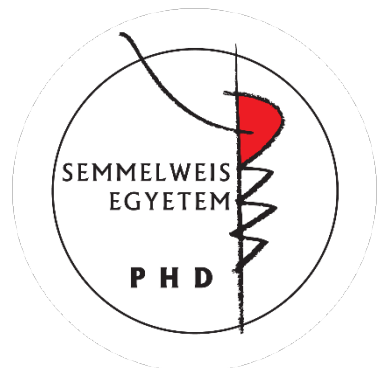


A ciklofoszamid kemoterápia hatékonysága és toxicitása a *CYP2B6* genetikai variabilitásának függvényében



Metabolikus Gyógyszer-kölcsönhatások Kutatócsoport
Természettudományi Kutatóközpont, Enzimológiai Intézet



Mangó Katalin

TOX'2022 Tudományos Konferencia
Zalakaros, 2022.10.13.



A humán CYP2B6 enzimről....

- Gyógyszermetabolizáló CYP1-3 enzimcsalád  xenobiotikumok eliminálása
- Klinikumban használt hatóanyagok 2-10%-ának metabolizmusát végzi. Például: **bupropion** (antidepresszáns), **efavirenz** (antiretrovirális szer), **ciklofoszfamid** (kemoterápiás szer, immunszuppresszáns), **ketamine** és **methadone** (analgetikum).
- A **CYP2B6 katalitikus aktivitása és expressziója nagymértékű interindividuális variabilitást** mutat, melyet elsősorban a **CYP2B6 genetikai variabilitásával** magyaráznak.

- **Fenokonverzió:**

- CYP2B6 specifikus nem-genetikai faktorok: **indukáló/gátlószer**
- CYP2B6 nem-specifikus nem-genetikai faktorok: például **kor, nem, különböző májbetegségek** (alkohol-eredetű vagy nem-alkohol eredetű) és **más gyulladáisos állapotok**



**A genotípus alapján
determinált állapothoz képest
időszakosan
növelhetik/csökkenthetik a
CYP enzimműködést**

CYP2B6 allél-funkcionalitás és CYP2B6 diplotípus-fenotípus becslés

CYP2B6 Allél-variánsok	SNV-k	Funkcionalitás ^a	CYP2B6 Genotípusok	Genotípus-fenotípus becslés ^a
CYP2B6*6	g.15631G>T és g.18053A>G	mRNS expresszió és aktivitás ↓	*6/*6 *6/*9	'Poor'
CYP2B6*9	g.15631G>T (Exon 4)	mRNS expresszió és aktivitás ↔	*1/*6 *5/*6 *1/*9	'Intermediate'
CYP2B6*5	g.25505C>T (Exon 9)		*4/*6	
CYP2B6*4	g.18053A>G (Exon 5)	Aktivitás ↑	*1/*1 *1/*5	'Normal'
CYP2B6*22	g.-82T>C	mRNS expresszió és aktivitás ↑	*1/*4 *1/*22 *4/*5	'Rapid/ Ultrarapid'

^aPharmVar

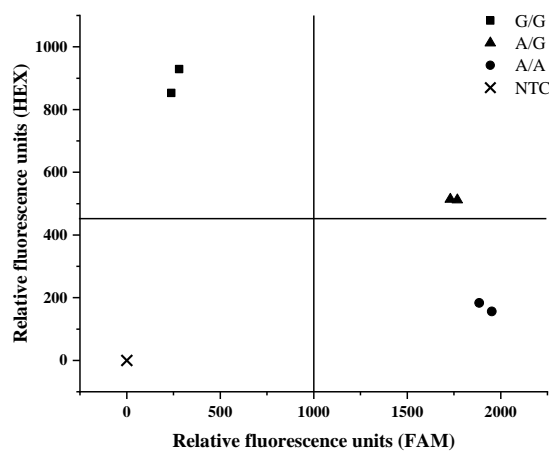
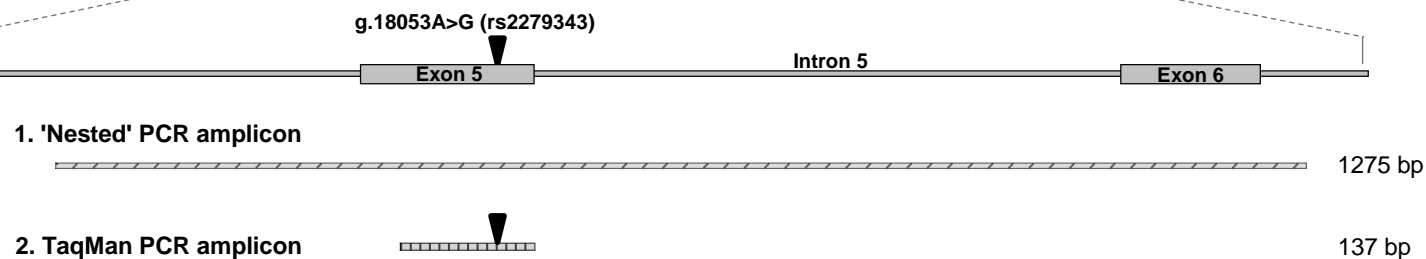
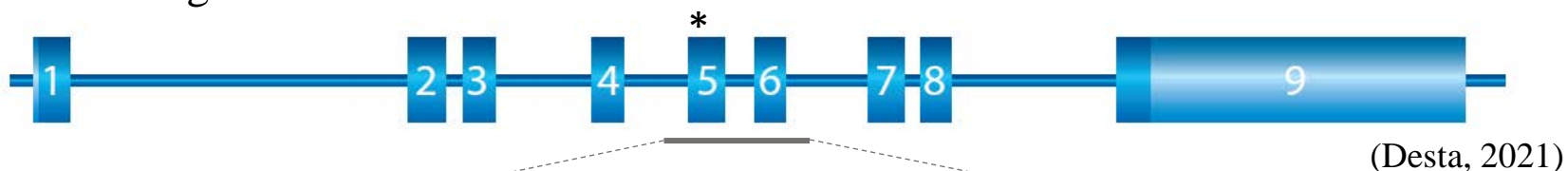
CYP2B6 allél-variánsok meghatározása

- *CYP2B7P* és *CYP2B6* gének nagyfokú exon nukleotid sorrend homológiája (≥96%)
- **Validált CYP2B6 TaqMan SNP assays** (Thermo Fisher Scientific)
- *CYP2B6* allél-variánsok **egy vagy több SNV-t** hordozhatnak; továbbá egy SNV **több allél-variánsban is megtalálható.**

SNV-k	Assay IDs
g.-82T>C	C_27830964_10
g.15631G>T	C_7817765_60
g.25505C>T	C_30634242_40
g.18053A>G	Nem elérhető

g.18053A>G polimorfizmus azonosítása

CYP2B6 gén



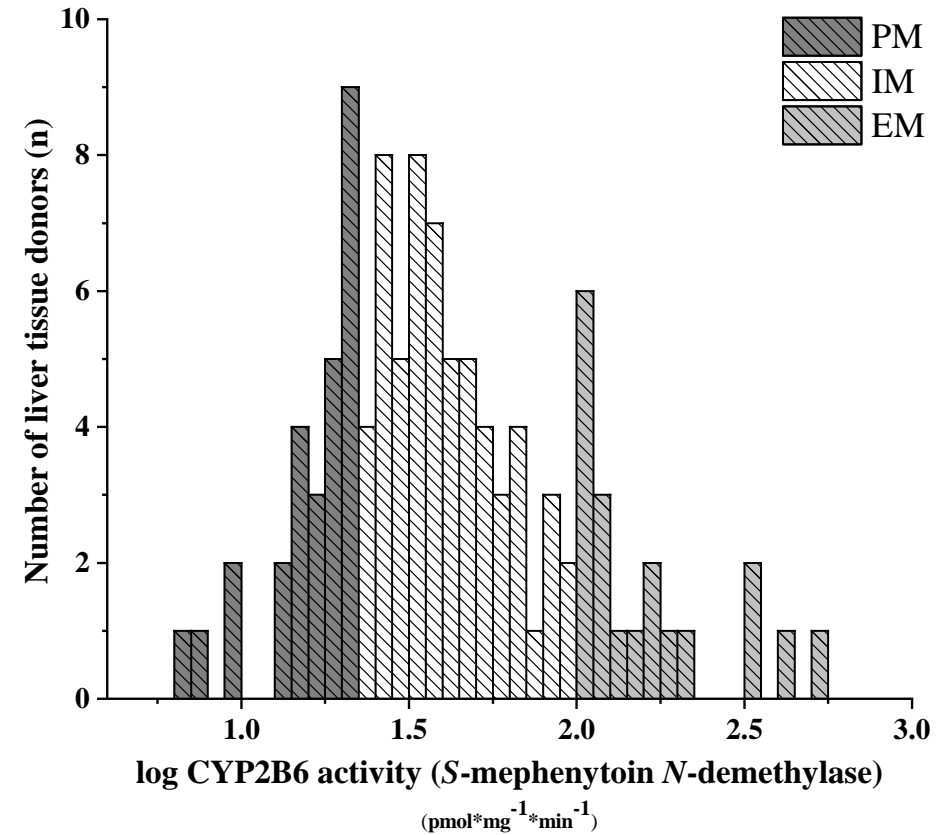
- A genotipizáló módszer **'nested' PCR** módszeren alapul felhasználva a **'touchdown' PCR hőmérsékleti protokoll** elveit, valamint **TaqMan-próbás SNV-diszkriminációt** alkalmaz a g.18053A>G polimorfizmus azonosításához.
- g.18053A>G (rs2279343) genotipizáló reakció allél-diszkriminációs ábrája

CYP2B6 allél és genotípus gyakoriságok (N=119) (A), valamint *CYP2B6* aktivitások (N=105) gyakoriságának eloszlása (B) szervdonorok májszövet-mintáiban

A

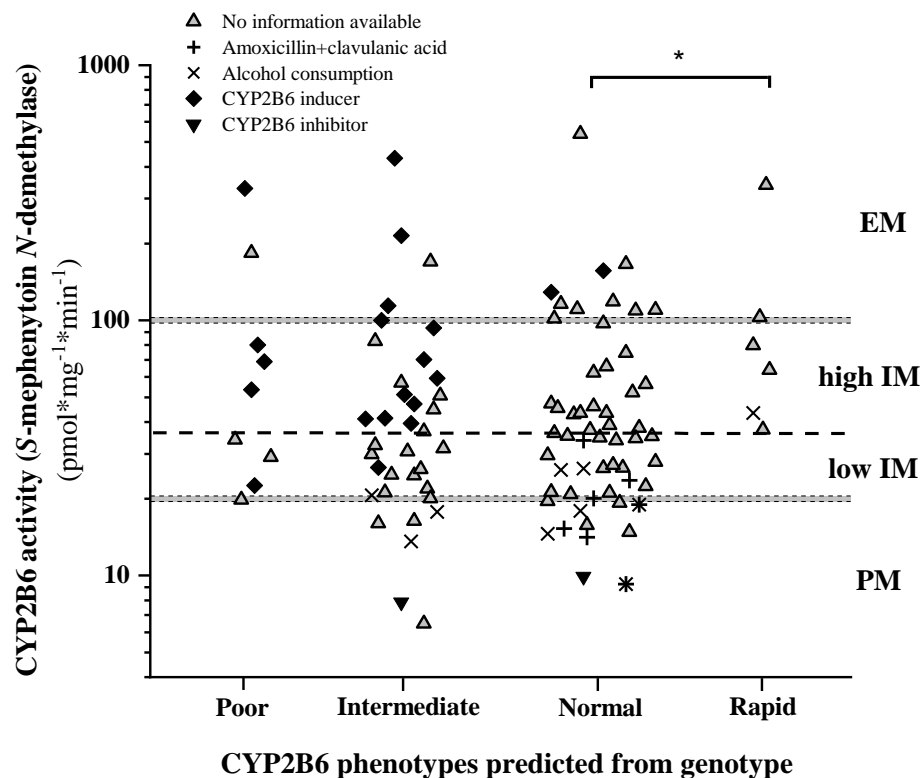
	N	Gyakoriság (%)	
		Donorok	Kaukázusi populáció ^a
<i>CYP2B6</i> allélok			
*4	5	2.1	2.2-6.2
*5	25	10.5	9-12.2
*6	59	24.8	7-28.15
*9	2	0.8	0-1.47
*22	2	0.8	1.4-2.4
<i>CYP2B6</i> genotípusok			
*1/*1	46	38.7	21.05-24.1
*1/*6	32	26.9	22.1-22.9
*1/*5	15	12.6	7.36-11.3
*5/*6	9	7.6	5.3-7.36
*6/*6	8	6.7	5.4-7.36
*1/*4	3	2.5	1.05-4
*1/*22	2	1.7	1.3-2.1
*1/*9	1	0.8	<1.4
*6/*9	1	0.8	<0.8
*4/*5	1	0.8	<0.9
*4/*6	1	0.8	<2.1

B



^aPharmVar (<https://www.pharmgkb.org/page/cyp2b6RefMaterials>), Zanger et al, 2013

CYP2B6 aktivitása májban (N=105) a különböző *CYP2B6* genotípusok szerint



CYP2B6 polimorfizmusok: **27.6%** (29/105)

Nem-genetikai faktorok: **33.3%** (35/105)

CYP2B6 genotípus-fenotípus mismatch: **39.1%** (41/105)

Nem-genetikai faktor érintettség/információ nem elérhető				
Aktivitás	Poor	Intermediate	Normal	Rapid
Összes (N)	9	36	54	6
PM	1	3/3	12/18	6
Alacsony IM	5/3	12		
Magas IM		12/6	14	1/3
EM			2/8	2

Variable	CYP2B6 activity		
	Coefficient B (SE)	Coefficient B	P value
SNVs, non-genetic	Constant	67.09 (13.86)	<0.001
Model 1	g.-82T>C (rs34223104)	32.10 (56.79)	0.054
	g.15631G>T (rs3745274)	-79.98 (38.01)	-0.485
	g.18053A>G (rs2279343)	63.33 (36.59)	0.386
	g.25505C>T (rs3211371)	8.69 (18.76)	0.044
	Sex	-15.34 (16.01)	-0.092
	Alcohol consumption	-33.12 (26.75)	-0.119
	Amoxicillin/clavulanic acid therapy	-35.03 (28.38)	-0.120
Haplotype, non-genetic 2	Inducer therapy	65.90 (22.73)	0.311
	Constant	67.30 (13.70)	<0.001
	g.-82T/15631G/ 18053G /25505C	74.52 (40.75)	0.175
	g.-82T/15631G/18053A/ 25505T	9.34 (18.65)	0.047
	g.-82T/ 15631T / 18053G /25505T	-14.97 (17.53)	-0.090
	g.-82T/ 15631T /18053A/25505C	-46.98 (58.90)	-0.079
	g.- 82C /15631G/18053A/25505C	32.85 (56.52)	0.055
Model 2	Sex	-17.25 (16.04)	-0.104
	Activity reducing factors ^a	-41.08 (21.40)	-0.195
	Activity increasing factors	65.41 (23.29)	0.308

^a non-genetic factors: chronic alcohol consumption, amoxicillin + clavulanic acid therapy

Egyes CYP2B6 metabolizáló fenotípusok genotípus alapú becslése PharmVar adatbázis és a nem-genetikai faktorok általi fenokonverzió alapján

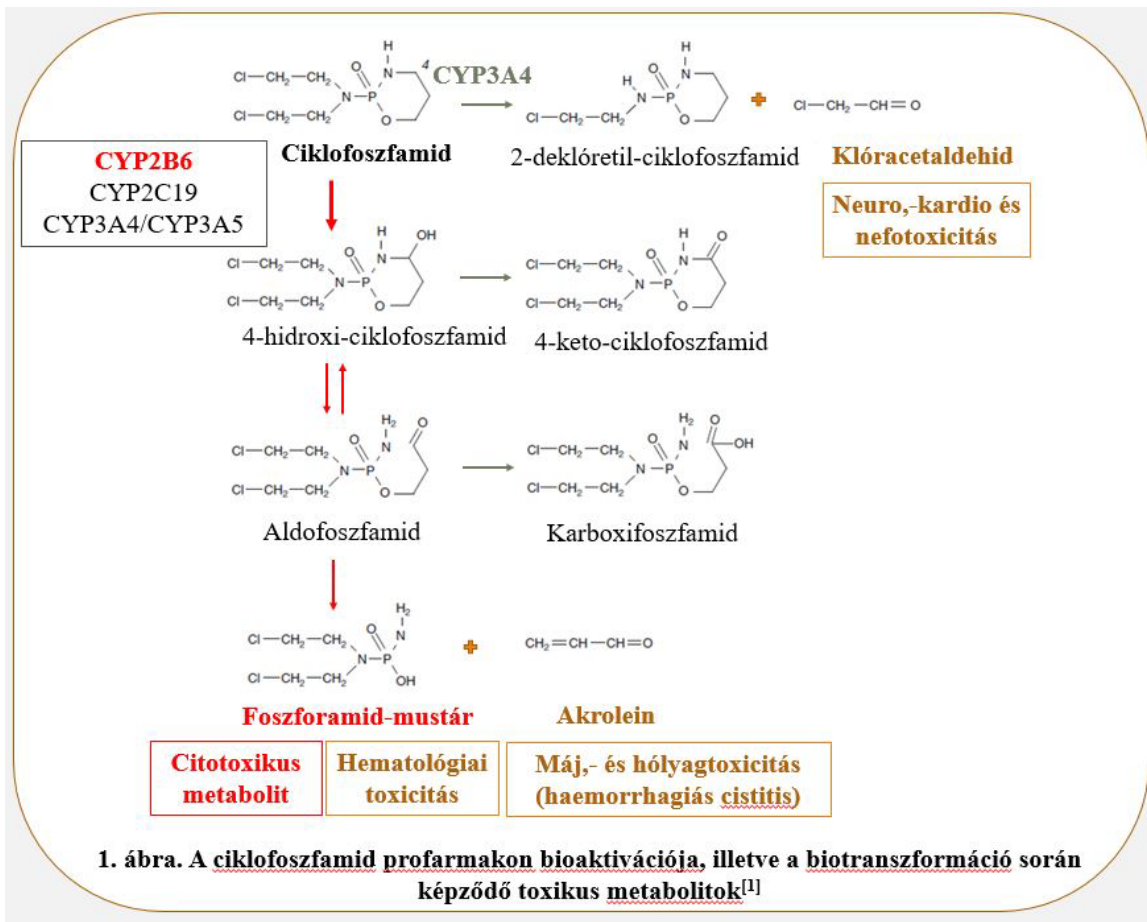
A szervdonorok 83%-a volt kitéve CYP2B6 indukálószer terápiának (19/23) és egy vagy két kópia *CYP2B6**6 allélt hordozott →

<i>CYP2B6</i> genotípus	CYP2B6 fenotípus		Fenokonverzió		
	CYP2B6 genotípus alapú becslés ^a	CYP2B6 aktivitás kategóriák	CYP2B6 indukálószer terápia ^b	CYP2B6 gátlószer terápia ^c	nem-specifikus nem-genetikai faktorok ^d
*6/*6 *6/*9	Poor	PM	IM-EM	PM	PM
*1/*6 *5/*6 *4/*6	Intermediate	alacsony IM	magas IM-EM	PM	PM
*1/*9					
*1/*1 *1/*5	Normal	magas IM	EM	alacsony IM-PM	alacsony IM-PM
*1/*4 *1/*22 *4/*5	Rapid/ Ultrarapid	EM	EM	magas IM	magas IM

PM poor metabolizer; IM intermediate metabolizer; EM extensive metabolizer

^aCPIC szerint; ^bCYP2B6 indukálószer: dexamethasone, methylprednisolone, prednisolone, hydrocortisone, cortisone, midazolam, felodipine, diazepam; ^cCYP2B6 gátlószerek: amlodipine; ^dnem-specifikus faktorok: krónikus alkohol fogyasztás, amoxicillin+klavulánsav terápia

Ciklofoszfamid alkiláló kemoterápiás szer



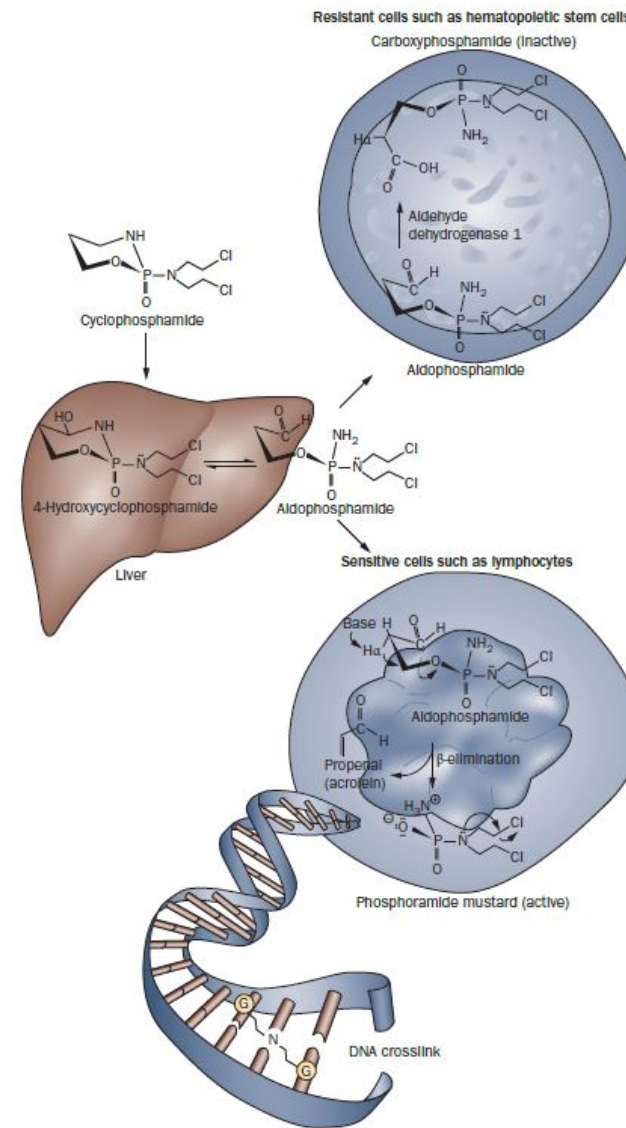
(Jonge, 2005)

Toxikus

- Citotermés ivarn
- Émel ivarn

Bioaktiv metabolit

- Húgy akrol
- Májto must
- Myel



rendszer,
rajtűszői,

esszió és

toxikus hatások:

cistitis):

foramid-

(Emadi, 2009)

Neuroblastoma

- Világszinten az újszülött és csecsemőkori daganatok 8-10%, **Magyarországon évente 15-20 új regisztrált eset**
- Neuroblast sejtek: idegi eredetű sejtelváltozások
- Elsődleges tumor kialakulása: mellékvese velőállománya, szimpatikus idegrendszer szöveteiben a nyaktól a medencéig
- Hagyományos gyógyszeres kemoterápiás protokolluk részeként **ciklofoszfamidot** alkalmazhatnak



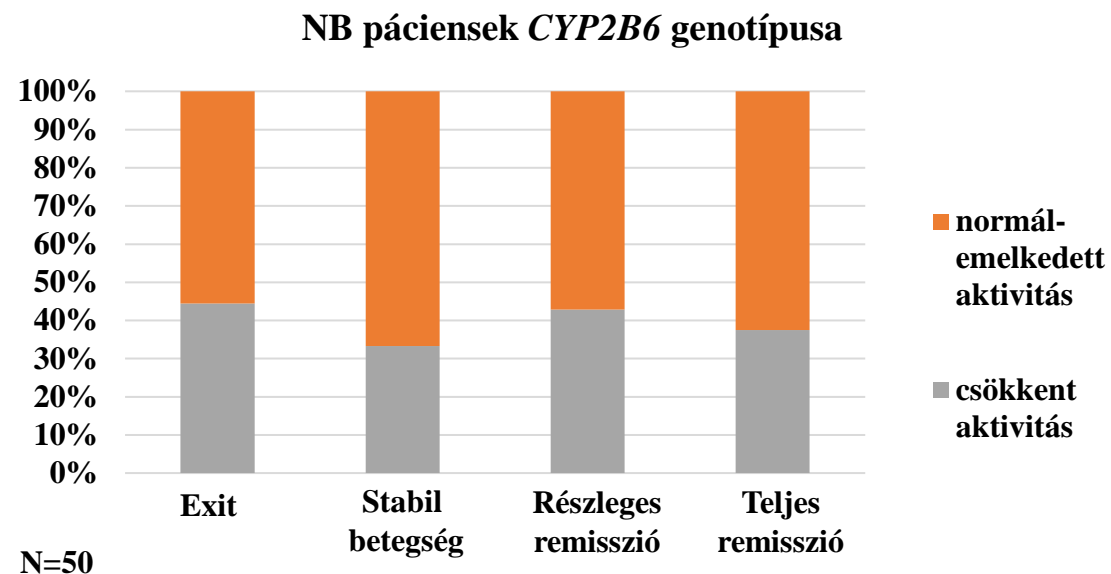
Lehetséges összefüggések keresése **a betegek CYP2B6 fenotípusa és terápia kimenetele, valamint a toxikus mellékhatások megjelenése között**

Hatóanyag	Hatóanyag típusa	Melyik kockázati csoportban alkalmazzák?
Carboplatin		Magas és alacsony/közepes
Cisplatin		Magas
Cyclophosphamide	Alkiláló szer	Magas és alacsony/közepes
Busulfan		Magas
Melphalan		Magas
Topotecan	Topoizomeráz inhibitor	Magas
Etoposide		Magas és alacsony/közepes
Vincristine	Vinka alkaloid	Magas és alacsony/közepes
Doxorubicin	Antraciklin	Magas és alacsony/közepes

CYP2B6 genotípus és allélgyakoriság NB páciensek esetén (N=51)

<i>CYP2B6</i> genotípus alapú fenotípus becslés		N	Gyakoriság %
	<i>CYP2B6</i> allélok		
	*4	6	5.8
	*5	12	11.7
	*6	20	21.5
	*22	1	0.9
	<i>CYP2B6</i> genotípusok		
'Csökkent' <i>CYP2B6</i> aktivitás (N=20)	*1/*6	14	27.4
	*6/*6	2	3.9
	*5/*6	2	3.9
	*4/*6	2	3.9
'Normál-emelkedett' <i>CYP2B6</i> aktivitás (N=31)	*1/*1	17	33.3
	*1/*5	9	17.6
	*4/*5	1	1.9
	*1/*4	3	5.8
	*1/*22	1	1.9

NB páciensek (N=50) *CYP2B6* genotípusa és terápia kimenetele közötti kapcsolat vizsgálata



- **Terápia kimenetel és *CYP2B6* genotípus függést nem találtunk (Fischer egzakt teszt)**
- **Lehetséges magyarázat: kombinált kemoterápia (számos hatóanyag, különböző hatásmechanizmussal és metabolikus útvonallal)**

Máj, kiválasztó szervrendszeri,- valamint hematológiai toxicitások fokozatai és előfordulásuk a ciklofoszfamid kezelés(ek) után

Toxicitás ^a	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4
Máj				
GPT ^b	18/50	4/50	1/50	-
GGT ^b	10/50	3/50	1/50	-
Kiválasztó szervrendszeri				
Kreatinin ^c	2/50	-	-	-
Csont/csontvelő				
Limfopénia ^d	3/48	2/48	42/48	-
Neutrofilek/granulociták ^e	2/50	3/50	4/50	41/50
Trombociták ^f	3/50	3/50	23/50	11/50

ULN: upper limit of normal; LLN: lower limit of normal

^bGrade 1: >ULN-2.5xULN; Grade 2: >2.5-5.0xULN; Grade 3: >5.0-20.0xULN; Grade 4: >20.0xULN

^cGrade 1: >ULN-1.5xULN; Grade 2: >1.5-3.0xULN; Grade 3: >3.0-6.0xULN; Grade 4: >6.0xULN

^dGrade 1: <LLN-1.0x10⁹/L; Grade 2: >0.5-1.0x10⁹/L; Grade 3: <0.5x10⁹/L

^eGrade 1: >1.5-2.0x10⁹/L; Grade 2: >1.0-1.5x10⁹/L; Grade 3: >0.5-1.0x10⁹/L; Grade 4: <0.5x10⁹/L

^fGrade 1: <LLN-75x10⁹/L; Grade 2: ≥50-<75x10⁹/L; Grade 3: ≥10-<50x10⁹/L; Grade 4: <10x10⁹/L

- NB páciensek (N=51)
- ^aNational Cancer Institute Common Toxicity Criteria (CTC) version 2.0
- **Máj: gyakori, enyhe** (Grade 1/Grade 2)
- **Kiválasztószervrendszeri: sporadikus, enyhe** (Grade 1)
- **Hematológiai: gyakori, nagymértékű** (Grade 3/Grade 4)

NB páciensek (N=51) *CYP2B6* genotípusa és máj,- valamint kiválasztószervrendszeri toxicitás megjelenése közötti kapcsolat vizsgálata

Toxicitás	'Csökkent' <i>CYP2B6</i> aktivitás	'Normál-emelkedett' <i>CYP2B6</i> aktivitás	P-érték*
Máj			
GPT	21.0% (4/19)	54.8% (17/31)	0.03
GGT	26.3% (5/19)	35.4% (11/31)	0.54
Kiválasztószervrendszeri			
Véres vizelet	0.0% (0/19)	9.6% (3/31)	0.27
Kreatinin	0.0% (0/19)	6.4% (2/31)	0.51
Nátrium	5.2% (1/19)	9.6% (3/31)	1.00
Kálium	26.3% (5/19)	25.8% (8/31)	1.00

*Fischer egzakt teszt

Lehetséges magyarázat: **májban**: foszforamid/akrolein toxikus metabolitok képződési helye,
toxicitás hatásának kiváltása lokális
csökkent/ fokozott metabolikus aktivitás → **csökkent/fokozott toxikus metabolit képződés**

kiválasztószervrendszer → **haemorrhágiás cisztitis**
kezelés: mesna (2-merkaptoetán szulfonát) protektív ágens

NB páciensek (N=51) *CYP2B6* genotípusa és hematológiai toxicitás megjelenése közötti kapcsolat vizsgálata

	'Csökkent' CYP2B6 aktivitás	'Normál-emelkedett' CYP2B6 aktivitás	P- érték*
<u>Limfociták</u> (N=48)			
Grade 1/2	22% (4/18)	3.5% (1/30)	0.06
Grade 3	72% (13/18)	96.5% (29/30)	0.02
<u>Trombociták</u> (N=51)			
Grade 1/2	20% (4/20)	9.6% (3/31)	0.41
Grade 3/4	40% (8/20)	74% (23/31)	0.02
<u>Neutrofilek</u> (N=49)			
Grade 1/2	10% (2/19)	6% (2/30)	0.63
Grade 3/4	85% (17/19)	94% (28/30)	0.63
<u>Monociták</u> (N=46)			
<LLN*	72% (13/18)	96% (27/28)	0.02
<u>Eosinofilek</u> (N=46)			
<LLN*	72% (13/18)	82% (23/28)	0.48

Lehetséges magyarázat:

Csökkent/fokozott metabolikus aktivitás



Csökkent/fokozott toxikus metabolit képződés

*Fischer egzakt teszt, †LLN: lower limit of normal

Összegzés

- Módszert fejlesztettünk és validáltuk a g.18053A>G SNV azonosítására, mely a *CYP2B6**4 és *CYP2B6**6 allélokban fordul elő.
- Mind a *CYP2B6* genetikai és nem-genetikai variációk jelenlétét figyelembe kell venni a *CYP2B6* fenotípus értékelésénél.
- A *CYP2B6* genotípus-fenotípus eltérésének megfelelő tisztázása javíthatja az elsődlegesen vagy kizárólag a *CYP2B6* enzim által metabolizált gyógyszerek (pl. ciklofoszfamid, efavirenz, bupropion, ketamin, metadon) farmakokinetikai eltéréseinek és klinikai kimenetelének előrejelzését.
- Daganatos páciensek *CYP2B6* metabolikus aktivitása összefüggést mutathat a ciklofoszfamid kezelés után fellépő szervspecifikus toxikus mellékhatások megjelenésével, viszont a terápia kimenetelével nem találtunk összefüggést.

Résztevők, köszönetnyilvánítás

Természettudományi Kutatóközpont

Metabolikus Gyógyszer- kölsönhatások Kutatócsoport

Monostory Katalin
Kiss Ádám Ferenc
Erdős Réka
Fekete Ferenc
Incze Evelyn
Déri Máté

Onkológiai Biomarker Kutatócsoport

Fekete János

Köszönöm a figyelmet!

Semmelweis Egyetem

Transzplantációs és Sebészeti Tanszék

Kóbori László
Sárváry Enikő

II. sz. Gyermekklinika

Garami Miklós
Brueckner Edit
Büdi Tamás

I.sz Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet

Micsik Tamás

2018-1.2.1-NKP-2018-00005



AZ NKFI ALAPBÓL
MEGVALÓSULÓ
PROJEKT

VEKOP-2.3.3-15-2017-00014

SZÉCHENYI 2020



Európai Unió
Európai Regionális
Fejlesztési Alap



BEFEKTETÉS A JÖVŐBE