

ABSTRACT

Warfarin is one of the most commonly used oral anticoagulants worldwide and is highly efficacious for the treatment and prevention of thromboembolic disorders. However, due to its narrow therapeutic index, large inter-individual variability in dose requirements, and extensive drug and food interactions, warfarin remains a challenging drug to prescribe. Genetic factors (*CYP2C9* and *VKORC1*), together with clinical factors (age and body weight), account for up to 60% of warfarin dose variance, whereas ~40% variability remains poorly understood.

Several warfarin dosing algorithms, comprising genetic and non-genetic covariates have been published over the years. However, none of the published algorithms included patients from Southern Italy. We therefore conducted a candidate-gene study to develop an algorithm for predicting warfarin maintenance dose in patients from the Campania Region (n=266) in Southern Italy. Our pharmacogenetic dosing algorithm consisted of six variables (age, body surface area, amiodarone intake, *CYP2C9**2, *CYP2C9**3, and *VKORC1* -1639G>A). It led to the accurate prediction of warfarin maintenance dose in 44% of patients (mean absolute error 7.41 mg/week). The prediction accuracy of the pharmacogenetic algorithm was superior to three previously published pharmacogenetic algorithms derived from patients in Northern and Central Italy.

Given that previous studies suggested a role for miR-133a in warfarin response, we conducted a pilot study comparing baseline serum levels of miRNA in patients who achieved warfarin stable dose (n=10) to those who did not achieve warfarin stability (n=10), using the Affymetrix miRNA array. No association was found between miRNA-133a and warfarin response. Interestingly, circulating levels of miR-548a-3p were observed to be higher in patients who did not achieve warfarin stability ($P=0.0053$, fold change =1.66) compared to patients who achieved stable dose. *In silico* analyses showed that several target genes of miR-548a-3p are involved in the coagulation pathway. Work is currently underway to validate and replicate these findings in a larger cohort of prospectively recruited patients initiated onto warfarin therapy (n=980) using TaqMan miRNA real-time quantitative PCR.

Pharmacogenetic algorithms have shown that common variants in *CYP2C9* and *VKORC1* genes cannot fully explain the extreme dose requirements in individuals sensitive and resistant to warfarin. To investigate the role of other genetic variants in these patients with extreme phenotypes, we performed a genome-wide association study (GWAS) comprising of warfarin sensitive patients (≤ 1.5 mg/day, n=55), warfarin resistant patients (≥ 10 mg/day, n=51), and healthy controls from the National Blood Service (NBS, n=2,501). Our results suggested that an intergenic variant on chromosome 10, rs4918797, could be involved in warfarin sensitivity. Intronic SNPs in *MIR6873* on chromosome 6 (rs114213056) and *PIGN* on chromosome 18 (rs10163900, rs76455916, rs77118150, and rs79434376) showed suggestive association with warfarin resistance.

The findings of this thesis showed that a multitude of factors affect warfarin dosing, some of which still need further investigations. Insights of the roles of other factors such as non-coding RNA and rare genetic variants will hopefully improve dose prediction and drug efficacy and ultimately patient outcomes. The work being undertaken with warfarin acts as a pathfinder project, the concepts from which could be applied to other drugs with variable dose requirement.

SOMMARIO

Il warfarin è un farmaco anticoagulante orale largamente utilizzato per la prevenzione e il trattamento di eventi tromboembolici. Il trattamento con warfarin, tuttavia, risulta poco maneggevole a causa della sua stretta finestra terapeutica, dell'elevata variabilità inter-individuale nella dose richiesta e delle numerose interazioni con farmaci e alimenti. Fattori genetici (*CYP2C9* e *VKORC1*) e variabili cliniche (età e peso) spiegano circa il 60% della variabilità nella dose che si osserva nei pazienti in trattamento, mentre il 40% circa è legato a fattori non ancora noti.

Diversi algoritmi per determinare la dose individuale di warfarin sulla base di variabili cliniche e genetiche sono stati sviluppati nel corso degli anni, ma nessuno degli studi italiani pubblicati finora ha incluso pazienti del Sud Italia. Per tale ragione, abbiamo condotto uno studio gene-candidato al fine di sviluppare un algoritmo farmacogenetico per calcolare la dose di mantenimento di warfarin in 266 pazienti Campani. Un algoritmo a sei variabili (età, superficie corporea, uso di amiodarone, *CYP2C9**2, *CYP2C9**3 e *VKORC1* -1639G>A) è stato derivato, permettendo l'accurata determinazione della dose nel 44% dei pazienti considerati (errore medio assoluto di 7.41 mg settimanali). Il potere predittivo di tale algoritmo farmacogenetico si è dimostrato superiore a quello di tre algoritmi farmacogenetici pubblicati includendo pazienti del Centro e Nord Italia.

Sulla base di studi che suggerivano un possibile ruolo di miR-133a nel meccanismo di risposta al warfarin, abbiamo condotto uno studio pilota per comparare i livelli basali di espressione dei microRNA (miRNA) (Affymetrix miRNA array) in pazienti in trattamento con warfarin che raggiungevano (n=10) o meno (n=10) la dose stabile. Mentre per miR-133a non è stata trovata nessuna differenza significativa, i livelli sierici di miR-548a-3p erano più elevati nei pazienti che non raggiungevano la dose stabile ($P=0.0053$). Analisi *in silico* hanno dimostrato che diversi geni target di miR-548a-3p sono coinvolti nella cascata della coagulazione. I risultati ottenuti sono al momento in fase di validazione e replicazione in una coorte prospettica di pazienti in trattamento con warfarin (n=980) mediante TaqMan miRNA real-time quantitative PCR.

Considerato che polimorfismi genetici in *VKORC1* e *CYP2C9* non sono i soli determinanti di dosi estremamente basse o elevate in pazienti sensibili o resistenti al warfarin, per l'individuazione di nuove varianti genetiche coinvolte nei fenotipi estremi di risposta al farmaco, abbiamo condotto uno studio di associazione genome-wide includendo pazienti sensibili al warfarin ($\leq 1,5$ mg/die, n=55), pazienti resistenti (≥ 10 mg/die, n=51) e controlli sani (n=2501). Una variante intergenica nel cromosoma 10, rs4918797, è stata significativamente associata alla sensibilità al warfarin, mentre varianti introniche nei geni *MIR6873* nel cromosoma 6 (rs114213056) e *PIGN* nel cromosoma 18 (rs10163900, rs76455916, rs77118150, e rs79434376) erano indicativi di resistenza.

I risultati di questo lavoro di tesi dimostrano che una serie di fattori influenzano la dose di warfarin. Ulteriori studi sul ruolo dei miRNA e di varianti genetiche rare potrebbero dimostrarsi utili per migliorare l'accuratezza degli algoritmi per il calcolo della dose di warfarin e, di conseguenza, aumentare la sicurezza e l'efficacia del trattamento. Infine, l'approccio utilizzato in questo studio potrebbe essere applicato anche ad altri farmaci per i quali il dosaggio dovrebbe essere individualizzato.