

VKORC1 , CYP2C9 POLYMORPHISMS AND CLOTTING FACTORS
ASSOCIATED WITH WARFARIN MAINTENANCE DOSE

Police Captain Alisara Sangviroon

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Pharmaceutical Care

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

ความสัมพันธ์ระหว่างภาวะพหุสัณฐานของ VKORC1 , CYP2C9 และปัจจัยที่ช่วยในการ
แข็งตัวของเลือด ต่อขนาดยาแอสไพริน

ร้อยตำรวจเอกหญิง อลิศรา แสงวิรุณ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาการบริหารทางเภสัชกรรม

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title VKORC1, CYP2C9 POLYMORPHISMS AND
CLOTTING FACTORS ASSOCIATED WITH
WARFARIN MAINTENANCE DOSE
By Pol. Capt. Alisara Sangviroon
Field of Study Pharmaceutical Care
Thesis Advisor Associate Professor Duangchit Panomvana, Ph.D.
Thesis Co-advisor Jule Namchaisiri, M.D.

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Doctoral Degree

Pornpen Pramyoti
..... Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences
(Associate Professor Pornpen Pramyothin, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

Prapapuck Silapachote
..... Chairman
(Associate Professor Prapapuck Silapachote, M.Sc.)

Duangchit Panomvana
..... Thesis Advisor
(Associate Professor Duangchit Panomvana, Ph.D.)

Jule Namchaisiri
..... Thesis Co-advisor
(Jule Namchaisiri, M.D.)

Supakit Wongwiwatthananutit
..... Member
(Assistant Professor Supakit Wongwiwatthananutit,
Pharm.D., Ph.D.)

C. Chinpaisal
..... External Member
(Associate Professor Chatchai Chinpaisal, Ph.D.)




Walapa Tatong
..... Member
(Walapa Tatong, Ph.D.)

อสิตรา แสงวิรุณ: ความสัมพันธ์ระหว่างภาวะพหุสัณฐานของ VKORC1, CYP2C9 และปัจจัยที่ช่วยในการแข็งตัวของเลือด ต่อขนาดยาแวนาร์ฟาริน (VKORC1, CYP2C9 POLYMORPHISMS AND CLOTTING FACTORS ASSOCIATED WITH WARFARIN MAINTENANCE DOSE) อ. ที่ปรึกษา: รศ.ดร. ดวงจิตต์ พนมวัน ณ อยุธยา, อ. ที่ปรึกษาร่วม: นพ. จุล นำชัยศิริ, 89 หน้า.

แวนาร์ฟารินมีความแตกต่างของขนาดยาสูง ทั้งในคนเดียวกัน แต่ละคน และต่างเชื้อชาติ ดังนั้นจึงมีความยากในการปรับขนาดยาและการทำนายขนาดยาที่เหมาะสมสำหรับผู้ป่วยแต่ละคน การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของภาวะพหุสัณฐานของ VKORC1, CYP2C9 และปัจจัยที่ช่วยในการแข็งตัวของเลือดต่อขนาดยาแวนาร์ฟารินในคนไทย และสร้างสมการเพื่อทำนายขนาดยาแวนาร์ฟารินที่เหมาะสมในคนไทย มีการตรวจชนิดของยีน CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1 C1173T และ VKORC1 G-1639A ในผู้ป่วยที่ได้รับยาแวนาร์ฟารินในขนาดยาคงที่อย่างน้อย 2 เดือน รวม 107 คน ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ พบว่าในคนไทยพบ CYP2C9*1 มากที่สุดคือ 98.0% มีอัลลีล CYP2C9*3 ประมาณ 2.0% [95%CI 1.0%-5.0%] แต่ไม่พบอัลลีล CYP2C9*2 ขณะเดียวกันพบ VKORC1 กลุ่ม A (1173 TT and -1639AA) มากที่สุดคือ 74.8% [95%CI 69.1%-79.8%] ผู้ป่วยกลุ่ม CYP2C9*3 มีขนาดยาแวนาร์ฟารินน้อยกว่ากลุ่ม CYP2C9*1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, $p=0.019$ [95%CI 0.040-0.448] ผู้ป่วยกลุ่ม CYP2C9*3 มีการขจัดยาแวนาร์ฟารินน้อยกว่ากลุ่ม CYP2C9*1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, $p=0.014$ [95%CI 0.005-0.044] และ VKORC1 กลุ่ม AA มีขนาดยาแวนาร์ฟารินน้อยกว่า VKORC1 กลุ่ม BB และ AB อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, $p=0.025$ และ $p<0.0001$ ตามลำดับ CYP2C9*3 และ VKORC1 สามารถอธิบายความแตกต่างของขนาดยาแวนาร์ฟารินที่เหมาะสมได้ถึง 48% เมื่อรวมปัจจัยต่างๆ ได้แก่ CYP2C9*3, VKORC1 กลุ่มต่างๆ, อายุ น้ำหนัก และ อัตราส่วนของ INR ต่อ ระดับยาแวนาร์ฟารินไว้ในสมการ จะสามารถทำนายความแตกต่างของขนาดยาแวนาร์ฟารินที่เหมาะสมได้ 59.5% การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าปัจจัยทางพันธุกรรม ได้แก่ CYP2C9*3 และ VKORC1 มีบทบาทสำคัญต่อการกำหนดขนาดยาแวนาร์ฟารินที่เหมาะสมสำหรับผู้ป่วยคนไทยแต่ละคน

สาขาวิชา การบริหารทางเภสัชกรรม

ปีการศึกษา 2550

ลายมือชื่อนิสิต..... 
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... 
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... 

##457 69744 33: MAJOR PHARMACEUTICAL CARE

KEY WORD: VKORC1/ CYP2C9/ POLYMORPHISMS/ CLOTTING FACTORS/
WARFARIN

ALISARA SANGVIROON: VKORC1, CYP2C9 POLYMORPHISMS AND
CLOTTING FACTORS ASSOCIATED WITH WARFARIN MAINTENANCE
DOSE. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. DUANGCHIT PANOMVANA, Ph.D.,
THESIS COADVISOR: JULE NAMCHASIRI, M.D., 89 pp.

There are high intraindividual, interindividual and interethnic variabilities in warfarin dosing. It is difficult to adjust or to predict the appropriate dose for individual patient. Aim of this study was to investigate the association of *CYP2C9*, *VKORC1* genotypes and clotting factors on warfarin maintenance dose and to establish the equation to predict the maintenance dose of warfarin in Thai population. Genotypes of *CYP2C9*2*, *CYP2C9*3*, *VKORC1 C1173T* and *VKORC1 G-1639A* were performed in 107 Thais outpatients who were taking stable dose of warfarin for at least 2 months at The King Chulalongkorn Memorial Hospital. Most of allele frequency in Thais was *CYP2C9*1* (98.0%) while no *CYP2C9*2* was found in Thai population. Allele frequency of *CYP2C9*3* was 2.0% [95%CI 1.0%-5.0%]. *VKORC1* haplotype group A (1173 TT and -1639AA) was the major group (74.8%, 95%CI 69.1%-79.8%) in Thais. Mean weekly warfarin dose in *CYP2C9*3* group was significantly lower than those in *CYP2C9*1* group, $p=0.019$ [95%CI 0.040-0.448]. Warfarin clearance in *CYP2C9*3* group was significantly lower than those in *CYP2C9*1* group, $p=0.014$ [95%CI 0.005-0.044]. Furthermore, the mean weekly warfarin doses in *VKORC1* AA genotypes were significantly lower than those in *VKORC1* BB and AB genotypes, $p=0.025$ and $p<0.0001$, respectively. Contribution of *CYP2C9*3* and *VKORC1* genotypes account for 48% of variance in warfarin dose. Using forward stepwise multiple linear regression, the model which included *CYP2C9*3*, *VKORC1*, age, weight and INR:total warfarin concentration could explain 59.5 % of the variance in warfarin maintenance dose. Genetic factors played the important role on the interindividual variation in warfarin maintenance dose in Thai population.

Field of study Pharmaceutical Care

Academic year 2007

Student's signature.....*Alisara Sangviroon*.....

Advisor's signature.....*Duangchit Panomvana*.....

Co-advisor's signature.....*Jule Namchaisiri*.....

ACKNOWLEDGEMENTS

First of all, I would like to express my sincere gratitude to my thesis advisor, Associate Professor Duangchit Panomvana, Ph.D., of the Department of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for her valuable guidance, suggestions, encouragement and kindness throughout the course of this study. I am grateful to my thesis co-advisor, Jule Namchaisiri, M.D., Division of Surgery, Department of CVT, The King Chulalongkorn Memorial Hospital, for his kindness suggestions, active cooperation and the time he devoted to helpful discussions. My deeply appreciation also goes to all of the physicians in this division, for their kindness of screening the participants in this study.

I wish to express my gratitude to Associate Professor Wichitra Tassaneeyakul, Ph.D., Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Khon kaen University, for her valuable advice and her kind assistance throughout the genotyping analysis. My honest thank is extended to Pol.Col.Nuttama Chawanvejchabul, Institute of Forensic Medicine, The Royal Thai Police Head Quarter, for her support in the Laboratory and facilities through the DNA extraction analysis. I would like to thank Walapa Tatong, Ph.D., Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for her expert advice and suggestions in the HPLC system. My Thank you also goes to Benjaporn Akkawat, B.Sc., Division of Hematology, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for her active cooperation in Clotting factor analysis. I am thankful to the thesis committee members for their valuable comments and suggestions.

My thankfulness is extended to Roche Diagnostic, Thailand for the grant in VKORC1 analysis. Thanks to all of my friends for sharing the great opinions and assistances in laboratory techniques.

Most of all I am deeply grateful to my parents and my sister for their encouragement, understanding and supporting throughout my graduate study.

Finally, I would like to express my gratitude to all patients who participated in this study and all of those whose name have not been mentioned for helping me for this study.

CONTENTS

| | Page |
|---|------|
| ABSTRACT (THAI)..... | iv |
| ABSTRACT (ENGLISH)..... | v |
| ACKNOWLEDGEMENTS..... | vi |
| CONTENTS..... | vii |
| LIST OF TABLES..... | x |
| LIST OF FIGURES..... | xii |
| LIST OF ABBREVIATIONS..... | xiii |
| | |
| CHAPTER I..... | 1 |
| | |
| 1. Introduction..... | 1 |
| 1.1 Rationale and Background..... | 1 |
| 1.2 Hypothesis..... | 3 |
| 1.3 Objectives..... | 3 |
| 1.4 Expected Outcomes..... | 3 |
| | |
| CHAPTER II..... | 4 |
| | |
| 2. Literature reviews..... | 4 |
| 2.1 Warfarin..... | 4 |
| 2.2 Factor associated with warfarin dose..... | 10 |
| | |
| CHAPTER III..... | 21 |
| | |
| 3. Research methodology..... | 21 |
| 3.1 Patients..... | 21 |
| 3.2 Study design..... | 22 |
| 3.3 Sampling..... | 23 |

| | Page |
|--|------|
| 3.4 Bioanalysis | 24 |
| 3.5 Pharmacokinetic parameter calculation..... | 31 |
| 3.6 Statistical analysis..... | 31 |
| 3.7 Ethical consideration | 32 |
| CHAPTER IV..... | 33 |
| 4. Results | 33 |
| 4.1 Study population | 33 |
| 4.1.1 Demographic data..... | 33 |
| 4.2 Population allelic frequencies | 36 |
| 4.3 Effect of genetic polymorphisms on warfarin doses..... | 38 |
| 4.4 Effect of genetic factors on pharmacokinetic parameter | 43 |
| 4.5 Effect of genetic factors on pharmacodynamic parameter | 48 |
| 4.6 Estimation equations | 52 |
| 4.7 Association of VKORC1 on side effect of warfarin treatment | 56 |
| 4.8 Interethnic variability of genetics polymorphisms in Asia..... | 58 |
| CHAPTER V | 61 |
| 5. Discussion..... | 61 |
| CHAPTER VI..... | 66 |
| 6. Conclusion..... | 66 |
| References..... | 68 |

Page

APPENDICES 74

VITAE..... 89

LIST OF TABLES

| | Page |
|---|------|
| Table 2.1 Half life of Vitamin K-dependent clotting factors..... | 5 |
| Table 2.2 Indications and Target INR..... | 7 |
| Table 2.3 Drug and food interactions with warfarin by level of supporting evidence and direction of interaction. | 8 |
| Table 2.4 CYP2C9 allele frequencies in different ethnicity | 12 |
| Table 2.5 Distribution of VKORC1 Haplotypes in European-American, African-American, and Asian-American Populations. | 15 |
| Table 3.1 Real time PCR conditions | 27 |
| Table 3.2 Chromatographic conditions | 29 |
| Table 4.1 Demographic data of patients who enrolled the study | 34 |
| Table 4.2 Prevalence of CYP2C9 and VKORC1 genotypes..... | 36 |
| Table 4.3 Weekly warfarin dose for each group of CYP2C9 and VKORC1 genotypes | 38 |
| Table 4.4 Weekly warfarin dose for different age group among CYP2C9 and VKORC1 genotypes..... | 39 |
| Table 4.5 Weekly warfarin dose for different VKORC1 combined with CYP2C9 genotypes..... | 40 |

| | Page |
|---|------|
| Table 4.6 Comparison of warfarin concentration and clearance between CYP2C9 genotypes..... | 44 |
| Table 4.7 Comparison of warfarin concentration and clearance between VKORC1 genotypes..... | 45 |
| Table 4.8 Comparison of clearance among different group of time taking warfarin | 47 |
| Table 4.9 Effect of time of taking warfarin on clotting factors | 48 |
| Table 4.10 Clotting factor activities in different genotypes | 49 |
| Table 4.11 Warfarin sensitivity index in different genotypes | 50 |
| Table 4.12 Model summary of forward stepwise linear regression..... | 52 |
| Table 4.13 Coefficients of factors in the best fit equation..... | 53 |
| Table 4.14 Estimation equations of warfarin dose..... | 53 |
| Table 4.15 Comparison of side effect in different VKORC1 genotypes..... | 57 |
| Table 4.16 Comparison of major bleeding in different VKORC1 genotypes..... | 57 |
| Table 4.17 Comparison of CYP2C9*3 allele frequencies among Asians..... | 58 |
| Table 4.18 Comparison of VKORC1 haplotype frequencies among Asians | 59 |
| Table 4.19 Comparison of genetic and non-genetic factors among Asians..... | 60 |

LIST OF FIGURES

| | page |
|--|------|
| Figure 2.1 The structure of Warfarin..... | 4 |
| Figure 2.2 The mechanism of Warfarin | 6 |
| Figure 2.3 Structure of nine exons of CYP2C9 gene | 11 |
| Figure 2.4 Structure of three exons of VKORC1 gene | 14 |
| Figure 3.1 Flow chart of the study | 23 |
| Figure 4.1 Box and whisker plot of mean weekly warfarin doses in different genotypes..... | 41 |
| Figure 4.2 Error bar show standard error of mean weekly warfarin dose..... | 42 |
| Figure 4.3 Warfarin clearance in different CYP2C9 and VKORC1 genotypes..... | 46 |
| Figure 4.4 Scatter plot between log-transformed weekly warfarin dose and INR:Total plasma warfarin concentration (C _p) in µg/ml | 51 |
| Figure 4.5 Scattered plot of warfarin dose in log-transformed and predicted dose from estimation equation..... | 55 |
| Figure 4.6 Bar chart shows comparison of side effect in different VKORC1 genotypes..... | 56 |

LIST OF ABBREVIATIONS

| | | |
|--------|---|---|
| ANOVA | = | Analysis of Variance |
| Arg | = | Arginine |
| BMI | = | Body Mass Index |
| CI | = | Confidence Interval |
| CYPs | = | Cytochrome P450s |
| Cys | = | Cysteine |
| DNA | = | Deoxyribonucleic Acid |
| EDTA | = | Ethylenediaminetetraacetic Acid |
| FII | = | Factor II |
| FVII | = | Factor VII |
| GGCX | = | Gamma-Glutamyl Carboxylase |
| HPLC | = | High Performance Liquid Chromatography |
| Ile | = | Isoleucine |
| INR | = | International Normalized Ratio |
| Leu | = | Leucine |
| OD | = | Optical Density |
| OR | = | Odds Ratio |
| PCR | = | Polymerase Chain Reaction |
| PD | = | Pharmacodynamics |
| PK | = | Pharmacokinetics |
| RBC | = | Red Blood Cell |
| RFLP | = | Restriction Fragment Length Polymorphism |
| rpm | = | Round Per Minute |
| SNPs | = | Single Nucleotide Polymorphisms |
| VKORC1 | = | Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 |
| WBC | = | White Blood Cell |