
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Studii privind farmacogenetica în tratamentul cu fluoropirimidine

Doctorand **Andrada-Larisa Deac**

Conducător de doctorat Prof.dr. **Anca Dana Buzoianu**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Fluoropirimidine – istoric și metabolizare	19
1.1. Generalități	19
1.1. Metabolizarea fluoropirimidinelor	20
2. Toxicitate și metode de determinare	23
2.1. Toxicitatea fluoropirimidinelor	23
2.1.1. Mecanismul toxicității	24
2.2. Metode fenotipice	24
2.3. Genotiparea	26
2.4. Scorul de activitate genetică	29
2.5. Alte mutații asociate tratamentului cu fluoropirimidine	32
2.6. Monitorizarea terapeutică a medicamentului	33
3. Implementarea și recomandarea testării	35
3.1. Implementarea testării	35
3.2. Recomandări	36
3.3. Tendințe în tratamentul cu fluoropirimidine	38
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru	43
2. Metodologie generală	45
3. Studiul 1. Analiza frecvenței variantelor genetice mutante ale genei DPYD și a asocierii cu reacțiile adverse severe	47
3.1. Introducere	47
3.2. Ipoteza de lucru	48
3.3. Material și metodă	48
3.4. Rezultate	52
3.5. Discuții	75
3.6. Concluzii	87
4. Studiul 2. Analiza corelației dintre concentrația 5-fluorouracilului și eficacitatea, respectiv siguranța tratamentului	89
4.1. Introducere	89
4.2. Ipoteza de lucru/obiective	90
4.3. Material și metodă	90
4.4. Rezultate	92

4.5. Discuții	96
4.6. Concluzii	106
5. Studiul 3. Atitudinea medicilor oncologi din România cu privire la testarea DPYD	109
5.1. Introducere	109
5.2. Ipoteza de lucru	109
5.3. Material și metodă	110
5.4. Rezultate	114
5.5. Discuții	123
5.6. Concluzii	127
6. Concluzii generale	129
7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	131
REFERINȚE	133
ANEXE	152

Cuvinte cheie

Fluoropirimidine, cancer, DPD, gena DPYD, testare genetică, frecvența mutațiilor, reacții adverse, monitorizarea terapeutică a medicamentului, AUC, răspuns terapeutic, recomandarea testării, rambursare

Rezumat

Stadiul actual al cunoașterii

Fluoropirimidinele reprezintă una din cele mai utilizate clase de chimioterapice la nivel mondial, fiind anual administrate la peste milioane de pacienții diagnosticați cu cancer. Conform Organizației Mondiale a Sănătății chimioterapicele din această clasă fac parte din lista medicamentelor esențiale.

30% din pacienții care sunt sub tratament cu fluoropirimidine prezintă reacții adverse asociate acestui tratament. Principalul mecanism responsabil de apariția reacțiilor adverse îl constituie deficitul enzimei dihidropirimidin dehidrogenaza (DPD), enzimă responsabilă de "metabolismul detoxifiant" al 5-fluorouracilului (5-FU). De-a lungul timpului au fost propuse mai multe metode de determinare a deficitului DPD dintre care cea mai mare utilitate și validare clinică o are testarea variantelor mutante ale genei DPYD, și anume variantele DPYD*2A, DPYD*9B, DPYD*13 și HapB3. Prezența polimorfismelor genei DPYD sunt responsabile de apariția a 30-80% din reacțiile adverse, iar prezența uneia din cele patru variante de asociază cu un risc absolut de deces de 2,3%.

Monitorizarea terapeutică a medicamentului are ca scop individualizarea tratamentului cu îmbunătățirea eficienței și cu minimizarea reacțiilor adverse. 5-FU are criteriul principal pentru determinarea concentrației terapeutice a medicamentului și anume are stabilită relația între expunerea la medicament și toxicitate, respectiv eficacitatea tratamentului. Studiile clinice efectuate asupra monitorizării terapeutice a medicamentului au stabilit ca și cut-off pentru concentrația de sub curbă (AUC) o valoare între 20-30 mg*h/L. O valoare sub 20 mg*h/L este considerată a fi sub-terapeutică, iar una peste 30 mg*h/L a fost asociată cu un risc crescut de apariție a reacțiilor adverse severe. Actual, doza de 5-FU administrată pe baza suprafeței corporale a pacientului este asociată cu o variabilitate crescută a concentrației acestuia, doar 15% din pacienții atingând o concentrație optimă. Numeroase studii au evidențiat că ajustarea dozei de 5-FU se corelează cu o eficacitate terapeutică mai bună și cu o rată a reacțiilor adverse mai scăzută.

Grupurile de farmacogenetică din Olanda și Franța, au efectuat recomandări de ajustare a dozei în funcție de fenotiparea, respectiv genotiparea deficitului DPD, recomandări care sunt susținute de către Agenția Europeană a Medicamentului (EMA) și Societatea Europeană de Oncologie Medicală (ESMO) din martie 2020.

Contribuția personală

Studiul 1. Analiza frecvenței variantelor genetice mutante ale genei DPYD și a asocierii cu reacțiile adverse severe

În contextul creșterii incidenței cazurilor de cancer în România, crește și utilizarea fluoropirimidinelor, respectiv și toxicitatea asociată lor. Principala enzimă implicată în metabolizarea 5-FU și a promedicamentelor acestuia este enzima DPD. În apariția toxicității sunt implicați numeroși factori din care o mare parte sunt datorate deficitului DPD. Acest deficit se poate cuantifica prin metode fenotipice și genotipice. Metoda genotipică validată este reprezentată de determinarea unor polimorfisme ale genei DPYD pentru care a fost dovedită asocierea cu reacții adverse de severitate crescută.

Ghidurile internaționale recomandă determinarea deficitului DPD fie prin testare fenotipică, fie genotipică înaintea debutului tratamentului și ajustarea dozei în funcție de această testare.

Acest prim studiu și-a propus determinarea frecvenței celor patru variante ale genei DPYD la o populație de pacienți din România. Un alt obiectiv al acestui studiu a fost determinarea incidenței reacțiilor adverse și analiza acestora în relație cu prezența variantelor mutante. În acest sens, au fost înrolați în acest studiu 58 de pacienți diagnosticați cu cancer cărora le-a fost recoltată o probă de sânge înainte de debutul tratamentului cu 5-FU pentru efectuarea testării genetice. Testarea genetică a fost efectuată prin RT PCR.

Frecvența generală a mutațiilor DPYD a fost de 13,8%. Au fost identificate prezența variantelor DPYD*2A în 3,45% din cazuri și a HapB3 în 10,35% din cazuri. În ceea ce privește reacțiile adverse de orice grad a fost înregistrată o frecvență generală de 93,1%, iar a reacțiilor adverse de gradul 3 și 4 de 35%. Toții purtătorii unei variante mutante au prezentat reacții adverse, iar incidența reacțiilor adverse severe la acești pacienți au fost de trei ori mai mare. Datele obținute legate de frecvența mutației DPYD au fost comparate cu cele din alte țări. Un aspect interesant al acestui studiu a fost reprezentat și de analiza costurilor necesare pentru o testare genetică și compararea cu costurile generate de o spitalizare în urma unei reacții adverse severe.

Acest studiu vine să sublinieze importanța testării genetice, a genei DPYD în cazul de față și cum aceasta ne poate ghida conduita terapeutică și poate reprezenta și o modalitate de eficientizare a costurilor.

Studiul 2. Analiza corelației dintre concentrația 5-fluorouracilului și eficacitatea, respectiv siguranța tratamentului

Monitorizarea terapeutică a medicamentului a fost propusă ca metodă de personalizare a tratamentului cu 5-FU. Variabilitatea concentrației plasmatice inter-individuale și intra-individuale, relația dintre expunerea la medicament și eficacitate, respectiv toxicitate face din 5-FU să fie un candidat perfect pentru monitorizarea

terapeutică. Doza de 5-FU din protocoalele chimioterapice utilizate în practica clinică sunt calculate în funcție de suprafața corporală a pacientului. Numeroase date au sugerat că ajustarea dozei de tratament în funcție de concentrația plasmatică a medicamentului determinată în cadrul primului ciclu de tratament reprezintă o metodă de eficientizare a tratamentului. Intervalul țintă stabilit este între 20-30 mg*h/L

Scopul acestui studiu a constat în determinarea AUC a 5-FU și ulterior corelarea cu reacțiile adverse și răspunsul terapeutic.

Lotul de pacienți din cadrul acestui studiu a fost același ca și pentru studiul 1. Pacienților le-a fost recoltată o probă de sânge în primele 12 ore de la debutul infuziei continue de 5-FU. Determinarea concentrației plasmatică a fost realizată prin HPLC. Mai mult de jumătate din pacienți au avut o valoare a concentrației plasmatică sub 20 mg*h/L, lucru care se aliniază cu datele din literatură. La analiza asocierii dintre reacțiile adverse și AUC, a fost demonstrată o asociere de intensitate medie cu reacțiile adverse hematologice și de intensitate foarte slabă cu reacțiile adverse gastrointestinale și cardiovasculare. Răspunsul terapeutic a fost cuantificat după prima evaluare imagistică și a fost înregistrată o asociere de intensitate foarte slabă cu AUC. Nici un pacient purtător al unei variante mutante nu a avut o valoare a AUC peste 30 mg*h/L.

În ciuda faptului că prezentului studiu a fost unul observațional, monitorizarea terapeutică a medicamentului și ajustarea dozei de tratament în consecință poate reprezenta o metodă fezabilă de ameliorare a rezultatelor tratamentului și a reacțiilor adverse.

Studiul 3. Atitudinea medicilor oncologi din România cu privire la testarea DPYD

Conform datelor GLOBOCAN din 2020, în România, sunt diagnosticate anual aproximativ 100.000 cazuri noi de cancer. 30% din aceste cazuri au indicație de tratament cu fluoropirimidine în monoterapie sau în combinație cu alte chimioterapice conform ghidurilor de tratament.

Până în prezent în cadrul laboratoarelor din România este disponibilă doar determinarea variantei DPYD*2A, dar care nu este rambursată de către autoritățile naționale.

Cel de-al treilea studiu al acestei teze de cercetare doctorală s-a desfășurat sub forma unui chestionar online distribuit prin intermediul Societății Naționale de Oncologie Medicală din România (SNOMR) care medici oncologi specialiști și primari prescribtori. Subiectul principal al chestionarului l-a constituit evaluarea nivelului de recomandare al testării mutației genei DPYD. Rata de completare a chestionarului a fost de 28,2%, acesta fiind completat de 93 de medici din 329. Rata cea mai mare de completare a fost înregistrată în segmentul de vârstă 30-40 de ani. Un sfert din responderi au declarat că utilizează zilnic protocoale de chimioterapie de bază de fluoropirimidine, iar reacțiile adverse apar cu o intensitate medie în 60% din cazuri. Atitudinea clinică actuală a mai mult de jumătate din medici oncologi care au răspuns întrebărilor chestionarului în cazul apariției unor reacții adverse severe este de a reduce doza cu 25%. Aproximativ 20% din oncologi din

România nu au recomandat niciodată testarea genei DPYD, iar cei care o fac o recomandă în cazul reacțiilor adverse severe.

Motivul principal pentru care testarea nu este recomandată îl constituie lipsa rambursării, urmat de discrepanțele dintre ghidurile societăților internaționale cu privire la acest subiect. În cazul unei posibile rambursări, 73% din medicii oncologi ar recomanda testarea înainte de debutul tratamentului cu fluoropirimidine.

Datele obținute din acest chestionar relevă realitatea din practica clinică și aduce informații utile despre utilizarea fluoropirimidinelor, apariția și severitatea reacțiilor adverse, recomandarea testării și principala piedică în a face recomandarea.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Contribuțiile inovative ale acestei teze de cercetare doctorală vizează tratamentul cu fluoropirimidine, în special analiza reacțiilor adverse asociate.

În primul studiu al acestei teze doctorale a fost raportată pentru prima dată frecvența mutațiilor genei DPYD la o populație din România. Raportarea incidenței reacțiilor adverse asociate unui tratament oncologic constituie o altă premieră, datele legate de acest subiect pentru țara noastră lipsind. Demonstrarea faptului că purtătorii variantelor mutante prezintă reacții adverse mai severe fortifică datele din literatura de specialitate și importanța acestei testării.

Determinarea concentrației plasmatice în cadrul celui de-al doilea studiu este o altă premieră națională, până în prezent nerealizându-se un studiu care să se concentreze pe monitorizarea terapeutică a 5-FU. Chiar dacă studiul a fost unul observațional, prin intermediul concentrațiilor obținute s-a încercat corelarea cu reacțiile adverse. Au fost observate asocieri de diverse grade de intensitate în funcție de tipul reacției adverse. Având în vedere datele din literatura de specialitate cu privire la acest subiect, consider că pentru a valida această metodă în practica clinică este nevoie de mai multe studii, loturi mai mari de pacienți și o urmărire mai îndelungată.

Studiul final al tezei s-a desfășurat sub forma unui chestionar online distribuit medicilor oncologi din România. Acest studiu aduce informații extrem de importante cum ar fi creionarea tipologiei medicului oncologic care recomandă această testare, date legate de utilizarea fluoropirimidinelor, date clinice legate de frecvența și severitatea reacțiilor adverse, atitudinea în cazul apariției acestora și a testării mutației genetice. Informațiile obținute în urma acestui chestionar evidențiază principala problemă care face ca această testare să nu fie recomandată și anume problema rambursării.

În ciuda faptului că subiectul tezei este unul intens studiat, datele oferite sunt deosebit de importante pentru conduita clinică și reprezintă premiere pentru România poziționându-ne în rândul țărilor care au raportat date legate de acest subiect.

SUMMARY OF THE PhD THESIS

Studies on pharmacogenetics in the treatment with fluoropyrimidines

PhD Student **Andrada-Larisa Deac**

PhD Supervisor Prof.dr. **Anca Dana Buzoianu**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	15
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Fluoropyrimidines – history and metabolism	19
1.1. Generalities	19
1.1. Metabolism of fluoropyrimidines	20
2. Toxicity and determination methods	23
2.1. Fluoropyrimidines toxicity	23
2.1.1. Mechanism of toxicity	24
2.2. Phenotypic methods	24
2.3. Genotyping	26
2.4. Genetic activity score	29
2.5. Other mutations associated with fluoropyrimidines treatment	32
2.6. Therapeutic drug monitoring	33
3. Implementation and recommendation of testing	35
3.1. Implementation of testing	35
3.2. Recommendations	36
3.3. Trends in fluoropyrimidines	38
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Hypothesis	43
2. General methodology	45
3. First study. Analysis of the frequency of mutant genetic variants of the DPYD gene and the association with severe adverse events	47
3.1. Introduction	47
3.2. Hypothesis	48
3.3. Material and method	48
3.4. Results	52
3.5. Discussions	75
3.6. Conclusions	87
4. Second study. Analysis of the correlation between the concentration of 5-fluorouracil and the effectiveness, respectively the safety of the treatment	89
4.1. Introduction	89
4.2. Hypothesis/objectives	90
4.3. Material and method	90
4.4. Results	92
4.5. Discussions	96

4.6. Conclusions	106
5. Third study. Attitude of Romanian oncologists regarding DPYD testing	109
5.1. Introduction	109
5.2. Hypothesis	109
5.3. Material and methods	110
5.4. Results	114
5.5. Discussions	123
5.6. Conclusions	127
6. General conclusions	129
7. Originality and innovative contributions of thesis	131
REFERENCES	133
ANNEXES	152

Keywords

Fluoropyrimidines, cancer, DPD, DPYD gene, genetic testing, mutation frequency, adverse events, therapeutic drug monitoring, AUC, therapeutic response, testing recommendation, reimbursement

Summary

Current state of knowledge

Fluoropyrimidines represent one of the most used classes of chemotherapy worldwide, being annually administered to more than two million of patients diagnosed with cancer. According to the World Health Organization, chemotherapy drugs in this class are part of the list of essential drugs.

30% of patients who are under treatment with fluoropyrimidines have side effects associated with this treatment. The main mechanism responsible for the occurrence of adverse events is the deficiency of the enzyme dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), the enzyme responsible for the "detoxifying metabolism" of 5-fluorouracil (5-FU). Over time, several methods for determining DPD deficiency have been proposed, of which the most useful and clinically validated is the testing of mutant variants of the DPYD gene, namely the variants DPYD*2A, DPYD*9B, DPYD*13 and HapB3. The presence of DPYD gene polymorphisms is responsible for the occurrence of 30-80% of adverse events, and the presence of one of the four variants is associated with an absolute risk of death of 2.3%.

Therapeutic monitoring of the drug is aimed to individualize treatment with improved efficiency and minimization of adverse events. 5-FU has the main criterion for determining the therapeutic concentration of the drug, namely the relationship between drug exposure and toxicity, respectively the effectiveness of the treatment, has been established. Clinical studies on the therapeutic monitoring of the drug established a value between 20-30 mg*h/L as the cut-off for the concentration under the curve (AUC). A value below 20 mg*h/L is sub-therapeutic, and one above 30 mg*h/L has been associated with an increased risk of severe adverse reactions. Currently, the dose of 5-FU administered based on the patient's body surface area is associated with increased concentration variability, with only 15% of patients achieving an optimal concentration. Numerous studies have shown that 5-FU dose adjustment correlates with better therapeutic efficacy and a lower rate of adverse reactions.

The pharmacogenetics groups in the Netherlands and France have made recommendations for dose adjustment according to DPD deficiency phenotyping, respectively genotyping, recommendations that are supported by the European Medicines Agency (EMA) and the European Society of Medical Oncology (ESMO) since March 2020.

Personal contribution

Study 1. Analysis of the frequency of mutant genetic variants of the DPYD gene and the association with severe adverse events

In the context of the increase in the incidence of cancer cases in Romania, the use of fluoropyrimidines, and the toxicity associated with them, is also increasing. The main enzyme involved in the metabolism of 5-FU and its prodrugs is the DPD enzyme. Numerous factors are involved in the occurrence of toxicity, most of which are due to DPD deficiency. This deficiency can be quantified by phenotypic and genotypic methods. The validated genotypic method is represented by the determination of some polymorphisms of the DPYD gene for which the association with adverse events of increased severity has been proven.

International guidelines recommend determining DPD deficiency by either phenotypic or genotypic testing prior to initiation of treatment and dose adjustment based on this testing.

This first study aimed to determine the frequency of the four variants of the DPYD gene in a population of patients from Romania. Another objective of this study was to determine the incidence of adverse events and analyze them in relation to the presence of mutant variants. In this regard, 58 patients diagnosed with cancer who had a blood sample taken before the start of 5-FU treatment for genetic testing were enrolled in this study. Genetic testing was performed by RT PCR.

The overall frequency of DPYD mutations was 13.8%. The presence of DPYD*2A variants in 3.45% of cases and HapB3 in 10.35% of cases were identified. Regarding adverse events of any degree, an overall frequency of 93.1% was recorded, and of adverse events of grade 3 and 4, 35%. All carriers of a mutant variant have adverse events, and the incidence of severe adverse events in these patients was three times higher. The data obtained related to the frequency of the DPYD mutation were compared with those from other countries. An interesting aspect of this study was also the analysis of the costs required for a genetic test and the comparison with the costs generated by a hospitalization following a severe adverse event.

This study comes to emphasize the importance of genetic testing, of the DPYD gene in the present case, and how it can guide our therapeutic conduct and can also represent a way to make costs more efficient.

Study 2. Analysis of the correlation between the concentration of 5-fluorouracil and the efficacy and safety of the treatment

Therapeutic drug monitoring has been proposed as a method to personalize treatment with 5-FU. Inter-individual and intra-individual plasma concentration variability, the relationship between drug exposure and efficacy, respectively toxicity

make 5-FU a perfect candidate for therapeutic monitoring. The dose of 5-FU in chemotherapy protocols used in clinical practice is calculated according to the patient's body surface area. Numerous data have suggested that adjusting the treatment dose according to the plasma concentration of the drug determined within the first cycle of treatment represents a method of treatment efficiency. The established target range is between 20-30 mg*h/L

The aim of this study was to determine the AUC of 5-FU and subsequently correlate with adverse events and therapeutic response.

The patient population of this study was the same as in the first study. Patients had a blood sample collected within the first 12 hours after the start of the continuous infusion of 5-FU. Plasma concentration was determined by HPLC. More than half of the patients had a plasma concentration value below 20 mg*h/L, which is in line with the literature data. In the analysis of the association between adverse events and AUC, an association of moderate intensity with hematological adverse events and of very weak intensity with gastrointestinal and cardiovascular adverse events was demonstrated. Therapeutic response was quantified after the first imaging assessment and a very weak association with AUC was recorded. No patient carrying a mutant variant had an AUC value above 30 mg*h/L.

Even though the present study was an observational one, therapeutic monitoring of the drug and adjustment of the treatment dose accordingly may represent a feasible method to improve treatment outcomes and adverse events.

Study 3. Attitude of Romanian oncologists regarding DPYD testing

According to GLOBOCAN data from 2020 for Romania, approximately 100,000 new cases of cancer are diagnosed annually. 30% of these cases have an indication for treatment with fluoropyrimidines as monotherapy or in combination with other chemotherapy according to the guidelines.

Until now, only the determination of the DPYD*2A variant is available in Romanian laboratories, but that is not reimbursed by the national authorities.

The third study of this doctoral research thesis was carried out in the form of an online questionnaire distributed through the National Society of Medical Oncology in Romania (SNOMR) to medical oncologists. The main topic of the questionnaire was the evaluation of the level of recommendation of DPYD gene mutation testing. The completion rate of the questionnaire was 28.2%, it was completed by 93 doctors out of 329. The highest completion rate was recorded in the 30-40 years age segment. A quarter of responders stated that they use daily fluoropyrimidine-based chemotherapy protocols, and side effects occur with moderate intensity in 60% of cases. The current clinical attitude of more than half of the oncologists who responded to the questionnaire questions in the event of severe side effects is to reduce the dose by 25%. Approximately 20% of oncologists in Romania have never recommended DPYD gene testing, and those who do recommend it in case of severe adverse events.

The main reason for not recommending testing is lack of reimbursement, followed by discrepancies between international societies' guidelines on the subject. Given a possible reimbursement, 73% of oncologists would recommend testing prior to initiation of fluoropyrimidine therapy.

The data obtained from this questionnaire reveal the reality of clinical practice and bring useful information about the use of fluoropyrimidines, the occurrence and severity of adverse reactions, the recommendation of testing and the main obstacle to making the recommendation.

Originality and innovative contributions of thesis

The innovative contributions of this doctoral research thesis are aimed at the treatment with fluoropyrimidines, especially the analysis of the associated side effects.

In the first study of this doctoral thesis, the frequency of DPYD gene mutations in a Romanian population was reported for the first time. Reporting the incidence of adverse events associated with an oncological treatment is another premiere, as the data related to this subject for our country is missing. The demonstration that carriers of the mutant variants show more severe adverse events strengthens the data from the literature and the importance of this testing.

The determination of the plasma concentration in the second study is another national premiere, until now no study has been carried out that focuses on the therapeutic monitoring of 5-FU. Even though the study was an observational one, the correlation with adverse reactions was attempted through the obtained concentrations. Associations of varying degrees of intensity were observed depending on the type of adverse event. Considering the data in the specialized literature on this subject, I believe that to validate this method in clinical practice we need more studies, larger groups of patients and a longer follow-up.

The final study of the thesis was carried out in the form of an online questionnaire distributed to oncologists in Romania. This study brings extremely important information such as the typology of the oncologist who recommends this test, data related to the use of fluoropyrimidines, clinical data related to the frequency and severity of adverse events, the attitude in case of their occurrence and genetic mutation testing. The information obtained from this questionnaire highlights the main issue that makes this test not recommended, namely the issue of reimbursement.

Even though the subject of the thesis is an intensively studied one, the data provided are particularly important for clinical conduct and represent a first for Romania, placing us among the countries that have reported data related to this subject.