**

# **ZALECANY SPOSÓB POSTĘPOWANIA (CIOMS, 2005)**

## **Pytania postawione w badaniach nie-klinicznych:**

- 1. Czy metabolizm *via* enzymy „polimorficzne” ?**
- 2. Czy krzywa dawka-odpowiedź jest stroma ?**
- 3. Czy punkt uchwytu „polimorficzny” ?** → **TAK**

## **Badania PGx są potrzebne → do wykonania w fazach I – III:**

**Faza I genotypowanie uczestników badań: 1. PK i PD 2. „outlier”**

**Faza II zależność efektu od dawki: 1. genotypowanie uczestników, 2. „out-liersów”, 3. genotypowanie „drop-out” 4. 2-3-krotny pomiar AUC u tych samych osób dla oceny zmienności wewnątrzsobniczej**

**Faza III intensywne badania genetyczne i farmakologiczne osób:**

- wycofały się z badania z powodu braku skuteczności**
- wycofały się z badania z powodu działań niepożądanych**

# **JEDNAK SĄ ZMIANY**

**Tym, którzy narzekają na ministerstwo zdrowia, pokazuję jak wiele się zmieniło na plus, dawnej leczono:**

- **rógiem nosorożca**
- **bezoarem (kamień)**
- **meszkiem z głowy powieszzonego (gdy brak: sznur powieszzonego)**
- **moczem wiernej mężatki** (łatwo było tłumaczyć, że nie działa)  
↓
- **sproszkowaną mumia egipska (były i podróbki ze świeżych zwłok)**

# REWOLUCJA

Różnice w odpowiedzi na lek pomiędzy osobnikami mogą mieć pochodzenie genetyczne („intervariation”)

W latach 60. odkryto receptor estrogenowy a w 70. wprowadzono tamoksifen do leczenia raka piersi

Tamoksifen jest antagonistą receptora estrogenowego w tkance sutka i agonistą tego receptora w: kości (zapobiega osteoporozie) i macicy (pobudza proliferację endometrium)

Kobiety z ekspresją receptora estrogenowego reagują pozytywnie na leczenie raka piersi

# NOWY SPOSÓB LECZENIA

*Human Epidermal growth factor*

**Receptor – 2 (HER 2) przewodzi sygnały czynników wzrostu**

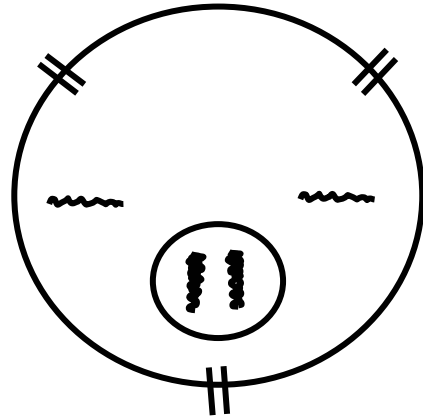
**Stwierdzono, że:**

- **nadekspresja HER 2 u ok. 20% kobiet z rakiem piersi**
- **istnieje korelacja ze złym rokowaniem**

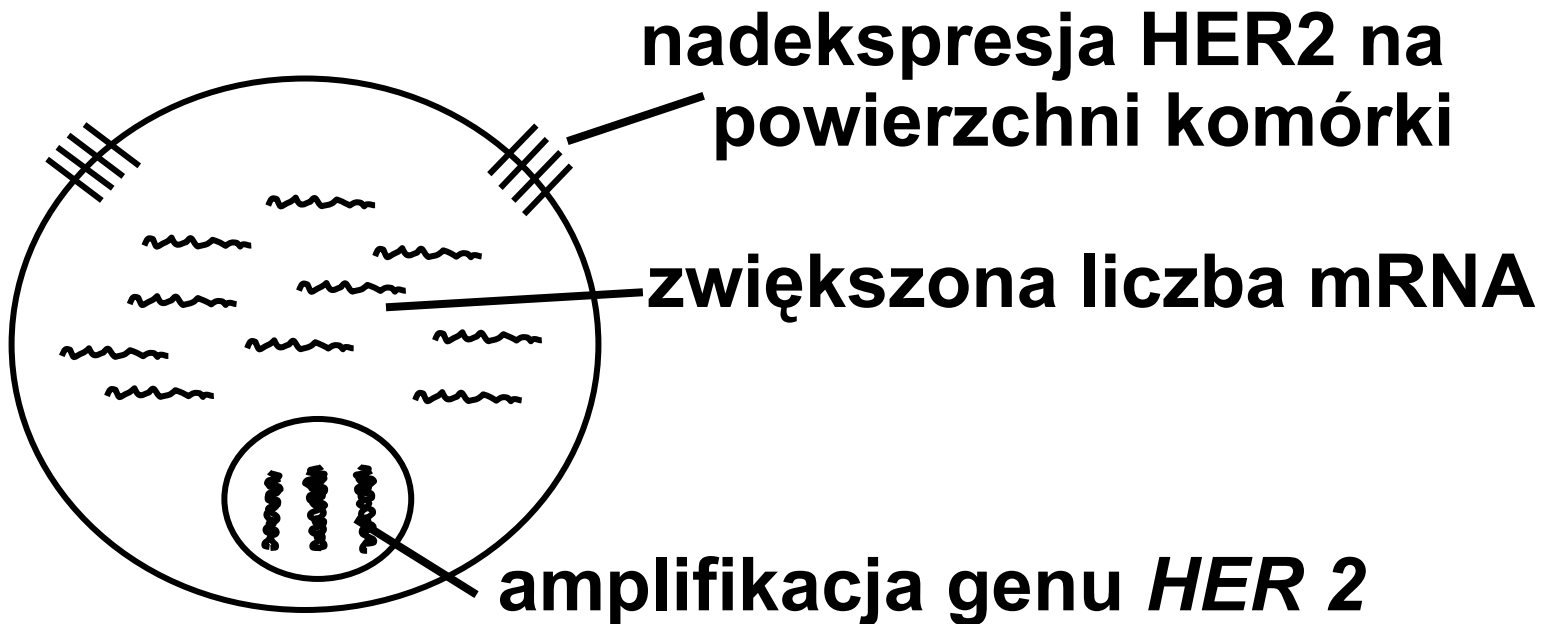
**Monoklonalne, rekombinowane p-ciało p-ko HER 2, trastuzumab (Herceptin) w adjuwancyjnym leczeniu raka piersi redukuje ryzyko nawrotu o 50% w por z standardem**

**Nadekspresja HER2 jest zależna od genu *HER2*, który można testować z użyciem testów PGx**

# NADEKSPRESJA



komórka normalna



nadekspresja HER2 na  
powierzchni komórki

zwiększona liczba mRNA

amplifikacja genu *HER 2*

# **DEJA VU ?**

**Dawniej przemysł nie wytwarzał gotowych produktów leczniczych ale surowce, które sprzedawał aptekom**

**Lekarz zapisywał dowolną substancję, którą aptekarz mieszał z inną zgodnie z zaleceniami lekarza**

**„Proszki” zapisywali lekarze jeszcze w latach 60. XX wieku !**

**Były to kompozycje dowolnych substancji i dowolnych dawek „dobrane” dla indywidualnego pacjenta. Podstawą doboru był „nos” lekarza – ale uwaga – nie kpijmy bo niedługo każdy z nas będzie nosił chip charakteryzujący jego genom i „wrażliwość” na leki**

# KONSEKWENCJE

Reakcja na lek zależy od obecności „punktu uchwytu” np.:

lek	punkt uchwytu	test	wskazanie
tamoksifen	RE	immchem	rak piersi
trastuzumab	HER2	immchem FISH	rak piersi
lapatinib	HER2, EGFR	immuchem FISH	rak piersi
doksorubicyna	Topoizomeraza II $\alpha$	FISH*	rak piersi
cetuksimab	EGFR	immchem	rak okrężnicy
erlotinib, gefitinib	EGFR	immchem	niedrobn r płuca
imatinib	C-KIT (CD117)	immchem	GIST
cetuksimab	EGFR	KRAS&	rak okrężnicy
toks. irynotekan	met: UGT1A1**	„invader”	rak okrężnicy

\* fluoresc in situ; immchem: immunohistochemiczny; mutacja w *UGT1A1* i polimorfizm

& aktywny tylko gdy „dziki” *KRAS*; aktywność większa gdy nadekspresja EGFR

# PRZYKŁAD

**Niedrobnokomórkowy rak płuca**

**Leczenie adjuwacyjne:**

- **standard: cisplatyna i paklitaksel (*odpowieź guza: 23%*)**
- **faza III: erlotinib + standard vs placebo + standard**

**Mutacje:**

- **w domenie kinazy tyrozynowej EGFR**
- **w *KRAS* (koduje GTPazę „poniżej” EGFR)**

**Dwa leki, inhibitory kinazy tyrozynowej EGFR: gefitinib i erlotinib**

**Dodanie erlotinibu:**

- **jeśli mutacja EGFR to wzrost odpowiedzi**
- **jeśli mutacja *KRAS* to antagonizm (*odpowieź: 8%*)**

**Wniosek: konieczność PGx dla oceny mutacji !**

# NIEWYOBRAŻALNE ZMIANY

Firmy obecnie „żyją” z blockbuster-leków, tj leków dla całej populacji pacjentów, a nie podgrup

Teraz: o wyborze leku decyduje lekarz z pomocą rep”a

Przyszłość: o wyborze leku będzie decydował test PGx

Testowanie PGx:

- leczenie bardziej **bezpieczne** i skuteczne
- leczenie tylko dla „wybranych” przez test chorych
- zmniejszenie kosztów leczenia
- zwiększy się wiedza o chorobach i lekach
- całe podgrupy chorych nie będą leczone (etyka !)

Ogólnie: lek wyłącznie z testem PGx = **medycyna personalna**

# WNIOSEK

Życie naśladuje sztukę: wniosek został postawiony dawno temu przez Georga Orwella:

„ All animals are equal but some animals are more equal than others”

[jaceksplawinski@yahoo.com](mailto:jaceksplawinski@yahoo.com)

DZIĘKUJĘ !