

บทความพื้นวิชา

Hypomethylating Agents

อภิชัย ลีละสิริ

หน่วยโลหิตวิทยา กองอายุรกรรม โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า

บทคัดย่อ: Epigenetic modification มีความสำคัญต่อการควบคุม transcription ของยีนส์ รวมทั้งการเกิดมะเร็ง ตัวอย่างของ epigenetic modification ที่ได้รับความสนใจมากในปัจจุบันได้แก่ การเกิด hypermethylation ของยีนส์ที่ควบคุมการเติบโตของเซลล์ เช่น tumor suppressor genes ยีนส์ที่ควบคุมการเกิด apoptosis และ cell cycle เช่น p15^{ink4b} ซึ่งเป็น cell-cycle-dependent kinase inhibitor ผลที่ตามมาคือเกิด disease progression ในมะเร็งบางชนิด เช่น AML และ MDS Hypomethylating agents ได้แก่ azacitidine และ decitabine เป็นยาที่มีการนำมาใช้ได้ผลดีในปัจจุบัน

Key Words : ● Epigenetic ● Azacitidine ● Decitabine

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2549;16:327-32.

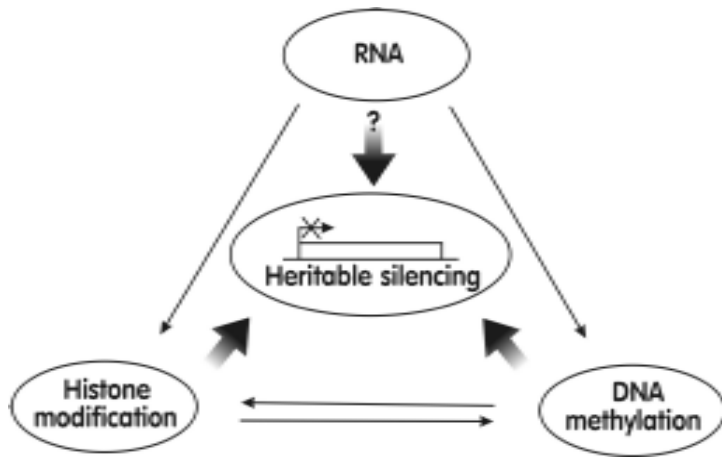
การเกิด epigenetic changes เป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็งบางชนิดโดยเฉพาะมะเร็งทางโลหิตวิทยา การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจะแตกต่างจากการเกิด inactivation ของยีนส์ซึ่งเกิดขึ้นโดย mutation หรือ loss of heterozygosity ตรงที่ epigenetic changes จะสามารถ reversible ได้และถือเป็น target ในการรักษา มะเร็งอย่างหนึ่ง (targeted therapy) ในกรณีของการเกิด hypermethylation ของยีนส์ที่ควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์จะเกิดที่ตำแหน่ง promoter-associated cytosine-guanine (CpG) islands¹ การใช้ hypomethylating agents สามารถทำให้เกิด restoration ของ normal methylation และ histone code patterns และ reexpression ของยีนส์ที่เคยถูกกดเอาไว้² ดังรูปที่ 1

Hypomethylating agents ที่ใช้ในปัจจุบันมี 2 ชนิด ได้รับต้นฉบับ 16 กุมภาพันธ์ 2549 ให้ลงตีพิมพ์ 20 มีนาคม 2549 ต้องการสำเนาต้นฉบับกรุณาติดต่อ นพ.อภิชัย ลีละสิริ หน่วยโลหิตวิทยา กองอายุรกรรม โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า ถนนราชวิถี เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

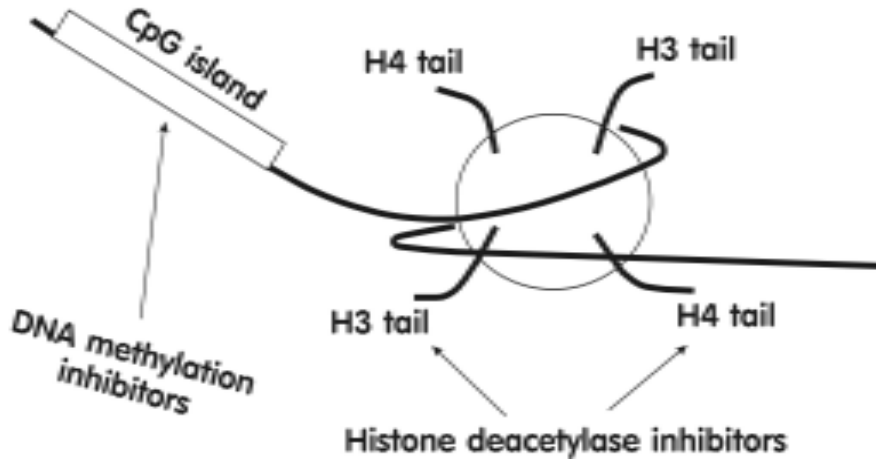
ได้แก่ 5-azacytidine (Azacitidine, Vidaza) และ 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) ยาตัวแรกได้รับการยอมรับจากองค์การอาหารและยาสหรัฐอเมริกา (USFDA) เมื่อ พ.ศ. 2547¹ ให้ใช้รักษา myelodysplasia (MDS) ทุก subtypes³ โครงสร้างของยาทั้ง 2 ชนิด แสดงในรูปที่ 2 และ 3

Azacitidine

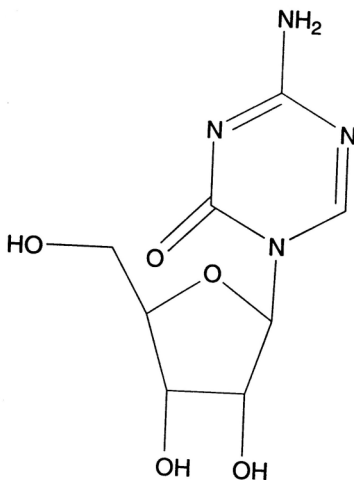
เป็น analogue ของ pyrimidine nucleoside cytidine ยานี้มีกลไกการออกฤทธิ์ 2 แบบได้แก่ cytotoxicity ซึ่งเกิดจากยาเข้าไปรวมกับ RNA และ DNA เนื่องจากมีโครงสร้างคล้าย cytidine ส่วนกลไกที่สองได้แก่ DNA hypomethylation ซึ่งทำให้การควบคุมการเติบโตของเซลล์รวมทั้ง differentiation ของเซลล์เม็ดเลือดกลับมาเป็นปกติ ขนาดของยาที่ใช้ในกรณีหลังนี้จะน้อยกว่าเมื่อใช้เป็น cytotoxic agent เนื่องจากขนาดยาดังกล่าวเมื่อศึกษาในหลอดทดลอง ไม่สามารถยับยั้งการสร้าง DNA ได้⁵



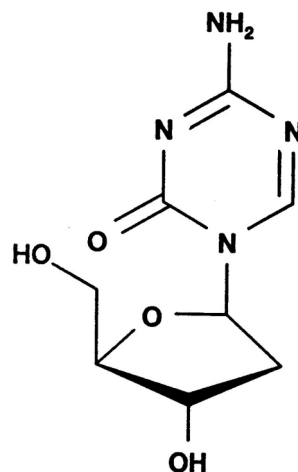
Model of epigenetic therapy



รูปที่ 1 แสดง Model of epigenetic therapy²



รูปที่ 2 แสดงโครงสร้างของ Azacitidine³



รูปที่ 3 แสดงโครงสร้างของ Decitabine⁴

เมื่อยาเข้าไปในเซลล์ จะถูก phosphorylation กลายเป็น 5-azacytidine monophosphate โดยเอนไซม์ uridine-cytidine kinase แล้วต่อมาเปลี่ยนเป็นรูป diphosphate และ triphosphate โดยเอนไซม์ pyrimidine monophosphate และ diphosphate kinase ตามลำดับ 5-azacytidine triphosphate จะถูกรวมเข้าไปใน RNA แล้วรบกวน metabolism ของ nuclear และ cytoplasmic RNA ทำให้ยับยั้งการสร้างโปรตีน 5-azacytidine diphosphate จะถูกเอนไซม์ ribonucleotide reductase เปลี่ยนเป็น 5-aza-deoxycytidine diphosphate ซึ่งจะถูกรวมเข้าไปใน DNA ผลตามมามีการยับยั้งการสร้าง DNA สำหรับในด้าน cytotoxicity ยา azacitidine จะมีผลต่อเซลล์ในระยะ S-phase แต่กลไกยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด^{6,7} azacitidine เมื่อใช้เป็น hypomethylating agent จะออกฤทธิ์ยับยั้งขบวนการ methylation ของ DNA ที่กำลังแบ่งตัว โดยยาจะเข้าไปจับกับเอนไซม์ DNA methyltransferase 1 แบบ stoichiometric^{8,9}

Azacitidine หลังจากฉีดเข้าใต้ผิวหนัง จะถูกดูดซึมเข้ากระแสเลือดได้เร็ว โดยมีความเข้มข้นของยาในเลือดสูงสุดที่ 30 นาที เมื่อฉีดยาเข้าใต้ผิวหนังและ 11 นาที เมื่อฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำโดยตรงเป็นเวลา 10 นาที ความเข้มข้นเฉลี่ยของยาจะสูงเป็น 4 เท่าเมื่อฉีดเข้าหลอดเลือดดำเทียบกับฉีดเข้าใต้ผิวหนัง bioavailability หลังจากฉีดเข้าใต้ผิวหนังจะมีค่าประมาณร้อยละ 89 โดยวัดจาก area under the concentration-time curve (AUC) ค่า plasma half-life เฉลี่ย 22 นาที หลังฉีดเข้าหลอดเลือดดำ และ 41 นาที หลังฉีดใต้ผิวหนัง ยากระจายเข้าสู่เนื้อเยื่อต่างๆ ได้ดี โดยมีค่าเฉลี่ยของ volume of distribution หลังฉีดยาเข้าหลอดเลือดดำเท่ากับ 76 ลิตร ซึ่งมากกว่าปริมาตรของ total body water ซึ่งเท่ากับ 42 ลิตร

Azacitidine จะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ cytidine deaminase อย่างรวดเร็ว 10 ยาจจะขับออกทางปัสสาวะเป็นส่วนใหญ่ (ร้อยละ 85 หลังจากฉีดเข้าหลอดเลือดและร้อยละ 50 หลังฉีดใต้ผิวหนัง) น้อยกว่าร้อยละ 1 ของยาจะขับออกทางอุจจาระ ค่า mean elimination half-life ประมาณ 4 ชั่วโมงเท่ากัน หลังฉีดเข้าหลอดเลือดดำหรือใต้ผิวหนัง ยาที่ไม่เป็น substrate, inhibitor หรือ inducer ของ cytochrome P450 ส่วน interaction กับยาอื่น ยังไม่มีการทดสอบ

ขนาดยาและผลการรักษา

ที่ใช้ในการรักษา MDS ได้แก่ 75 มก.ต่อตารางเมตรต่อวัน เป็นเวลา 7 วัน โดยฉีดใต้ผิวหนัง cycle หนึ่งใช้เวลา 28 วัน อาจมีการปรับขนาดยาใน cycle ต่อไป พบว่าผู้ป่วยบางรายต้องใช้ขนาดที่สูงขึ้นมากกว่า 100 มก.ต่อตารางเมตรต่อวัน แต่บางรายต้องลดขนาดลงเหลือน้อยกว่า 75 มก.ต่อตารางเมตรต่อวันก็มี

Azacitidine ได้นำมาใช้ในการรักษา MDS โดยการศึกษาคือ CALGB 9221¹¹ (Cancer and Leukemia Group B) ซึ่งเป็นการศึกษา phase III เปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วย MDS ทุก subtypes ได้แก่ RA (refractory anemia), RARS (refractory anemia with ringed sideroblasts), RAEB (refractory anemia with excess blasts), RAEB-t (refractory anemia with excess blasts in transformation), CMML (chronic myelomonocytic leukemia) รวมทั้ง AML ทั้งหมด 99 รายกับ observation group 92 ราย ขนาดที่ใช้เริ่มต้นคือ 75 มก.ต่อตารางเมตรต่อวัน ฉีดใต้ผิวหนังเป็นเวลา 7 วันทุก 28 วัน อาจมีการปรับขนาดยาในกรณีเกิดผลข้างเคียงทางโลหิตวิทยา หรือรายที่ไตทำงานลดลง การศึกษานี้ไม่อนุญาตให้ใช้ growth factor ผู้ป่วยในกลุ่ม observation ร้อยละ 55 ได้ถูก cross over ให้มารักษาด้วย azacitidine ได้เนื่องจากมี disease progression หลังจากได้ทำการรักษาไป 2-4 cycles

ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีอายุมาก เฉลี่ยเกิน 67 ปี หญิง:ชาย ราว 3:1 primary endpoint ได้แก่ overall response rate (CR+PR) พบว่าผู้ป่วย 6 รายได้ CR (complete response) 10 รายได้ PR (partial response) รวมตอบสนองทั้งสิ้นร้อยละ 16.2 ซึ่งในกลุ่ม observation ไม่มีรายใดเลยที่ตอบสนอง เมื่อมีการ cross over มายังกลุ่มที่ได้ยา 51 ราย (ร้อยละ 55) พบว่ามี CR และ PR อย่างละ 3 ราย รวมตอบสนองทั้งสิ้นร้อยละ 11.8

การศึกษาที่สองได้แก่ CALGB 8921 ในผู้ป่วย RAEB, RAEB-t และ CMML¹² รวมทั้งสิ้น 72 ราย ขนาดยาเท่าๆกันในการศึกษาแรก พบว่าได้ CR 4 ราย PR 6 ราย รวมตอบสนองทั้งสิ้นร้อยละ 18.8 เมื่อวิเคราะห์ดูถึงการตอบสนองพบว่า เพศ อายุ และ MDS subtypes ไม่แตกต่างกัน ผู้ป่วยที่เป็น AML ตาม WHO criteria ก็มีการตอบสนองดีพอๆ กับผู้ป่วย MDS ที่สำคัญคือผู้ป่วยที่เป็น transfusion-dependent จะได้ผลการตอบสนองที่ดี median response duration นานกว่า 330 วัน ในด้าน survival benefit ยังไม่สามารถบอกได้ เนื่องจากผู้ป่วยกลุ่ม observation ได้ cross over มาให้การรักษาด้วยยาและจำนวนผู้ป่วยไม่มากพอที่จะมี statistical power เมื่อนำผู้ป่วยที่เป็น AML ตาม WHO criteria (AML, RAEB-t) ของการศึกษา CALGB 8921 และ CALGB 9221 มารวมกันและวิเคราะห์¹³ พบว่า azacitidine ให้ CR 9% และมี median survival นานกว่าเล็กน้อยเมื่อเทียบกับกลุ่ม supportive care (19.3 เดือน vs 12.9 เดือน, $p = 0.2$)

การเปลี่ยนแปลงที่จะบอกได้ว่าจะมีการตอบสนองต่อยาได้แก่มีการลดลงของ blasts มีการเพิ่มของแกร็ดเลือด ฮีโมโกลบิน หรือเม็ดเลือดขาว ซึ่งพบว่าผู้ป่วยส่วนใหญ่ (ร้อยละ 90) จะเห็นการเปลี่ยนแปลงหลังจากได้ยาไปแล้ว 5 cycles

ผลข้างเคียง³

เนื่องจาก azacitidine ใช้รักษา MDS ผลข้างเคียงของยาอาจแยกจากโรค MDS เอง ที่พบบ่อยได้แก่

แกร็ดเลือดต่ำ ไข้ febrile neutropenia และปวดอวัยวะ อากาศของระบบทางเดินอาหารได้แก่ คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย ท้องผูก เบื่ออาหาร ระบบโลหิตวิทยาที่พบนอกเหนือจากที่กล่าวแล้วข้างต้นได้แก่ เลือดออกง่าย (ecchymoses, petechiae) อาการอื่นๆ ได้แก่ หนาวสั่น แดงบริเวณที่ฉีดยา ปวดข้อ ไอ เหนื่อยหอบ ปวดศีรษะ อ่อนเพลีย เวียนศีรษะ นอนไม่หลับ ผลข้างเคียงดังกล่าวพบได้บ่อยใน 2 cycles แรกของการรักษา ซึ่งต่อมาจะดีขึ้น สาเหตุที่สำคัญที่ทำให้ต้องหยุดยา ลดขนาดยาลง หรือหยุดยาชั่วคราวได้แก่ เม็ดเลือดขาวต่ำและแกร็ดเลือดต่ำ การเปลี่ยนแปลงของเม็ดเลือดหลังได้ยาจะพบว่าลดลงแต่จะดีขึ้นในผู้ป่วยที่มีการตอบสนองต่อยา การทำงานของตับผิดปกติพบได้ในผู้ป่วยที่มีการเจ็บป่วยอื่นร่วมด้วย เช่น hepatobiliary diseases, liver cirrhosis ภาวะของโรคที่มีการกระจายมาที่ตับ ไตวายพบได้ในผู้ป่วยที่มี sepsis และความดันโลหิตต่ำ ผลข้างเคียงบางอย่างที่มีรายงานพบบ่อยในผู้หญิงเช่น อาเจียน ท้องเสีย ปวดศีรษะ แดงบริเวณที่ฉีดยา ปวดข้อ หัวใจเต้นเร็วและเลือดออกหลังทำหัตถการ

Decitabine (5-aza-2'-deoxycytidine)

เป็น analog ของ 2'-deoxycytidine โดยตำแหน่ง 5 carbon ถูกแทนที่โดย nitrogen ยาเมื่อเข้าสู่ร่างกายจะถูกขบวนการ phosphorylation โดยเอนไซม์ deoxycytidine kinase กลายเป็น 5-aza-deoxycytidine monophosphate แล้วต่อมากลายเป็น 5-aza-deoxycytidine triphosphate (ซึ่งเป็น substrate ของ DNA polymerase alpha) ซึ่งจะเข้าไปใน DNA ที่สร้างขึ้นใหม่ในช่วง S phase ของ cell cycle เมื่อ DNA methyltransferases (DNMTs) ทำหน้าที่นำ methyl group ไปยัง hemimethylated DNA strands ของเซลล์ลูก decitabine ซึ่งอยู่ใน DNA จะจับกับ DNMT ด้วย covalent bond แล้วยับยั้งเอนไซม์นี้แบบ irreversible ทำให้ DNMT ไม่สามารถเติม methyl group ให้กับ cytosine residues อื่นๆ ผลที่ตามมาคือ general-

ized demethylation ทำให้ยีนส์ที่เคยถูกกดในระหว่างการแบ่งตัวที่ผ่านมา สามารถกลับมาทำงานใหม่ได้ (reexpression)¹⁴⁻¹⁶ จึงจำเป็นที่ต้องใช้ DNA synthesis อย่างน้อย 2 รอบ เพื่อที่จะเห็นการเปลี่ยนแปลงของ gene transcription และ expression

เมื่อเปรียบเทียบกับ azacitidine ซึ่งยาเข้าไปจับกับ DNA ได้น้อยกว่า decitabine ยา azacitidine จะจับกับ RNA ได้ดีกว่า และ azacitidine ต้องเปลี่ยนเป็น deoxy form ก่อนจะถูก phosphorylation จึงจะเข้าไปจับกับ DNA ได้ ดังนั้น decitabine สามารถทำให้เกิด demethylation ของ DNA ได้ที่ขนาดน้อยกว่า azacitidine 5-10 เท่า¹⁴ นอกจากนี้ decitabine ยังมีฤทธิ์ cytotoxicity ด้วย ซึ่งขนาดที่ใช้จะสูงกว่าเมื่อใช้เป็น hypomethylating agent ดังนั้นขนาดที่สูงจะทำให้เกิดการกดไขกระดูกและการติดเชื้อ¹⁷ ตามมา

ขนาดที่ใช้

จากรายงานของ Wijermans และคณะ¹⁸ รักษาผู้ป่วย high-risk MDS 66 รายด้วย decitabine ในขนาด 45 มก.ต่อตารางเมตรต่อวัน ทางหลอดเลือดดำ 3 วันทุก 6 สัปดาห์ พบว่าได้ overall response ร้อยละ 49 (32 ราย) และร้อยละ 20 ได้ complete response โดยมี median response duration 31 สัปดาห์ และ median survival 15 เดือน ผลข้างเคียงที่สำคัญได้แก่ การกดไขกระดูก ขนาดของยาเมื่อใช้รักษา AML อยู่ในในช่วง 50-200 มก.ต่อตารางเมตรต่อ cycle การศึกษาในแคนาดาใช้ขนาด 37.5-100 มก.ต่อตารางเมตร แบ่งให้เป็นเวลา 5 วัน รายงานของ MD Anderson Cancer Center แนะนำให้ใช้ขนาด 20 มก.ต่อตารางเมตร เข้าหลอดเลือดดำ 1 ชั่วโมง ทุกวันเป็นเวลา 5 วัน ทุก 28 วัน ในการรักษา MDS¹⁹ ส่วนในยุโรปใช้ 135 มก.ต่อตารางเมตร ในเวลา 3 วัน ทุก 6 สัปดาห์ ในผู้ป่วย AML ที่อายุมากกว่า 60 ปี ที่ไม่เคยได้เคมีบำบัดมาก่อนและไม่สามารถให้ standard induction chemotherapy ได้²⁰

ผู้ป่วยทั้งหมด 51 ราย ได้ complete response 14% และ partial response 17% มี median duration ของ best response 13 สัปดาห์ ผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการรักษา หลังจากที่ได้ยา 4 cycles จะได้ maintenance แบบผู้ป่วยนอกด้วยขนาด 20 มก.ต่อตารางเมตรต่อวัน ทางหลอดเลือดดำ 1 ชั่วโมงเป็นเวลา 3 วันทุก 6-8 สัปดาห์ ผลข้างเคียงที่พบจะคล้ายกับ azacitidine ได้แก่ เม็ดเลือดขาวต่ำ ไข้ ติดเชื้อ และ pancytopenia

สรุป

Epigenetic changes เป็นการเปลี่ยนแปลงทาง biochemical ของ chromatin ซึ่งไม่มีผลต่อ primary structure ของ DNA ตัวอย่างได้แก่การเกิด DNA methylation ของส่วน promoter-associated CpG islands การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวมีผลต่อการควบคุม gene expression และเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดมะเร็ง epigenetic therapy เป็นการรักษาด้วยยาที่ทำให้เกิด hypomethylation หรือยาที่ยับยั้งเอนไซม์ histone deacetylase ยา azacitidine และ decitabine เป็นยาในกลุ่ม hypomethylating agents ซึ่งได้ผลดีในผู้ป่วย MDS และ AML อาจได้ผลดีขึ้นถ้าให้ร่วมกับยากลุ่มอื่นๆ เช่น valproic acid ซึ่งเป็น histone deacetylase inhibitor²¹ ซึ่งคงต้องรอผลการศึกษาดูต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Aggerholm A, Holm MS, Guldborg P, Hokland P. Delineation of promoter methylation in patients with myelodysplastic syndromes: widespread and concurrent hypermethylation of multiple genes and increased mRNA expression of the DNA methyltransferase DNMT1, 3A and 3B. *Blood* 2004;104:138a (abstract 472).
2. Jones P. Methylation and aberrant gene silencing in hematological malignancies. *Program & Abstracts in Corporate Friday Symposium preceding the 47th ASH Annual Meeting* 2005:6-7.

3. Kaminskas E, Farrell AT, Wang Y-C, Sridhara R, Pazdur R. FDA Drug Approval Summary: Azacitidine (5-azacytidine, Vidaza™) for Injectable Suspension. *The Oncologist* 2005;10:176-82.
4. de Vos D and van Overveld W. Decitabine: a historical review of the development of an epigenetic drug. *Ann Hematol* 2005;84:3-8.
5. Glover AB, Leyland-Jones B. Biochemistry of azacitidine: a review. *Cancer Treat Rep* 1987;71:959-64.
6. Li LH, Olin EJ, Fraser TJ, et al. Ohase specificity of 5-azacytidien against mammalian cells in tissue culture. *Cancer Res* 1970;30:2770-5.
7. Vesely J. Mode of action and effects of 5-azacytidine and of its derivatives in eukaryocytic cells. *Pharmacol Ther* 1985;227:227-35.
8. Jones PA, Taylor SM, Wilson VL. Inhibition of DNA methylation by 5-azacytidine. *Recent Results Cancer Res* 1983;202:202-11.
9. Friedman S. The inhibition of DNA (cytosine-5) methylases by 5-azacytidine. The effect of azacytosine-containing DNA. *Mol Pharmacol* 1981;19:314-20.
10. Chabner BA, Drake JC, Johns DG. Deamination of 5-azacytidine by a human leukemia cell cytidine deaminase. *Biochem Pharmacol* 1973;22:2763-5.
11. Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, et al. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the Cancer and Leukemia Group B. *J Clin Oncol* 2002;20:2429-40.
12. Silverman LR, Holland JF, Demakos EP, et al. Azacitidine (Aza C) in myelodysplastic syndromes (MDS), CALGB studies 8421 and 8921. *Ann Hematol* 1994;68:A12.
13. Silverman LR, McKenzie DR, Peterson BL, et al. Response rates in patients with acute myeloid leukemia (AML), treated with azacitidine, using WHO and International Working Group (IWG) Criteria for myelodysplastic syndrome (MDS). *Blood* 2005;106:525A (abstract 1848).
14. Creusot F, Acs G, Christman JK. Inhibition of DNA methyltransferase and induction of Friend erythro-leukemia cell differentiation by 5'-azacytidine and 5'-aza-2'-deoxycytidine. *J Biol Chem* 1982;257:2041-8.
15. Jones PA, Taylor SM. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell* 1980;20:85-93.
16. Wilson VL, Jones PA, Momparler RL. Inhibition of DNA methylation in L1210 leukemic cell by 5-aza-2'-deoxycytidine as a possible mechanism of chemotherapeutic action. *Cancer Res* 1983;43:3493-6.
17. Yee KWL, Jabbour E, Kantarjian HM, Giles FJ. Clinical experience with decitabine in North American patients with myelodysplastic syndrome. *Ann Hematol* 2005;84:18-24.
18. Wijermans P, Lubbert M, Verhoef G, et al. Low-dose 5-aza-2'deoxycytidine, a DNA hypomethylating agent, for the treatment of high-risk myelodysplastic syndrome: a multicenter phase II study in elderly patients. *J Clin Oncol* 2000;18:956-62.
19. Kantarjian HM, O'Brien S, Giles FJ, et al. Decitabine low-dose schedule (100 mg/m²/course) in myelodysplastic syndrome (MDS). Comparison of 3 different dose schedules. *Blood* 2005;106:708a (abstract 2522).
20. Lubbert M, Ruter B, Schmid M, et al. Continued low-dose decitabine (DAC) is active first-line treatment of older AML: First results of a multicenter phase II study. *Blood* 2005;106:527a (abstract 1852).
21. Fadrel S and Kantarjian HM. Drug Insight: emerging new drugs in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Nature Clinical Practice Oncology* 2005;2:348-54.