

DALLA FARMACOGENETICA ALLA FARMACOGENOMICA: LA NUOVA ERA DELLA TERAPIA PERSONALIZZATA IN NEFROLOGIA

Gianluigi Zaza, Simona Granata, Margherita Mangino, Giuseppe Grandaliano, Francesco Paolo Schena

Unità di Nefrologia, Dialisi e Trapianto, Dipartimento dell'Emergenza e dei Trapianti d'Organo (DETO), Università degli Studi, Bari

From pharmacogenetics to pharmacogenomics: the start of a new era of personalized medicine in nephrology

Recent evidence suggests that adverse drug reactions are a major cause of death and hospital admissions in Europe and the United States. Environmental/non-genetic as well as genetic factors are responsible for the great interpatient variability in drug metabolism and in the molecular interactions between drugs and therapeutic targets. By means of pharmacogenetic approaches, several genetic settings have been linked to the effects and toxicity of many agents used in clinical nephrology. However, these strategies, which analyze single genes or candidate pathways, cannot be considered ideal because the overall pharmacological effects of drugs typically are not dependent on monogenic traits. Therefore, to identify the multigenetic influence on drug response, researchers and clinicians from different fields of medicine and pharmacology have started to perform pharmacogenomic studies employing innovative whole-genome, high-throughput technologies. In nephrology, only few pharmacogenomics reports have been published to date, suggesting the need to enlarge the number of projects and increase the research budget for this important research field. In the future, we would expect that by applying the knowledge about an individual's inherited response to drugs, nephrologists will be able to prescribe medications based on each person's genetic makeup, to carefully monitor the efficacy and toxicity of a given drug, and to modify the dose and number of medications to obtain predefined clinical outcomes. (G Ital Nefrol 2010; 27: 353-66)

Conflict of interest: None

KEY WORDS:

Pharmacogenomics,
Pharmacogenetics,
Nephrology,
Genome,
Drugs,
Microarray

PAROLE CHIAVE:

Farmacogenomica,
Farmacogenetica,
Nefrologia,
Genoma,
Farmaci,
Microarray

✉ Indirizzo degli Autori:

Dr. Gianluigi Zaza
Unità di Nefrologia, Dialisi
e Trapianto
Dipartimento dell'Emergenza e dei
Trapianti di Organo (DETO)
Università degli Studi
Piazza Giulio Cesare 11
70124 Bari
e-mail: g.zaza@nephro.uniba.it

INTRODUZIONE

Negli ultimi 30 anni, sono stati introdotti nuovi agenti terapeutici per fronteggiare le più frequenti patologie renali (glomerulonefriti acute e croniche), per rallentare la progressione dell'insufficienza renale cronica (IRC) e per ridurre lo sviluppo di complicanze cliniche associate al trattamento sostitutivo (dialisi peritoneale ed emodialisi) e al trapianto renale (1, 2). Comunque,

il diffuso utilizzo di questi trattamenti è stato accompagnato da una serie di problematiche correlate alla terapia (iperdosaggio, dosaggio subterapeutico, reazioni avverse) con un notevole impatto clinico e un costo enorme per il Servizio Sanitario Nazionale. Infatti, i dati, estrapolati da report Nazionali e Internazionali, evidenziano che le reazioni avverse ai farmaci (ADRs) rappresentano importanti fattori associati alla mortalità ed alla richiesta di ospedalizzazione (3).

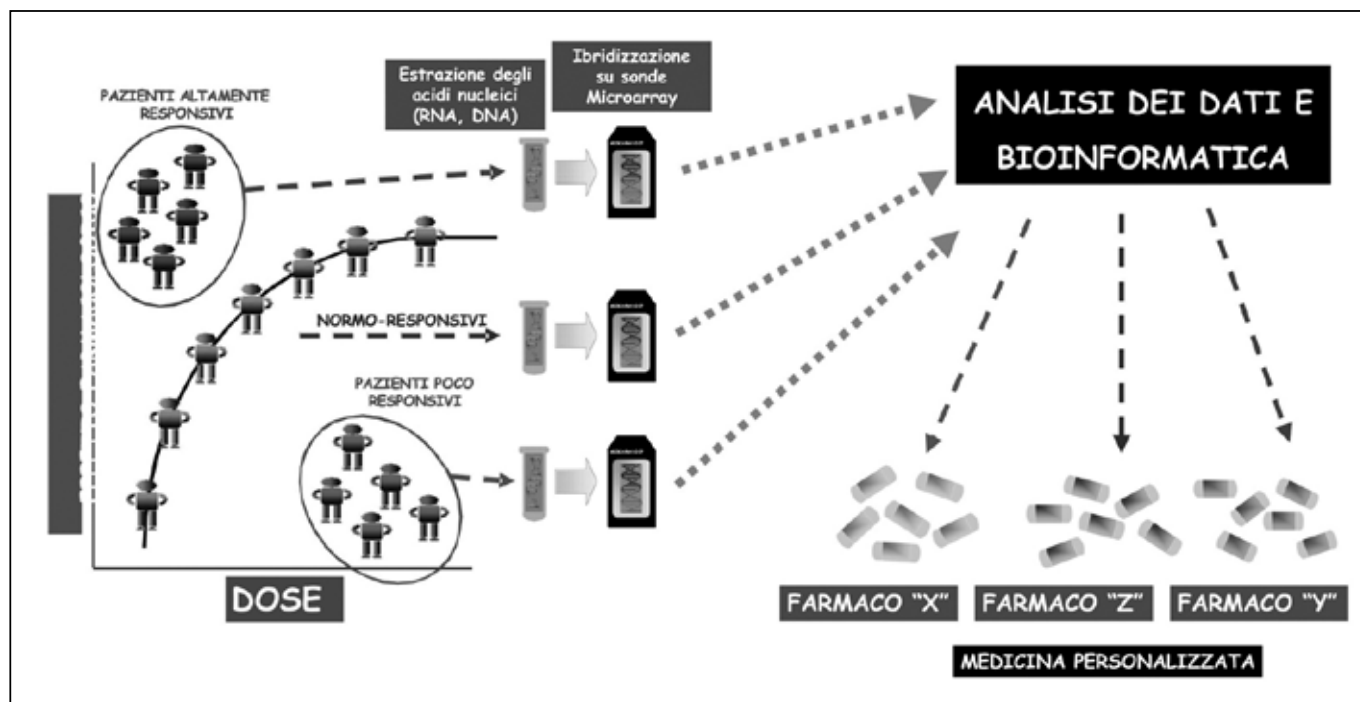


Fig. 1 - Metodologia per la personalizzazione del trattamento attraverso l'uso di informazioni genomiche. Questa rappresentazione schematica mostra i processi principali, dal prelievo di DNA e RNA all'analisi statistica, coinvolti nella scelta del migliore trattamento per differenti tipologie di pazienti (poco, normo o altamente responsivi).

Diversi studi suggeriscono che le recenti metodologie usate per adeguare i dosaggi farmacologici (monitoraggio terapeutico) risultano, soprattutto per farmaci a basso indice terapeutico (per esempio farmaci immunosoppressori), spesso inadeguate, non riproducibili, poco predittive dell'efficacia/tossicità dei farmaci utilizzati, indaginose e molto costose (4). A causa di questi limiti, ricercatori e clinici sono alla ricerca di nuovi strumenti per migliorare la specificità della terapia farmacologica e per predire eventi avversi prima della somministrazione di uno specifico farmaco.

Inoltre, è ben noto che, nonostante l'importanza dei fattori non genetici (età, sesso, indice di massa corporea) e ambientali (funzione epatica o renale, livelli ormonali e interazioni farmacocinetiche con altri agenti somministrati contemporaneamente), le differenze genetiche nel metabolismo farmacologico e nei bersagli terapeutici (recettori), hanno un ruolo predominante nella modulazione degli effetti farmacologici (5).

Nonostante la mole di dati presenti in letteratura che suggeriscono un forte legame tra sporadiche varianti genetiche ed un'anomala risposta ad uno specifico trattamento, manca a tutt'oggi un approccio sistematico in grado di definire il contributo dell'intero profilo genomico.

A tale scopo, possono essere largamente utilizzate le moderne tecnologie automatizzate che, grazie alle informazioni provenienti dal recente sequenziamento

del genoma umano, possono rappresentare un valido strumento per definire l'influenza genomica sui principali meccanismi farmacologici, per assistere i clinici nell'ottimizzare le strategie terapeutiche (Fig. 1) e per identificare bersagli farmacologici più selettivi e più appropriati.

FARMACOGENETICA: IL PRIMO PASSO VERSO LA MEDICINA PERSONALIZZATA

Cenni storici

Nel corso degli anni sono emerse chiare evidenze che dimostrano che una parte consistente della variabilità nella risposta farmacologica sia geneticamente determinata.

Kalow et al., circa 40 anni fa, descrivevano, per la prima volta, che soggetti omozigoti per un gene che codifica per una forma atipica dell'enzima butirrilcolinesterasi (pseudocolinesterasi) erano maggiormente predisposti a sviluppare un ritardo nel recupero dalla paralisi muscolare dopo somministrazione del bloccante neuromuscolare succinilcolina rispetto a soggetti normali. Nello stesso periodo fu, inoltre, osservato che varianti geniche potevano determinare sostanziali variazioni nel metabolismo di molti farmaci (isonazide, idralazina, procainamide) con conseguente differenza

della vita media e della concentrazione plasmatica degli stessi. Questi primi esempi di stretta associazione tra profilo genetico e risposta farmacologica hanno rappresentato i primordi della disciplina chiamata: "farmacogenetica" (5).

Tuttavia, solo dopo il clonaggio e la caratterizzazione dei geni umani polimorfici, che codificano per enzimi coinvolti nel metabolismo di molti agenti terapeutici, si sono comprese le basi molecolari responsabili della variabilità inter-individuale alla risposta farmacologica e della predisposizione allo sviluppo di eventi avversi o tossici.

Farmacogenetica applicata alla nefrologia clinica e alla medicina del trapianto

L'uso di nuovi farmaci (inibitori della calcineurina, inibitori di mTOR, corticosteroidi) ha portato ad un significativo miglioramento della sopravvivenza dei pazienti con diverse malattie renali e alla introduzione di schemi immunosoppressivi più efficaci per il trattamento a breve e lungo termine dei pazienti portatori di trapianto renale (2). Comunque, sebbene tali agenti farmacologici siano stati introdotti su vasta scala, non vi sono, ancora, parametri o strumenti efficaci per ottimizzare la loro somministrazione evitando l'insorgenza dei frequenti eventi avversi o complicanze cliniche. Infatti, è noto che la maneggevolezza di questi agenti è spesso limitata a causa del loro basso indice terapeutico, della loro elevata variabilità farmacocinetica e della scarsa correlazione tra concentrazione ematica ed effetti farmacodinamici (6, 7). Pertanto, appare necessario individuare tempestivamente marcatori in grado di fornirci una chiara indicazione su posologia e modalità di somministrazione, stimare la probabilità della comparsa di eventi avversi e indicare la tempistica di eventuali conversioni farmacologiche (introduzione di farmaci con potenzialità diverse e tossicità minore).

Azatioprina

Numerosi studi hanno riportato che diversi polimorfismi genetici influenzano il metabolismo dell'azatioprina (AZA), un antimetabolita ampiamente usato in nefrologia clinica (8-10). Questo farmaco è metabolizzato principalmente dall'enzima citosolico tiopurina S-metiltransferasi, codificato dal gene TPMT. Il locus TPMT è soggetto a diversi polimorfismi, per cui gli individui eterozigoti (6-11% dei Caucasic) hanno un'attività enzimatica intermedia e i mutanti omozigoti (0.2-0.6% dei Caucasic) hanno un'attività molto bassa del TPMT. Ad oggi sono state identificate 20 varianti alleliche (TPMT*2-*18) associate alla ridotta attività enzimatica rispetto all'allele *wild-type* TPMT*1. Più del 95% dell'at-

tività difettiva del TPMT è dovuta alla presenza degli alleli mutati TPMT*2 e TPMT*3. La compromessa o assente capacità di metabolizzare l'AZA porta, a causa di un aumento anormale dei livelli ematici, ad un più alto rischio di sviluppare una grave e potenzialmente mortale mielotossicità se non si effettua una riduzione del dosaggio o, in alcuni casi, una tempestiva sospensione del trattamento (11). D'altro canto, anche un'attività estremamente elevata dell'enzima TPMT potrebbe, in alcuni casi, causare una scarsa efficacia terapeutica dell'AZA dovuta al suo rapido catabolismo intracellulare. Infatti, Dervieux et al. (12), misurando l'attività dell'enzima TPMT nei globuli rossi di pazienti pediatrici portatori di trapianto renale, hanno dimostrato che soggetti con un'alta attività del TPMT presentavano una significativa riduzione dei livelli intracellulari dei metaboliti attivi del farmaco e di conseguenza erano maggiormente predisposti a sviluppare un quadro clinico di rigetto acuto.

Pertanto, potrebbe essere clinicamente utile genotipizzare per il locus TPMT tutti i pazienti prima della somministrazione dell'AZA in maniera da ottimizzarne la somministrazione e pianificare eventuali modifiche terapeutiche finalizzate alla minimizzazione degli effetti tossici.

Inibitori della Calcineurina (ICN)

Per quanto riguarda la ciclosporina (CsA) e il tacrolimus (TAC), farmaci ampiamente utilizzati per trattare malattie autoimmuni e come agenti primari nei principali schemi immunosoppressivi post-trapianto renale, l'impatto della variabilità genetica non è stato ancora completamente definito. Come mostra la Tabella I, è stato già dimostrato che l'espressione del gene MDR1 (*multidrug resistance 1*), codificante per una proteina con funzione di pompa che rimuove i farmaci lipofili, può influenzare significativamente la farmacocinetica e la farmacodinamica di entrambi i farmaci. In particolare, risulta ampiamente descritto che un polimorfismo a carico dell'esone 26 del gene MDR1, che determina la sostituzione C>T in posizione 3435, è associato ad alterazioni nella farmacocinetica di vari farmaci. Recenti studi hanno descritto che i portatori del genotipo omozigote per la citosina (CC) raggiungono concentrazioni plasmatiche di CsA significativamente maggiori rispetto agli omozigoti per timina (TT). Anche la farmacocinetica del TAC sembra essere influenzata dalle mutazioni che interessano il gene MDR1, ma per questo farmaco sembra avere maggiore rilevanza un polimorfismo in posizione 2677 dell'esone 21. Infatti, è stato dimostrato che soggetti portatori di tale mutazione presentano un rapporto concentrazione/dose più elevato rispetto ai soggetti esenti da mutazione (*wild-type*).

TABELLA I - RILEVANTI STUDI DI FARMACOGNETICA SUGLI INIBITORI DELLA CALCINEURINA (ICN)

FARMACO	GENE	VARIANTE	POPOLAZIONE	RISULTATI	BIBL.
CsA	CYP3A4, CYP3A5, MDR-1	CYP3A4*18B; CYP3A5*3; MDR1 (C1236T, G2677T/A, e C3435T)	103 pazienti portatori di TX renale	Pazienti con genotipo CYP3A4*1/*1 raggiungevano una concentrazione plasmatica più alta di CsA rispetto a quelli con genotipo CYP3A4*18B/*18B. I livelli basali normalizzati di CsA in soggetti con genotipo CYP3A5*3/*3 erano più alti rispetto ai wild-type. I livelli basali normalizzati di CsA erano più alti in pazienti con MDR-1 1236CC rispetto a quelli con 1236TT.	[13]
CsA	CYP3A4, MDR-1	CYP3A4-V e MDR-1 C3435T	124 pazienti portatori di TX renale	Le varianti alleliche CYP3A4-V e MDR-1 C3435T non influenzavano la concentrazione plasmatica e la dose richiesta di CsA.	[14]
CsA	CYP3A4, CYP3A5, MDR-1	CYP3A4*18A, CYP3A5*3 e MDR-1 C3435T	106 pazienti portatori di TX renale	I livelli basali di CsA erano più alti in pazienti portatori della variante allelica CYP3A5*3/*3 rispetto a quelli con CYP3A5*1/*3 e CYP3A5*1/*1. Pazienti omozigoti wild-type per MDR-1 C3435T raggiungevano livelli più bassi di CsA rispetto a quelli eterozigoti.	[15]
CsA	CYP3A5	CYP3A5*1	399 pazienti portatori di TX renale	La variante allelica CYP3A5*1 non influenzava il dosaggio e la concentrazione ematica di CsA.	[16]
CsA	MDR-1	MDR-1 (C3435T, G2677T)	69 pazienti portatori di TX renale	L'AUC della CsA era significativamente più alta in soggetti con genotipo (C/C) 3435 che in quelli con C/T e T/T misurata al 3 giorno post-trapianto. Le varianti MDR-1 G2677T non erano correlate significativamente con l'assorbimento della CsA.	[17]
CsA	MDR-1	MDR-1 (C3435T)	10 pazienti portatori di TX renale	La clearance orale della CsA era significativamente più alta in soggetti che presentavano almeno un allele MDR-1 3435T rispetto a quelli omozigoti wild-type.	[18]
TAC	CYP3A4, CYP3A5	CYP3A4*1B e CYP3A5*3	95 pazienti portatori di TX renale	I livelli di TAC normalizzati erano più alti nei pazienti portatori del genotipo CYP3A4*1/CYP3A5*3 rispetto a quelli con genotipo wild-type.	[19]
TAC	CYP3A4, CYP3A5, MDR-1	CYP3A4*1B, CYP3A5*3, MDR-1 (C1236T, G2677T/A, C3435CT)	832 pazienti portatori di TX renale	I pazienti omozigoti per l'aplotipo CYP3A4*1B, CYP3A5*3 raggiungevano più rapidamente le concentrazioni ematiche e più elevati livelli di TAC. L'aplotipo di MDR-1 non influenzava i parametri farmacocinetici.	[20]
TAC	CYP3A5	CYP3A5*3	136 pazienti portatori di TX renale	La dose giornaliera di TAC era più bassa nei pazienti con CYP3A5*3/*3 rispetto a quelli con genotipo CYP3A5*1/*1.	[21]
TAC	CYP3A5	CYP3A5*3	154 pazienti portatori di TX renale	Il rapporto tra dose e concentrazione basale di TAC era più bassa in pazienti con CYP3A5*3/*3 rispetto a quelli con genotipo CYP3A5*1/*3 e CYP3A5*1/*1.	[22]

segue

TABELLA I - segue

FARMACO	GENE	VARIANTE	POPOLAZIONE	RISULTATI	BIBL.
TAC	CYP3A5	CYP3A5*3	167 pazienti portatori di TX renale	I livelli basali di TAC normalizzati per la dose erano più alti nel gruppo dei pazienti con CYP3A5*3/*3 rispetto a quelli portatori dell'allele CYP3A5*1.	[23]
TAC	CYP3A5	CYP3A5*3	180 pazienti portatori di TX renale	I pazienti omozigoti per CYP3A5*3/*3 raggiungevano concentrazioni ematiche più alte di TAC rispetto a quelli portatori di almeno un allele CYP3A5*1.	[24]
TAC	CYP3A5	CYP3A5*3	73 pazienti portatori di TX renale	Non vi erano differenze nei livelli basali normalizzati per la dose di TAC tra individui con CYP3A5*1 rispetto a quelli con genotipo CYP3A5 *3/*3.	[25]
TAC	MDR-1	MDR-1 C3435T	66 pazienti portatori di TX renale	I pazienti con genotipo CC mostravano livelli più bassi di TAC per dose rispetto a quelli con genotipo CT/TT.	[26]
TAC	MDR-1	MDR-1 (C1236T, G2677T/A, C3435T)	206 pazienti portatori di TX renale	Livelli più bassi di TAC normalizzati per dose erano raggiunti in pazienti con genotipo MDR-1 2677-GG rispetto a quelli con 2677-TT, e in quelli con 3435-CC rispetto a 3435-TT. Vi era solo una piccola, ma statisticamente significativa, differenza nella dose richiesta di TAC tra gli aplotipi C-G-C e T-T-T.	[27]
TAC	MDR-1	MDR-1 (G2677T,A, T-129C, C1236T, C3435T)	81 pazienti portatori di TX renale	La media della dose di TAC richiesta per ottenere livelli target di concentrazione basale era significativamente più alta nei soggetti wild-type rispetto a quelli portatori di una o due alleli mutati per lo SNP G2677T,A. La dose richiesta di TAC non era significativamente differente per gli altri SNP.	[28]
TAC	CYP3A1	CYP3A1*3	178 pazienti portatori di TX renale	Pazienti con CYP3A1*1/*3 o *1/*1 avevano una concentrazione media più bassa di TAC, con un significativo ritardo nel raggiungimento dei livelli target di concentrazione.	[29]

TAC: Tacrolimus, CsA: Ciclosporina, TX: trapianto, BIBL: Voci bibliografiche.

In aggiunta, sono stati effettuati numerosi studi per valutare la relazione tra polimorfismi dei geni codificanti per la famiglia del citocromo P450 (CYP) e la risposta farmacologica dopo somministrazione degli ICN (Tab. I). In particolare, è stato riportato che pazienti portatori della variante allelica del gene CYP3A, CYP3A5*3, responsabile della totale mancanza di espressione dell'enzima, necessitano di dosaggi più bassi di ICN rispetto ai soggetti con genotipo *wild-type* (CYP3A5*1/*1) (13, 15, 19-24) per evitare gravi eventi avversi.

Acido micofenolico

Anche il metabolismo dell'acido micofenolico (MPA), un inibitore selettivo della sintesi *de novo* delle purine attraverso l'inibizione dell'enzima inosina monofosfato deidrogenasi (IMPDH), è influenzato da alcuni polimorfismi genetici (Tab. II). Gli enzimi uridina difosfato-glucuronosiltransferasi (UGTs) 1A8, 1A9 e 1A10 sono i principali responsabili della glucuronazione dell'MPA per formare il metabolita inattivo MPA-glucuronide (MPAG). UGT1A9 è l'enzima principale ed è espresso prevalentemente nel fegato, nei reni e, in misura minore, nel tratto gastrointestinale. UGT1A8 e 1A10 sono

TABELLA II - RILEVANTI STUDI DI FARMACOGENETICA SULL'ACIDO MICOFENOLICO (MPA)

FARMACO	GENE	VARIANTE	POPOLAZIONE	RISULTATI	BIBL.
MPA	IMPDH II	IMPDH II 3757T > C	101 pazienti portatori di TX renale	Il polimorfismo 3757T>C dell' IMPDH tipo II era associato con un incremento dell'attività di IMPDH in pazienti portatori di trapianto renale trattati con micofenolato mofetile (MMF).	[30]
MPA e TAC	UGT1A7, UGT1A9	UGT1A7*3, UGT1A9 I399C/C	80 pazienti portatori di TX renale	I polimorfismi di UGT1A7 e UGT1A9 I399 non contribuivano alle differenze inter-individuali nella farmacocinetica dell'MPA.	[31]
MPA	UGT1A8	UGT1A8-999C > T; 255A>G; UGT1A8-277G>A	74 pazienti portatori di TX renale	Erano più frequentemente osservati eventi avversi tra individui con la variante UGT1A8 codone 277A, l'aplotipo UGT1A8H5 (-999C/codone 55A/codone 277A), e il diplotipo UGT1A8H2/H5 (-999CC/codone 255AA/codone 277GA) dopo trattamento con MMF.	[32]
MPA e TAC	UGT1A9	UGT1A9-275T>A; UGT1A9-2152C>T	338 pazienti portatori di TX renale	Pazienti trattati con TAC con varianti UGT1A9 -275T>A e/o -2152C>T mostravano un livello di AUC(0-12) dell'MPA più bassi del 20%. Pazienti con UGT1A9*3 mostravano una AUC(0-12) dell'MPA più alta del 49% quando trattati con TAC.	[33]
MPA e TAC	UGT1A8, UGT2B7	UGT1A8*2, UG- T2B7*2	72 pazienti portatori di TX renale	Le varianti alleliche UGT1A8 e UGT2B7 non condizionavano le concentrazioni di MPA.	[34]
MPA	UGT1A9	UGT1A9-275T>A; UGT1A9-2152C>T	95 pazienti portatori di TX renale	Gli SNP T-275A e C-2152T del promotore del gene UGT1A9 erano associati con una esposizione significativamente più bassa di MPA nei pazienti portatori di trapianto renale trattati con 2 gr giornalieri di MMF. Gran parte di questo effetto era dovuto all'interruzione della re-circolazione enteroepatica dell'MPA.	[35]
MPA	UGT1A8, UGT1A9, ABCC2, UGT2B7	UGT1A8*3, UGT1A9- 118(dT)(9)/(10), UGT1A9 T-440C/C- 331T, UGT2B7 G211T, UGT2B7 C802T, ABCC2 C-24T, ABCC2 G1249A	46 pazienti portatori di TX renale	La re-circolazione enteroepatica dell'MPA era più elevata in pazienti portatori della variante allelica UGT1A9-118(dT)(10), e l'esposizione dell'acil-glucuronide (AcM-PAG) era più alto in pazienti con ABCC2 G1249A che in quelli portatori del genotipo wild-type. Gli altri SNPs genotipizzati non causavano variazioni significative dei parametri farmacocinetici dell'MPA e MPAG.	[36]
MPA e TAC	MRP2	MRP2-C-24T; MRP-C-3972T	95 pazienti portatori di TX renale	I polimorfismi MRP2 C-24T e C-3972T proteggevano i pazienti portatori di trapianto renale da una riduzione nell'esposizione di MPA associata con una moderata disfunzione epatica. Lo SNP MRP2 C-24T era associata con una più bassa clearance orale dell'MPA in condizione di steady-state	[37]

MPA: Acido micofenolico, TAC: Tacrolimus, TX: trapianto, BIBL: Voci bibliografiche

TABELLA III - RILEVANTI STUDI DI FARMACOGENETICA SULLA RAPAMICINA (RAPA)

FARMACO	GENE	VARIANTE	POPOLAZIONE	RISULTATI	BIBL.
RAPA	CYP3A5	CYP3A5*3	50 pazienti portatori di TX renale	Il rapporto tra concentrazione/dose di SRL nei pazienti portatori di genotipo CYP3A5 *3/*3 era significativamente più alto che in quelli con allele *1.	[42]
RAPA	CYP3A5	CYP3A5*3	47 pazienti portatori di TX renale	Pazienti con almeno 1 allele CYP3A5*1 avevano valori di AUC/dose, C(max)/dose, and C(0)/dose allo steady state significativamente più bassi rispetto a quelli con genotipo *3/*3. Pazienti con genotipo CYP3A5*1/*1 e *1/*3 richiedevano dosi giornaliere più alte di sirolimus per raggiungere la stessa concentrazione ematica rispetto a pazienti con genotipo *3/*3.	[43]
MPA e TAC	UGT1A9	UGT1A9-275T>A; UGT1A9-2152C>T	338 pazienti portatori di TX renale	Pazienti trattati con TAC con varianti UGT1A9 -275T>A e/o -2152C>T mostravano un livello di AUC(0-12) dell'MPA più bassi del 20%. Pazienti con UGT1A9*3 mostravano una AUC(0-12) dell'MPA più alta del 49% quando trattati con TAC.	[33]
RAPA	CYP3A5	CYP3A5*3	22 pazienti portatori di TX renale	Pazienti con genotipo CYP3A5*1/*1 e *1/*3 avevano una clearance orale più alta rispetto a quelli con genotipo CYP3A5*3.	[44]
RAPA	CYP3A4, CYP3A5, MDR-1	CYP3A4*1B, CYP3A5*3, MDR-1 (T-129C; C1236T; C3435T)	149 pazienti portatori di TX renale	Pazienti con alleli CYP3A4*1B o CYP3A5*1 richiedono livelli più alti di SRL per raggiungere adeguate concentrazioni ematiche basali. Nessuno degli SNP dell'MDR1 era associato con il rapporto concentrazione/dose di SRL.	[45]

RAPA: Rapamicina, TX: trapianto, BIBL: Voci bibliografiche

espressi lungo tutto il tratto gastrointestinale (38). Tali enzimi sono primariamente responsabili della conversione dell'MPA a 7-idrossi-glucuronide MPA (MPAG) attraverso un processo di fase II mediante glucuronidazione catalizzata dall'UGT. I metaboliti (MPAG), escreti nella bile, vanno in contro successivamente a deglucoronizzazione per mezzo dei batteri intestinali e riassorbiti come MPA nella circolazione sistemica, determinando un secondo picco ematico di concentrazione dalle 6 alle 12 ore dopo la somministrazione farmacologica. Pertanto variazioni dell'attività enzimatica dell'UGT possono essere responsabili della alterazione del processo farmacocinetico e determinare l'insorgenza di diversi effetti tossici (leucopenia, disturbi gastrointestinali) dopo assunzione di dosi *standard* del farmaco. Tali differenze possono essere, in larga parte, causate dalla presenza di SNPs nei geni che codificano per le diverse isoforme dell'enzima UGT determinando, come effetto, la completa o parziale perdita della loro attività di glucuronizzazione. A tal proposito, studi *in vitro* hanno dimostrato che due po-

limorfismi, entrambi nella regione del promotore del gene UGT1A9, (C-275T>A) e (C-2152C>T), sono associati ad una elevata espressione dell'enzima e ad una più alta velocità di glucuronazione (39), mentre il polimorfismo UGT1A9*3 (33M>T) ha come effetto una ridotta attività enzimatica e una più bassa velocità di glucuronazione dell'MPA rispetto al wild-type (40). Attraverso ricerche cliniche sugli effetti dei polimorfismi del gene UGT1A9 (-275T>A) e (-2152C>T) in soggetti con trapianto renale, è stato dimostrato che i portatori di uno o entrambi i polimorfismi avevano una minore area sotto la curva (AUC) dell'MPA e concentrazioni basali (pre-somministrazione) ridotte (33, 35). Sono stati identificati polimorfismi anche nel gene UGT1A8. È stato riportato che il polimorfismo UGT1A8*3 (277C>Y) è associato ad una riduzione di circa 30 volte nella formazione dell'MPAG. Questa riduzione è stata attribuita agli effetti della mutazione sull'affinità per il substrato e sulla velocità di formazione dell'MPAG (41). Inoltre Sombogaard et al. (30), hanno recentemente misurato, in uno studio prospet-

tico, la relazione tra l'attività dell'enzima IMPDH, la concentrazione plasmatica dell'MPA e la presenza di uno degli otto polimorfismi dell'isoforma II del gene che codifica per l'IMPDH in 101 soggetti portatori di trapianto renale trattati con micofenolato mofetile (MMF). Il 10% dei pazienti erano eterozigoti e il 2% omozigoti per la variante genica 3757T>C dell'IMPDH II. L'attività dell'IMPDH, misurata dopo 12 ore dalla somministrazione, era più alta del 49% nei pazienti con la variante 3757C. L'attività enzimatica dell'IMPDH misurata prima del trapianto non era significativamente differente tra i soggetti *wild-type* (3757TT) e quelli portatori della variante allelica.

Inibitori di Mammalian target of rapamycin (mTOR)

Recenti evidenze suggeriscono che il profilo genico individuale può influenzare la risposta farmacologica, in termini di sensibilità e di resistenza, al trattamento con gli inibitori selettivi di mTOR (Sirolimus e Everolimus) (Tab. III) (42-46). Questa nuova famiglia di molecole con estese proprietà chemioterapiche ed immunosoppressive è in grado, attraverso la formazione di complessi con una immunofillina intracellulare (FKBP) e il successivo legame con la chinasi mTOR, di regolare la traduzione di RNA messaggero (mRNA) che codifica per proteine regolatrici del ciclo cellulare. Di conseguenza, l'azione di tali farmaci si esplica attraverso l'arresto del ciclo cellulare in fase G1 (2). Studi recenti riportano che questi farmaci sono in parte metabolizzati dalla famiglia del CYP e trasportati dal sistema della glicoproteina-P codificata dal gene MDR-1. Pertanto, i ben noti polimorfismi presenti in molti geni appartenenti a queste estese famiglie potrebbero essere alla base della variabilità farmacocinetica e farmacodinamica degli inibitori di mTOR. Le Meur et al. (43) e Anglicheau et al. (45), hanno dimostrato che pazienti che esprimono una o entrambe le varianti alleliche CYP3A5*3 richiedono una dose più bassa di questi farmaci rispetto ai pazienti *wild-type* (CYP3A5*1/*1) per raggiungere livelli basali adeguati. Pertanto, nonostante la mancanza di dati clinici solidi, possiamo supporre che vi sia una similitudine farmacogenetica tra gli inibitori della calcineurina e quelli di mTOR.

Glucocorticoidi

Anche l'efficacia/tossicità dei glucocorticoidi, potenti antiinfiammatori ampiamente utilizzati in nefrologia, è potenzialmente regolata da fattori genetici (2, 47). Recentemente, Miura et al. (48), hanno riportato che la variabilità nella concentrazione plasmatica di prednisolone, misurata in pazienti portatori di trapianto renale, è condizionata dal livello di

espressione del *nuclear receptor subfamily 1, group I, member 2* (NR1I2, A7635G). I pazienti portatori dell'allele NR1I2 7635G possiedono una più elevata attività metabolica intestinale per il prednisolone con una conseguente minore concentrazione plasmatica massimale. Pertanto, sebbene allo stato attuale vi siano solo sporadici cenni relativi alla farmacogenomica dei glucocorticoidi in ambiente nefrologico, questo campo di indagine presenta potenzialità di indubbio interesse.

Antagonisti del sistema renina-angiotensina-aldosterone

Negli ultimi vent'anni, attraverso una politica di sorveglianza clinica e con l'introduzione di trattamenti terapeutici più efficaci, sono stati raggiunti apprezzabili risultati nella sfida verso il rallentamento della progressione dell'IRC. In particolare, è ormai riconosciuto che il blocco del sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS), mediante gli inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE-I) e gli antagonisti del recettore dell'Angiotensina II (ARB), è uno dei fattori maggiormente responsabili del miglioramento dell'outcome di questa estesa popolazione (49). Nonostante l'uso di questi farmaci sia generalmente sicuro e non associato alla comparsa di gravi eventi avversi, la loro efficacia è molto variabile e poco prevedibile. Numerosi studi hanno valutato il contributo genetico a tale variabilità e la corrispondenza tra genotipo/fenotipo dell'ACE, l'enzima chiave del sistema RAAS. L'ACE catalizza la conversione dell'angiotensina I in angiotensina II e l'inattivazione del peptide vasodilatatore bradichinina. La concentrazione dell'enzima ACE a livello plasmatico e cellulare è regolato dal livello di espressione del corrispondente gene ACE. A livello dell'introne 16 di questo gene è presente un polimorfismo del tipo Inserzione/Delezione (I/D). Tale polimorfismo è dovuto alla presenza (allele I - Inserzione) o assenza (allele D - Delezione) di una sequenza ripetuta Alu di 287 bp, e può produrre tre differenti genotipi: I/I (Inserzione in omozigosi); I/D (eterozigosi per Inserzione/Delezione) e D/D (Delezione in omozigosi). Molti studi, valutando la corrispondenza genotipo/fenotipo, hanno proposto l'utilizzo degli stessi come strumenti utili nella diagnosi di una serie di patologie, come indicatori di prognosi e come marcatori in grado di predire efficacia/tossicità di molti farmaci (per esempio ACE-I e ARB). Inoltre, l'aplotipo D/D è stato associato alla comparsa di gravi complicanze cardio-vascolari in soggetti con IRC e ad un più alto rischio di insorgenza di nefropatia diabetica e progressione rapida verso l'uremia terminale in pazienti con diabete di tipo I e II (50). Tuttavia, le conclusioni di questi studi sono apparse inconsistenti e inficcate

dal basso potere statistico. Inoltre, osservazioni più recenti hanno suggerito che il genotipo DD sia associato ad una più bassa richiesta di eritropoietina in pazienti in dialisi peritoneale continua ambulatoriale. Quindi, considerando che il polimorfismo ACE I/D può essere uno strumento affidabile ed economicamente vantaggioso per identificare i pazienti con IRC a rischio di complicanze cliniche, sembra indiscutibile la necessità di ideare ulteriori progetti di ricerca per meglio definire il ruolo dei suddetti polimorfismi e disegnare studi che possano coinvolgere una estesa popolazione di pazienti affetti da nefropatie progressive.

FARMACOGENOMICA: UNA NUOVA STRATEGIA PER STUDIARE L'INFLUENZA POLIGENICA SUGLI EFFETTI E LA TOSSICITÀ DEI FARMACI

Sebbene gli approcci farmacogenetici, analizzando singoli geni o vie metaboliche isolate, abbiano raggiunto notevoli successi nell'identificare varianti genetiche associate a specifici fenotipi farmacologici (metabolismo, meccanismi di azione, sviluppo di eventi avversi), essi non rappresentano il "golden standard". Infatti, è noto che gli effetti farmacologici sono multi-fattoriali e non dipendono generalmente da tratti monogenici (5). Pertanto, piuttosto che cercare un "effetto drammatico" prodotto da un singolo gene, sarebbe più realistico considerare il ruolo combinato di più geni, ognuno con un effetto modesto, che insieme siano responsabili dell'efficacia o della tossicità di uno o più farmaci. Negli studi clinici, però, è spesso difficile chiarire il ruolo di ogni singolo gene nel contesto di un effetto poligenico, specialmente quando il destino metabolico e i meccanismi d'azione di un farmaco sono poco definiti. Il completamento del Progetto Genoma Umano (51, 52) e lo sviluppo di tecnologie di analisi ad ampio raggio (*massive parallel gene analysis*, il sequenziamento del DNA, la sintesi e la genotipizzazione di SNPs) hanno fornito potenti strumenti per valutare l'influenza multi-genetica su una specifica terapia farmacologica. Attualmente sono disponibili diverse tecnologie e i ricercatori possono scegliere la piattaforma più appropriata per i loro progetti. Tra queste, i *microarray* o matrici ad alta densità (chiamata anche genome chip o bio-chip) rappresentano la tecnologia più utilizzata. Un *microarray* misura il livello di espressione di un gene determinando la quantità di RNA messaggero (mRNA) presente. Ad oggi, esistono due tecnologie per la produzione dei *microarray*: la prima denominata a spotting e la seconda detta *in situ*. Gli *spotted array* permettono di valutare contemporaneamente l'espressione genica di due diversi

campioni cellulari. Su un supporto rigido (vetrino), in posizioni ben precise, sono posizionate molecole di DNA (cDNA) dette sonde o "probe" in grado di identificare una serie di geni. Tali chip sono disponibili in commercio e possono essere rappresentativi dell'intero genoma, e possono essere rappresentativi di un intero genoma, e possono essere specifici per una determinata via metabolica (es. apoptosi, trasduzione del segnale, ecc.) oppure realizzati a richiesta sia per scopo di ricerca che diagnostico (*custom chip*). Lo mRNA totale, estratto da cellule o da tessuti, è retrotrascritto in DNA complementare (cDNA). In questa reazione si realizza una marcatura fluorescente, solitamente si usano dei marcatori: verde (cianina Cy3) e rosso (cianina Cy5) (campione di riferimento e campione in analisi). In seguito si applicano i cDNA marcati al chip. Dopo la lettura del chip in uno scanner, un *software* elabora il risultato che viene visualizzato (oltre che numericamente) mediante una mappa a codice di colore che indica attraverso la fluorescenza (strettamente legata al livello di ibridazione), l'espressione di ciascun gene. Un'altra piattaforma si basa sulla tecnica di sintesi in situ delle sonde per la fabbricazione dei *microarray*. La produzione dei chip passa attraverso un processo automatizzato che combina tecniche fotolitografiche e di chimica combinatoriale. La superficie solida (generalmente in wafer di quarzo), reagendo con il silano forma matrici di molecole terminanti con gruppi di protezione fotosensibili. Il processo successivo è chiamato "*Light-Directed Spatially Addressable Chemical Synthesis*", ovvero sintesi chimica fotopilotata di oligonucleotidi *in situ*. A partire dall'RNA si ricava, tramite trascrittasi inversa, il cDNA a filamento singolo; da questo si produce cDNA a doppia elica da cui, per trascrizione in vitro, viene sintetizzato il cRNA *target* biotinilato. Il cRNA biotinilato, frammentato, è unito ad una miscela di ibridazione opportunamente preparata e incubato sul relativo *probe array* per circa 16 ore. Trascorso questo periodo di tempo si procede all'applicazione dei protocolli di lavaggio e colorazione con ficoeritrina e streptavidina. La scansione fornirà un'immagine dalla quale sarà possibile ricavare le informazioni in termini quantitativi. L'ibridazione stringente usata per lo studio dell'espressione genica può essere usata anche per l'identificazione di polimorfismi a singoli nucleotidi, mutazioni puntiformi, inserzioni o delezioni in campioni di DNA genomico (5).

La tecnologia *microarray* ha delle limitazioni, la più importante delle quali è sicuramente il costo: attualmente i *microarray* commerciali costano diverse centinaia di euro e non possono essere riusati. Inoltre, il bisogno di produrre dati statisticamente significativi implica la necessità di realizzare dei replicati. La seconda limitazione della tecnologia è rappresentata dal campione che deve essere analizzato; non tutti

i tessuti sono facilmente reperibili o richiedono procedure invasive per ottenerli. Per l'analisi genomica (identificazione di mutazioni somatiche o polimorfismi) può essere usato semplicemente un campione di sangue periferico. In altri casi, si deve tenere conto della difficoltà di estrarre materiale nucleico dai tessuti di interesse (per esempio cellule del sistema nervoso centrale) o della possibile contaminazione tessutale da parte di cellule neoplastiche o infiammatorie (leucociti periferici). Inoltre la mancanza di una stretta relazione tra mRNA e livelli di proteine implica la necessità di tenere conto della stabilità dei messaggeri o delle modificazioni post-traduzionali (fosforilazione e ubiquitinazione) che regolano la funzione delle proteine. Infine è necessaria la validazione dei risultati mediante approcci alternativi.

Pertanto, in futuro, potrebbe essere auspicabile che tali metodologie, associate con nuove tecnologie di "deep sequencing", proteomica e metabolomica, potrebbero essere facilmente fruibili da ricercatori e clinici impegnati in progetti nel campo nefrologico contribuendo alla migliore definizione dei meccanismi alla base della risposta individuale ai diversi trattamenti farmacologici.

Farmacogenomica e terapie immunosoppressive usate in nefrologia clinica e nel trapianto renale

Ricercatori in ambito nefrologico hanno iniziato ad applicare queste procedure innovative ad ampio raggio per individuare il profilo di espressione di elementi cellulari appartenenti a preparati istologici di reni umani, di soggetti normali o con patologie renali, per selezionare specifici marcatori in grado di predire le complicanze acute e croniche post-trapianto e per approfondire lo studio dei complicati meccanismi molecolari coinvolti nella patogenesi di numerose patologie renali su base immunologica (53, 54). Tuttavia, ad oggi, a differenze di altre discipline mediche, la farmacogenomica è apparsa poco utilizzata in ambito nefrologico.

Recentemente, il nostro gruppo di ricerca, applicando un approccio farmacogenomico, ha identificato un nuovo potenziale target terapeutico responsabile degli effetti anti-fibrotici e anti-proteinurici dell'MPA. L'analisi *microarray*, effettuata su una *coorte* di pazienti con trapianto renale stabile tre mesi dopo la sostituzione dell'AZA con l'MPA nello schema terapeutico immunosoppressivo di mantenimento, ha rivelato che il gene Endopeptidasi Neutra (NEP), che codifica per un enzima coinvolto nella degradazione dell'angiotensina-II, era quello maggiormente espresso dopo sostituzione della AZA con MPA. Inoltre, i livelli proteici glomerulari e tubulari di NEP, misurati

su biopsie di rene trapiantato in un gruppo indipendente, erano significativamente più alti nei pazienti in trattamento con CsA+MPA rispetto a quelli in trattamento con CsA+AZA o solo CsA. I livelli glomerulari di NEP risultavano inversamente correlati alla glomerulosclerosi e alla entità di proteinuria misurate al momento della biopsia. I livelli tubulari di NEP erano inversamente associati alla fibrosi interstiziale. Cellule tubulari prossimali incubate con MPA erano soggette ad un aumento dell'espressione genica di NEP dose e tempo-dipendente. Questi dati suggerivano, per la prima volta, che il trattamento con MPA è in grado di modulare direttamente questo enzima contribuendo al rallentamento della progressione del danno cronico glomerulare e di quello tubulointerstiziale (55).

In altri studi, usando modelli *in vitro* o animali e applicando piattaforme *microarray* predefinite, sono stati identificati alcuni geni con una presunta rilevanza nell'efficacia/tossicità dei farmaci immunosoppressivi usati in ambito nefrologico, ma nessuno dei risultati ottenuti in questi studi è stato confermato in ambito clinico.

Farmacogenomica e tolleranza immunologica

Per identificare potenziali marcatori associati alla tolleranza immunologica nei pazienti con trapianto renale sono state usate tecnologie di analisi genomica ad ampio raggio. È ben noto che la sopravvivenza a lungo termine dell'organo trapiantato richiede una terapia immunosoppressiva che duri per tutta la vita ma, seppur raramente, è stato riscontrato che alcuni riceventi mostrano una spontanea "operational tolerance" con funzione stabile del trapianto in assenza di terapia immunosoppressiva. La mancanza di marcatori biologici di questo fenomeno preclude l'identificazione di quei pazienti potenzialmente tolleranti in cui l'immunosoppressione potrebbe essere ridotta o addirittura interrotta. Pertanto l'obiettivo di tutti questi studi è stato quello di identificare i *marker* in grado di identificare la popolazione tollerante. Fin ad oggi molti geni sono stati proposti come potenziali predittori di tolleranza, tra cui i geni coinvolti nella quiescenza immunitaria, apoptosi, risposta delle cellule T della memoria (56). Ma è implicita la necessità di intraprendere ulteriori valutazioni per chiarire gli elementi chiave di questo importante aspetto biologico/funzionale.

Farmacogenomica e insufficienza renale cronica

La tecnologia *microarray* è stata utilizzata per identificare specifici profili genomici modulati durante il trattamento dialitico sia acuto sia cronico (57, 58). Da questi studi è emerso che diversi geni risultano dere-

golati nei pazienti con IRC sottoposti a trattamento sostitutivo. Tra questi vi sono geni che codificano per diverse molecole con attività proinfiammatoria e chemotattica (IL8, CCR7, TNFalfa, CXCR4), geni regolatori dello stress ossidativo (RELA e GSS) e geni implicati nel sistema della fosforilazione ossidativa mitocondriale (ATP5O, COX6C, COX7C, NDUFS5, NDUFA6, UQCRH, NDUFA1, ATP5J, UQCRB, NDUFB1 e ATP5I). Questi risultati sono importanti sia per aggiungere importanti tasselli al complicato mosaico dei meccanismi biologici/biochimici responsabili delle alterazioni cellulari indotte da questi trattamenti, sia per individuare nuovi bersagli per futuri interventi terapeutici mirati alla riduzione dell'insorgenza di complicanze cliniche (aterosclerosi, patologie cardiovascolari, malnutrizione) frequentemente presenti in questa vasta popolazione di pazienti.

FARMACOGENOMICA E PROSPETTIVE FUTURE

È ormai riconosciuto che in un prossimo futuro, i nefrologi, applicando le conoscenze sulla risposta

ereditaria ai farmaci, saranno in grado di prescrivere trattamenti farmacologici sulla base del profilo genetico di ogni singolo paziente (59). Questa condizione ottimizzerà l'efficacia degli agenti terapeutici e ne ridurrà gli effetti tossici e permetterà di programmare cambiamenti dello stile di vita e abitudini comportamentali finalizzate ad una riduzione significativa delle comorbidità e delle condizioni potenzialmente responsabili di una scarsa efficacia ad uno specifico regime terapeutico. Allo stesso modo sarà possibile introdurre un farmaco nel momento più appropriato massimizzandone gli effetti terapeutici.

In aggiunta, si faciliterà il lavoro delle industrie farmaceutiche nella fase di scoperta e di produzione di nuove terapie sempre più selettive (Fig. 2). Inoltre, molti farmaci, precedentemente poco utilizzati nella pratica clinica, potrebbero essere rivalutati e utilizzati in specifici gruppi di pazienti adeguatamente selezionati. Personalizzare i trattamenti ridurrà i costi e i rischi dei trial clinici ed eviterà costi che potrebbero essere investiti nella fase di ricerca e sviluppo. A tal proposito, recentemente, la Food and Drug Administration (FDA) ha emesso le prime Linee Guida per la

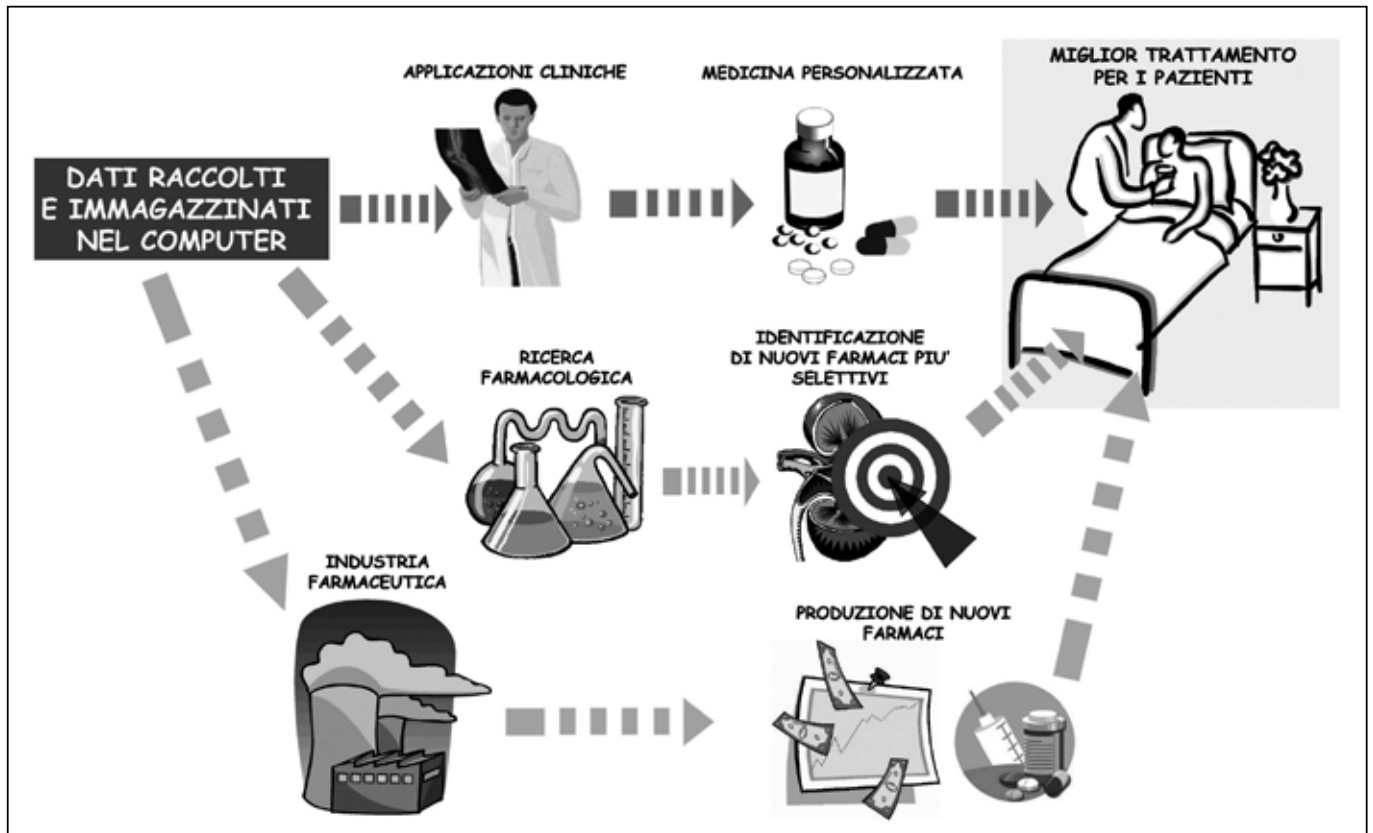


Fig. 2 - Utilizzo futuro della farmacogenomica. Questa immagine descrive le potenziali applicazioni pratiche dei risultati ottenuti dagli studi di farmacogenomica. I dati ottenuti possono essere facilmente utilizzati da medici per la selezione accurata del trattamento sulla base dello specifico profilo genetico di ogni singolo paziente, per aiutare i ricercatori nella scelta di bersagli più appropriati per la ricerca di nuovi composti chimici e agenti terapeutici, e per facilitare la scoperta e la produzione industriale di nuovi farmaci.

sottomissione di dati provenienti da studi di farmacogenomica (60) utilizzabili dall'industria farmaceutica in ogni fase dello sviluppo e della produzione di un determinato agente terapeutico.

Pertanto, è evidente che lo sviluppo di una rete di cooperazione tra ricercatori, clinici, industrie ed esperti in vari campi della ricerca/sviluppo biotecnologico è essenziale per realizzare la promessa rivoluzionaria della introduzione nella pratica clinica e nelle fasi dello sviluppo farmacologico delle informazioni ottenute da studi e approcci farmacogenomici (Fig. 2).

RIASSUNTO

Numerosi studi hanno suggerito che lo sviluppo di reazioni avverse ai farmaci è frequentemente associato ad un significativo incremento del tasso di mortalità e di ospedalizzazione. Alla base di tali eventi si riconoscono una serie di elementi ambientali e genetici responsabili della variabilità inter-paziente nel metabolismo farmacologico e nelle interazioni molecolari tra farmaci ed i rispettivi bersagli terapeutici. Molti dei fattori genetici coinvolti in questi processi sono stati oggetto di studio in progetti di farmacogenetica finalizzati all'individuazione delle basi genetiche che sottendono gli effetti terapeutici e/o avversi di molti agenti utilizzati routinariamente

nella pratica clinica nefrologica. Tuttavia le strategie utilizzate in questi studi, analizzando i geni singolarmente o valutando singole vie metaboliche, non rappresentano l'approccio ideale al problema. Infatti, è noto che gli effetti farmacologici sono multi-fattoriali e non dipendono generalmente da tratti monogenici. Pertanto, al fine di studiare l'influenza multi-genica sulla risposta farmacologica, ricercatori e clinici hanno iniziato ad applicare tecnologie innovative in grado di analizzare simultaneamente migliaia di trascritti genici. In tale contesto, la farmacogenomica, studiando il rapporto tra espressione dell'intero assetto genomico ed effetti farmacologici, è un settore che presenta notevoli possibilità di sviluppo in ambito nefrologico. Comunque, fino ad oggi, l'interesse verso tale disciplina è stato modesto, sottolineando la necessità di potenziare significativamente il numero dei progetti di ricerca e di indirizzare finanziamenti "ad hoc" verso questo campo di indagine innovativo. In futuro è auspicabile che, applicando le conoscenze ottenute da questi studi, i nefrologi saranno in grado di prescrivere farmaci sulla base del profilo genomico di ogni singolo paziente, di monitorare in tempo reale l'efficacia o la tossicità di un farmaco, e di ottimizzare la dose e la frequenza di somministrazioni farmacologiche.

DICHIARAZIONE DI CONFLITTO DI INTERESSI

Gli Autori dichiarano di non avere conflitto di interessi.

BIBLIOGRAFIA

- Coppo R, Amore A. New perspectives in treatment of glomerulonephritis. *Pediatr Nephrol* 2004; 19: 256-65.
- Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* 2004; 351: 2715-29.
- Ernst FR, Grizzle AJ. Drug-related morbidity and mortality: updating the cost-of-illness model. *J Am Pharm Assoc (Wash)* 2001; 41: 192-9.
- Lindholm A, Säwe J. Pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring of immunosuppressants. *Ther Drug Monit* 1995; 17: 570-3.
- Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 1999; 286: 487-91.
- Plosker GL, Foster RH. Tacrolimus: a further update of its pharmacology and therapeutic use in the management of organ transplantation. *Drugs* 2000; 59: 323-89.
- Fulton B, Markham A. Mycophenolate mofetil. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and clinical efficacy in renal transplantation. *Drugs* 1996; 51: 278-98.
- Kurawski M, Dziewanowski K, Lener A, Drozdziak M. TPMT but not ITPA gene polymorphism influences the risk of azathioprine intolerance in renal transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol* 2009; 65: 533-40.
- Kurawski M, Dziewanowski K, Gawrońska-Szklarz B, Donarski L, Drozdziak M. The impact of thiopurine s-methyltransferase polymorphism on azathioprine-induced myelotoxicity in renal transplant recipients. *Ther Drug Monit* 2005; 27: 435-41.
- Song DK, Zhao J, Zhang LR. TPMT genotype and its clinical implication in renal transplant recipients with azathioprine treatment. *J Clin Pharm Ther* 2006; 31: 627-35.
- Evans WE. Thiopurine S-methyltransferase: a genetic polymorphism that affects a small number of drugs in a big way. *Pharmacogenetics* 2002; 12: 421-3.
- Dervieux T, Médard Y, Baudouin V, et al. Thiopurine methyltransferase activity and its relationship to the occurrence of rejection episodes in paediatric renal transplant recipients treated with azathioprine. *Br J Clin Pharmacol* 1999; 48: 793-800.
- Qiu XY, Jiao Z, Zhang M, et al. Association of MDR1, CYP3A4*18B, and CYP3A5*3 polymorphisms with cyclosporine pharmacokinetics in Chinese renal transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol* 2008; 64: 1069-84.
- von Ahsen N, Richter M, Grupp C, Ringe B, Oellerich M, Armstrong W. No influence of the MDR-1 C3435T polymor-

- phism or a CYP3A4 promoter polymorphism (CYP3A4-V allele) on dose-adjusted cyclosporin A trough concentrations or rejection incidence in stable renal transplant recipients. *Clin Chem* 2001; 47: 1048-52.
15. Hu YF, Qiu W, Liu ZQ, et al. Effects of genetic polymorphisms of CYP3A4, CYP3A5 and MDR1 on cyclosporine pharmacokinetics after renal transplantation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006; 33: 1093-8.
 16. Kreutz R, Zürcher H, Kain S, Martus P, Offermanns G, Beige J. The effect of variable CYP3A5 expression on cyclosporine dosing, blood pressure and long-term graft survival in renal transplant patients. *Pharmacogenetics* 2004; 14: 665-71.
 17. Foote CJ, Greer W, Kiberd B, et al. Polymorphisms of multidrug resistance gene (MDR1) and cyclosporine absorption in de novo renal transplant patients. *Transplantation* 2007; 83: 1380-4.
 18. Yates CR, Zhang W, Song P, et al. The effect of CYP3A5 and MDR1 polymorphic expression on cyclosporine oral disposition in renal transplant patients. *J Clin Pharmacol* 2003; 43: 555-64.
 19. Kuypers DR, de Jonge H, Naesens M, Lerut E, Verbeke K, Vanrenterghem Y. CYP3A5 and CYP3A4 but not MDR1 single-nucleotide polymorphisms determine long-term tacrolimus disposition and drug-related nephrotoxicity in renal recipients. *Clin Pharmacol Ther* 2007; 82: 711-25.
 20. Bandur S, Petrasek J, Hribova P, Novotna E, Brabcova I, Viklicky O. Haplotypic structure of ABCB1/MDR1 gene modifies the risk of the acute allograft rejection in renal transplant recipients. *Transplantation* 2008; 86: 1206-13.
 21. Quteineh L, Verstuyft C, Furlan V, et al. Influence of CYP3A5 genetic polymorphism on tacrolimus daily dose requirements and acute rejection in renal graft recipients. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008; 103: 546-52.
 22. Renders L, Frisman M, Ufer M, et al. CYP3A5 genotype markedly influences the pharmacokinetics of tacrolimus and sirolimus in kidney transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther* 2007; 81: 228-34.
 23. Zhao Y, Song M, Guan D, et al. Genetic polymorphisms of CYP3A5 genes and concentration of the cyclosporine and tacrolimus. *Transplant Proc* 2005; 37: 178-81.
 24. Macphee IA, Fredericks S, Mohamed M, et al. Tacrolimus pharmacogenetics: the CYP3A5*1 allele predicts low dose-normalized tacrolimus blood concentrations in whites and South Asians. *Transplantation* 2005; 79: 499-502.
 25. Mai I, Perloff ES, Bauer S, et al. MDR1 haplotypes derived from exons 21 and 26 do not affect the steady-state pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant patients. *Br J Clin Pharmacol* 2004; 58: 548-53.
 26. Li D, Gui R, Li J, Huang Z, Nie X. Tacrolimus dosing in Chinese renal transplant patients is related to MDR1 gene C3435T polymorphisms. *Transplant Proc* 2006; 38: 2850-2.
 27. Fredericks S, Moreton M, Reboux S, et al. Multidrug resistance gene-1 (MDR-1) haplotypes have a minor influence on tacrolimus dose requirements. *Transplantation* 2006; 82: 705-8.
 28. Anglicheau D, Verstuyft C, Laurent-Puig P, et al. Association of the multidrug resistance-1 gene single-nucleotide polymorphisms with the tacrolimus dose requirements in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 1889-96.
 29. MacPhee IA, Fredericks S, Tai T, et al. The influence of pharmacogenetics on the time to achieve target tacrolimus concentrations after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2004; 4: 914-9.
 30. Sombogaard F, van Schaik RH, Mathot RA, et al. Interpatient variability in IMPDH activity in MMF-treated renal transplant patients is correlated with IMPDH type II 3757T > C polymorphism. *Pharmacogenet Genomics* 2009; 19: 626-34.
 31. Inoue K, Miura M, Satoh S, et al. Influence of UGT1A7 and UGT1A9 intronic I399 genetic polymorphisms on mycophenolic acid pharmacokinetics in Japanese renal transplant recipients. *Ther Drug Monit* 2007; 29: 299-304.
 32. Betônico GN, Abbud-Filho M, Goloni-Bertollo EM, et al. Influence of UDP-glucuronosyltransferase polymorphisms on mycophenolate mofetil-induced side effects in kidney transplant patients. *Transplant Proc* 2008; 40 (3): 708-10.
 33. van Schaik R, van Agteren M, de Fijter JW, et al. UGT1A9 -275T>A/-2152C>T polymorphisms correlate with low MPA exposure and acute rejection in MMF/tacrolimus-treated kidney transplant patients. *Clin Pharmacol Ther* 2009; 86: 319-27.
 34. Kagaya H, Inoue K, Miura M, et al. Influence of UGT1A8 and UGT2B7 genetic polymorphisms on mycophenolic acid pharmacokinetics in Japanese renal transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol* 2007; 63: 279-88.
 35. Kuypers DR, Naesens M, Vermeire S, Vanrenterghem Y. The impact of uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A9 (UGT1A9) gene promoter region single-nucleotide polymorphisms T-275A and C-2152T on early mycophenolic acid dose-interval exposure in de novo renal allograft recipients. *Clin Pharmacol Ther* 2005; 78: 351-61.
 36. Zhang WX, Chen B, Jin Z, et al. Influence of uridine diphosphate (UDP)-glucuronosyltransferases and ABCC2 genetic polymorphisms on the pharmacokinetics of mycophenolic acid and its metabolites in Chinese renal transplant recipients. *Xenobiotica* 2008; 38: 1422-36.
 37. Naesens M, Kuypers DR, Verbeke K, Vanrenterghem Y. Multidrug resistance protein 2 genetic polymorphisms influence mycophenolic acid exposure in renal allograft recipients. *Transplantation* 2006; 82: 1074-84.
 38. Johnson LA, Oetting WS, Basu S, Prausa S, Matas A, Jacobson PA. Pharmacogenetic effect of the UGT polymorphisms on mycophenolate is modified by calcineurin inhibitors. *Eur J Clin Pharmacol* 2008; 64: 1047-56.
 39. Girard H, Court MH, Bernard O, et al. Identification of common polymorphisms in the promoter of the UGT1A9 gene: evidence that UGT1A9 protein and activity levels are strongly genetically controlled in the liver. *Pharmacogenetics* 2004; 14: 501-15.
 40. Bernard O, Guillemette C. The main role of UGT1A9 in the hepatic metabolism of mycophenolic acid and the effects of naturally occurring variants. *Drug Metab Dispos* 2004; 32: 775-8.
 41. Bernard O, Tojic J, Journault K, Perusse L, Guillemette C. Influence of nonsynonymous polymorphisms of UGT1A8 and UGT2B7 metabolizing enzymes on the formation of phenolic and acyl glucuronides of mycophenolic acid. *Drug Metab Dispos* 2006; 34: 1539-45.
 42. Miao LY, Huang CR, Hou JQ, Qian MY. Association study of ABCB1 and CYP3A5 gene polymorphisms with sirolimus trough concentration and dose requirements in Chinese renal transplant recipients. *Biopharm Drug Dispos* 2008; 29: 1-5.
 43. Le Meur Y, Djebli N, Szelag JC, et al. CYP3A5*3 influences sirolimus oral clearance in de novo and stable renal transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther* 2006; 80: 51-60.
 44. Djebli N, Rousseau A, Hoizey G, et al. Sirolimus population pharmacokinetic/pharmacogenetic analysis and bayesian modelling in kidney transplant recipients. *Clin Pharmacokinet* 2006; 45: 1135-48.
 45. Anglicheau D, Le Corre D, Lechaton S, et al. Consequences of genetic polymorphisms for sirolimus requirements after renal transplant in patients on primary sirolimus therapy. *Am J Transplant* 2005; 5: 595-603.
 46. Huang S, Houghton PJ. Mechanisms of resistance to rapamycins. *Drug Resist Updat* 2001; 4: 378-91.
 47. Fenech A, Hall IP. Pharmacogenetics of asthma. *Br J Clin Pharmacol* 2002; 53: 3-15.
 48. Miura M, Satoh S, Inoue K, et al. Influence of CYP3A5, ABCB1 and NR1I2 polymorphisms on prednisolone pharmacokinetics in renal transplant recipients. *Steroids* 2008; 73: 1052-9.

49. Brenner BM. Retarding the progression of renal disease. *Kidney Int* 2003; 64: 370-8.
50. Danser AH, Schalekamp MA, Bax WA, et al. Angiotensin-converting enzyme in the human heart. Effect of the deletion/insertion polymorphism. *Circulation* 1995; 92: 1387-8.
51. Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860-921.
52. Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291: 1304-51.
53. Yasuda Y, Cohen CD, Henger A, Kretzler M, European Renal cDNA Bank (ERCB) Consortium. Gene expression profiling analysis in nephrology: towards molecular definition of renal disease. *Clin Exp Nephrol* 2006; 10: 91-8.
54. Saint-Mezard P, Berthier CC, Zhang H, et al. Analysis of independent microarray datasets of renal biopsies identifies a robust transcript signature of acute allograft rejection. *Transpl Int* 2009; 22: 293-302.
55. Zaza G, Dell'Oglio MP, Rossini M, et al. Mycophenolic acid induces the expression of neutral endopeptidase (NEP): A new therapeutic target defined by a pharmacogenomic approach. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 604A.
56. Brouard S, Mansfield E, Braud C, et al. Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 15448-53.
57. Zaza G, Pontrelli P, Pertosa G, et al. Dialysis-related systemic microinflammation is associated with specific genomic patterns. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23: 1673-81.
58. Granata S, Zaza G, Simone S, et al. Mitochondrial dysregulation and oxidative stress in patients with chronic kidney disease. *BMC Genomics* 2009; 10: 388.
59. Kapur G, Mattoo T, Aranda JV. Pharmacogenomics and renal drug disposition in the newborn. *Semin Perinatol* 2004; 28: 132-40.
60. Savage DR. US Food and Drug Administration. FDA guidance on pharmacogenomics data submission. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2: 937-8.