

**DETECTION OF PHARMACOGENETIC MARKERS AND
HAPLOTYPE DETERMINATION OF *CYP2B6* CORRECTED
WITH PLASMA *EFVIRENZ* CONCENTRATION IN HIV-1
INFECTION**



PATTAMAWAN PRAPAITHONG

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(CLINICAL PATHOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2011**

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

DETECTION OF PHARMACOGENETIC MARKERS AND HAPLOTYPE DETERMINATION OF *CYP2B6* CORRECTED WITH PLASMA EFAVIRENZ CONCENTRATION IN HIV-1 INFECTION

PATTAMAWAN PRAPAITHONG 5237514 RACP/M

M.Sc. (CLINICAL PATHOLOGY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: CHONLAPAT SUKASEM, Ph.D.,
WASUN CHANTRATITA, Ph.D., WEERAWAT MANOSUTHI, M.D.,
EKAWAT PASOMSUB, Ph.D.

ABSTRACT

Efavirenz (EFV) is an anti-retroviral drug that is used for combating the replication of the HIV-1 virus. The main catalyzed enzyme of EFV is *CYP2B6*. Followed by drug administration, the variation of drug metabolism is due to genetic polymorphism. Previous studies have shown the influence of *CYP2B6* at position 516G > T polymorphism that reduces enzyme catalyzed activity and results in a higher drug level leading to CNS toxicity. Thus, there is a good understanding of genetic variation of *CYP2B6* that allows prediction of the pharmacokinetics of efavirenz. The aims of this study were (1) to know the correlation between SNPs of *CYP2B6 gene* and efavirenz plasma concentrations in HIV infected Thai adults and to know the allele frequency of *CYP 2B6* genetic polymorphism that is associated with Efavirenz in the Thai population; (2) to determine the haplotype of *CYP2B6* that can be used as a tool for calculating dosages of Efavirenz; (3) to suggest the dose adjusted formulation of EFV for HIV patients. All 52 samples were selected from adult subjects who are participating in the PHPT network Hospitals. Stored blood samples collected from Thai adults within this cohort were selected for EFV plasma drug level and *CYP2B6* SNP analysis. Nine Single nucleotide polymorphic genotypes *CYP 2B6* c.64C > T, c.3003T > C, c.499C > G, c.516G > T, c.785A > G, c.18492T > C, c.1375A > G, c.21563C > T and 1459C > T were assessed using the TaqMan® real-time PCR assay at the Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital and efavirenz plasma drug concentrations were measured by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) at the Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University. The Kolmogorov-Smirnov test (K-S test) was used to test whether EFV plasma level departed from normal distribution at a 95% confidence level. The Mann-Whitney test or *t*-test was used to determine statistical significance levels for differences in mean values of test variables among different genotype groups depending on the normality of EFV plasma levels. The results showed that 4 SNPs from 9 SNPs were significantly associated with EFV >MTC ($P < 0.05$). The composite genetic model used a combination from 4 SNPs and assumes that GACC and TGTT haplotype blocks were significantly associated with EFV > MTC ($P < 0.05$). In conclusion, our haplotype blocks may have value in predicting of EFV concentrations due to a stronger association with EFV plasma concentrations than with the *CYP2B6* c.516G > T polymorphism alone.

KEY WORDS: EFAVIRENZ / *CYP 2B6*/ PHARMACOGENETICS / SNPs / HIV INFECTION / CNS TOXICITY

80 pages

การตรวจตัวบ่งชี้ทางเภสัชพันธุศาสตร์และการแปลผล Haplotype ของยีน CYP 2B6 ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการออกฤทธิ์ของยาเอฟาวิเรนซ์ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีแบบที่ 1

DETECTION OF PHARMACOGENETIC MARKERS AND HAPLOTYPE DETERMINATION OF CYP2B6 CORRECTED WITH PLASMA EFAVIRENZ CONCENTRATION IN HIV-1 INFECTION

ปีทอมวรรณ ประไพทอง 5237514 RACP/M

วท.ม. (พยาบาลวิเทศคลินิก)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ชลภัทร สุขเกษม, ประ.ด. (พยาบาลวิเทศ), วสันต์ จันทราทิตย์, ประ.ด. (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย), นพ.วีรวัฒน์ มโนสุทธิ, เอกวัฒน์ ผสมทรัพย์, ประ.ด. (พยาบาลวิเทศ)

บทคัดย่อ

ยาเอฟาวิเรนซ์ เป็นยาด้านเชื้อไวรัสเอชไอวีแบบที่ 1 โดยมีเอนไซม์ CYP2B6 ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักที่สำคัญในการเมแทบอลิซึมยาดังกล่าว พบว่าผู้ที่ใช้ยาส่วนหนึ่ง มีปริมาณของระดับยาในกระแสเลือดที่แตกต่างกัน โดยปัจจัยทางด้านเภสัชพันธุศาสตร์ โดยการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าผู้ที่มีการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งพันธุกรรมที่ 516 G>T จะมีระดับการทำงานของเอนไซม์ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับคนปกติ ดังนั้น การศึกษาในครั้งนี้จะเป็นการศึกษาเพื่อดูความถี่อัลลีลในแต่ละตำแหน่งของยีน CYP2B6 และความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน CYP2B6 กับระดับยาเอฟาวิเรนซ์ในกระแสเลือด ในกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีแบบที่ 1 เพื่อนำไปสร้าง haplotype สำหรับการดูระดับยาที่ใช้ในผู้ป่วยแต่ละราย ซึ่งตัวอย่างที่นำมาศึกษาได้รับจากผู้ป่วยที่เข้าร่วมในโครงการวิจัยการทดลองทางคลินิก PHPT-2 โดยเป็นตัวอย่างที่มีการหาระดับความเข้มข้นของยา Efavirenze ในกระแสเลือด โดยวิธี HPLC ไว้แล้ว เพื่อนำไปศึกษาลักษณะความหลากหลายทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นบนยีน CYP2B6 ที่ตำแหน่ง c.64C>T, c.3003T>C, c.499C>G, c.516G>T, c.785A>G, c.18492T>C, c.1375A>G, c.21563 C>T และ 1459C>T ของผู้ป่วยโดยวิธี real-time PCR ซึ่งข้อมูลที่ได้จะมีการตรวจสอบลักษณะการกระจายของข้อมูลแบบปรกติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ด้วยการทดสอบ Kolmogorov-Smirnov test (K-S) จากนั้นจะทำการทดสอบแบบ Mann-Whitney test หรือ t-test มาตรวจสอบระดับความมีนัยสำคัญทางสถิติของความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของค่าทดสอบในระหว่างกลุ่มจีโนไทป์ ทำยสุดจะเป็นการวิเคราะห์ haplotype โดยใช้โปรแกรม Haploview4.2 จากผลการศึกษาพบว่า มี 4 SNPs ที่มีความสัมพันธ์กับระดับยาที่สูงกว่าช่วงการรักษาอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อนำมาสร้างเป็น Haplotype block พบว่าลักษณะ Haplotype pattern แบบ GACC ให้ค่า predictive value ในการตรวจสอบหาผู้ที่มีแนวโน้มจะเกิดอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยาเอฟาวิเรนซ์ได้มากกว่าการดู SNP ตำแหน่งที่ 516G>T เพียงอย่างเดียว