

Mechanizmy działania leków hipometylujących w zespołach mielodysplastycznych

Mechanism of action of hypomethylating agents in myelodysplastic syndromes

Lidia Gil¹, Krzysztof Mądry², Mieczysław Komarnicki¹

¹Katedra i Klinika Hematologii i Chorób Rozrostowych Układu Krwiotwórczego, Uniwersytet Medyczny, Poznań

²Katedra i Klinika Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Streszczenie

Hipermetylacja DNA odgrywa znaczącą rolę w procesie onkogenezy, zwłaszcza w patogenezie zespołów mielodysplastycznych (MDS). Leki o działaniu hipometylującym DNA prowadzą do aktywacji genów supresorowych i regulujących cykl komórkowy, stanowiąc przykład terapii epigenetycznej. Obecnie w leczeniu MDS stosuje się dwa leki o działaniu hipometylującym DNA — azacytydynę i decytabinę. Leki te, zastosowane w małych dawkach, wpływają na metylację kwasów nukleinowych poprzez hamowanie metylotransferazy DNA. W badaniach randomizowanych wykazano, że znacząco poprawiają wyniki leczenia chorych na MDS, a azacytydyna wydłuża ich przeżycie. Azacytydyna jest obecnie zalecana w leczeniu MDS z grupy pośredniego i wysokiego ryzyka u chorych niekwalifikujących się do leczenia z zastosowaniem allogenicznego przeszczepienia krwiotwórczych komórek macierzystych (allo-HSCT). Ważnym mechanizmem działania leków hipometylujących jest możliwość indukowania reakcji „przeszczep przeciwko białaczce” po allo-HSCT, poprzez nasilenie ekspresji antygenów HLA-DR i antygenów białaczkowych na powierzchni komórek nowotworowych. Dokładne mechanizmy działania leków hipometylujących nie są jeszcze poznane. Znaczenie dla odpowiedzi klinicznej ma prawdopodobnie metabolizm wewnątrzkomórkowy tych leków. Poszukuje się biomarkerów molekularnych, które pozwolą na przewidywanie skuteczności terapii.

Słowa kluczowe: azacytydyna, decytabina, hipometylacja DNA, zespoły mielodysplastyczne

Hematologia 2012; 3, 2: 120–126

Abstract

DNA hypermethylation is an important process in oncogenesis, especially in pathogenesis of myelodysplastic syndrome (MDS). DNA hypomethylation is associated with inducing reexpression of epigenetically silenced suppressor genes. Two hypomethylating agents are currently used in the treatment of patients with MDS: azacitidine and decitabine. Therapy with those drugs, administered in low doses, results in DNA demethylation through the inhibition of DNA methyltransferase. It is confirmed in randomized trials, that hypomethylating drugs

improve outcome of selected patients with MDS. Azacitidine is proved to prolong survival of patients with MDS, and currently is recommended for treatment of patients from the intermediate and high risk group who are not eligible for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT). Hypomethylating agents appear to induce leukemic cell differentiation and to increase expression of HLA-DR antigens and other leukemia-associated antigens, which can increase graft versus leukemia effect after allo-HSCT. Detailed mechanism of action of hypomethylating agents is not known. Clinical response is probably related to cellular metabolism of those drugs. Molecular biomarkers should be found to predict therapy responses and patients outcome.

Key words: azacitidine, decitabine, DNA hypomethylation, myelodysplastic syndromes

Hematologia 2012; 3, 2: 120–126

Wprowadzenie

Postęp w zakresie rozumienia mechanizmów rozwoju i biologii nowotworów przyczynił się do powstania nowych metod terapii i zastosowania leków o nowych kierunkach działania. W ostatnich latach wykazano, że w patogenezie nowotworów ważną rolę odgrywają zaburzenia regulacji epigenetycznej, zwłaszcza w mechanizmie hipermetylacji DNA w obrębie genów kontrolujących cykl komórkowy i genów supresorowych [1]. Mechanizm ten ma szczególne znaczenie w rozwoju zespołów mielodysplastycznych (MDS, *myelodysplastic syndrome*) i ich ewolucji do ostrych białaczek szpikowych (AML, *acute myeloid leukemia*) [2, 3]. Obecnie w praktyce klinicznej stosuje się dwa leki wpływające na proces metylacji kwasów nukleinowych, zaliczane do grupy inhibitorów metylotransferazy DNA (DMTI, *deoxyribonucleic acid methyltransferase inhibitor*) — azacytydynę (5-azacytydynę [Vidaza[®], Celgene]) i decytabinę (2-deoxy-5-azacytydynę [Dacogen[®], SuperGene]), których skuteczność potwierdzono w terapii MDS [4, 5].

Wiele nowych leków hipometylujących jest obecnie w trakcie badań przedklinicznych, ale dotychczas nie zidentyfikowano skuteczniejszych niż wymienione azanukleozydy [6, 7]. Poniżej przedstawiono wybrane zagadnienia dotyczące mechanizmów działania DMTI i ich skuteczności w leczeniu chorych na MDS.

Mechanizm działania leków hipometylujących

Zarówno azacytydyna, jak i decytabina są znane od wielu lat jako leki cytostatyczne stosowane w terapii AML, jednak dopiero wykazanie wpływu na hipometylację DNA przyczyniło się do ich szerszego zastosowania w hematologii jako leków epigenetycznych [8]. Mechanizm ich działania nie jest

do końca poznany, choć dziś już wiadomo, że zależy od stosowanej dawki leku [9]. Azacytydyna i decytabina wykazują działanie wielokierunkowe — na poziomie molekularnym hamują syntezę i uszkadzają kwasy nukleinowe, zaś na poziomie komórkowym wpływają na proliferację komórek i indukują ich różnicowanie. Leki są analogami cytozyny o budowie pierścieniowej. Po wnikięciu do komórki docelowej ulegają aktywacji i wbudowują się w strukturę kwasów nukleinowych — azacytydyna w RNA oraz w DNA, natomiast decytabina w DNA. Oba leki prowadzą do hipometylacji DNA poprzez hamowanie metylotransferazy DNA, co stwierdzono w badaniach *in vitro* i analizach klinicznych [10–12]. Efektem hipometylacji DNA jest aktywacja genów supresorowych zaangażowanych w proces hamowania transformacji i progresji nowotworowej [13]. Zakłada się, że hipometylacja DNA prowadzi do odzyskania przez te geny kontroli nad proliferacją, różnicowaniem i apoptozą krwiotwórczych komórek nowotworowych w MDS [11]. Wiadomo, że małe dawki azanukleozydów wywołują hipometylację DNA bardziej efektywnie niż duże dawki, które hamują syntezę DNA. Duże znaczenie ma także wydłużenie czasu ekspozycji na lek [9]. Komórki nieproliferujące są względnie niewrażliwe na azacytydynę. Efekt hipometylujący zależy od fazy S cyklu komórkowego i są konieczne co najmniej 2–3 cykle syntezy DNA, aby zmienić transkrypcję i ekspresję DNA [14]. Analiza ekspresji genów wskazuje, że azacytydyna i decytabina mogą oddziaływać na różne geny zaangażowane w proces onkogenezy i cyklu komórkowego, uruchamiając wiele mechanizmów regulacyjnych, niekoniecznie związanych z aberrantną metylacją DNA [15]. W badaniach tych wykazano także różnice między azacytydyną i decytabiną zarówno pod względem siły, jak i kierunków działania, co może sugerować odmienne mechanizmy przeciwbiałaczkowe tych leków [16].

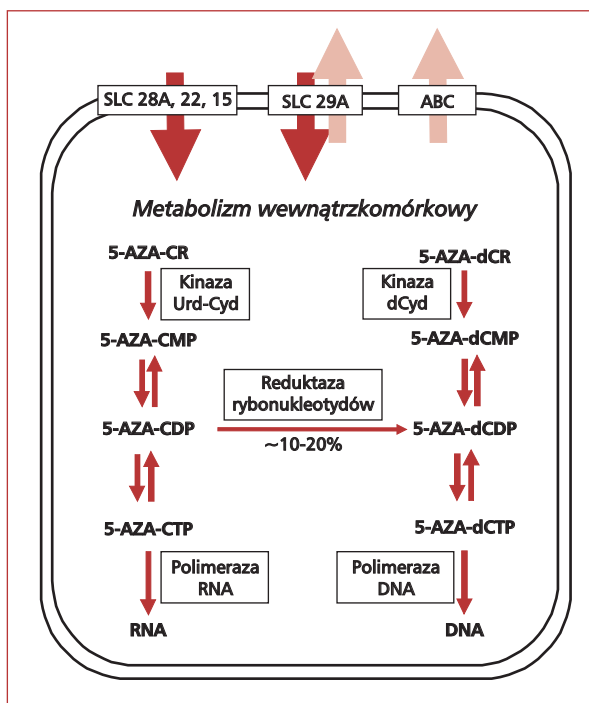
Dotychczas nie stwierdzono jednoznacznego związku między hipometylacją DNA a odpowiedzią kliniczną u chorych na MDS [9, 16]. Najwyraźniej zależność taką obserwowano w badaniach dotyczących supresorowego genu *p15*, którego hipermetylację i wyciszenie obserwuje się u części chorych na MDS, zwłaszcza źle rokujących [2, 17]. Z kolei w innych badaniach wykazano, że zmiany metylacji genu w czasie leczenia decytabiną lub azacytydyną nie korelowały z odpowiedzią kliniczną [9, 11]. Musch i wsp. dowiedli [18], że wpływ analogów nukleozydów (decytabiny i cytarabiny) na różnicowanie komórek macierzystych nie zależy od hipometylacji, lecz jest wynikiem degradacji czynników transkrypcyjnych NANOG i OCT4, hamujących różnicowanie komórek macierzystych poprzez aktywację kaspazy 7 i kaspazy 3. W innym badaniu wykazano, że u chorych na MDS azacytydyna, w hodowlach komórek jednojądrowych, hamuje uwalnianie cytokin, takich jak onkostatyna M, interleukina 6 i interleukina 11. Dodanie azacytydyny do hodowli komórkowych pochodzących od zdrowych ochotników nie zmieniało stężenia wyżej wymienionych cytokin, co sugeruje możliwy mechanizm działania azacytydyny przez wpływ na produkcję cytokin u chorych na MDS [19].

Wpływ leków hipometylujących na układ czerwonokrwinkowy udowodniono również u chorych na talasemię i anemię sierpowatokrwinkową. W przypadku talasemii β , przez działanie hipometylujące, leki te powodują zwiększenie syntezy łańcucha γ cząsteczki globiny, a w konsekwencji — łagodniejszy przebieg choroby [20].

Obecnie poszukuje się biomarkerów molekularnych, które pozwoliłyby na przewidywanie efektów terapii za pomocą leków hipometylujących. Wydaje się, że znaczenie dla odpowiedzi klinicznej na azanukleozydy mogą mieć mechanizmy transportu komórkowego leków i ich metaboliczna aktywacja w komórkach docelowych, w które jest zaangażowanych wiele białek (ryc. 1) [16].

Właściwości farmakokinetyczne

Dotychczas opublikowano niewiele prac dotyczących farmakokinetyki leków hipometylujących. Azacytydyna podawana podskórnie (*s.c.*, *subcutaneous*) wchłania się szybko, osiągając maksymalne stężenie w surowicy 0,5 godziny po podaniu. Bezzględna dostępność biologiczna po podaniu *s.c.* względem podania dożylnego (*i.v.*, *intravenous*), w oparciu o pole pod krzywą (AUC, *area under the curve*), wynosi 89% [21, 22]. Biodostępność azacytydyny podawanej doustnie w różnych dawkach



Rycina 1. Transport przez błonowy i metabolizm azanukleozydów; ABC, SLC 28A, 22, 15, 29A — białka komórkowego transportu przez błonowy; kinaza Urd-Cyd — kinaza urydynowo-cytydynowa (enzym metabolizmu wewnątrzkomórkowego dla azacytydyny); kinaza dCyd — kinaza deoksycytydynowa (enzymy metabolizmu wewnątrzkomórkowego dla decytabiny)

Figure 1. Membrane transport and intracellular metabolism of azanucleosides; ABC, SLC 28A, 22, 15, 29A — membrane transporter proteins; Urd-Cyd kinase — uridine-cytidine kinase (intracellular metabolic enzymes for azacitidine); dCyd kinase — deoxycytidine kinase (intracellular metabolic enzymes for decitabine)

wynosiła średnio 6–42% w porównaniu z podawaniem *s.c.* [23, 24]. Zważywszy na wyniki badań *in vitro*, nie wydaje się, by w metabolizmie azacytydyny uczestniczyły izoenzymy cytochromu P450 (*CYP isoenzymes*) ani transferazy glutationowej (GST, *glutathione transferase*). Azacytydyna ulega spontanicznej hydrolizie oraz deaminacji przy udziale deaminazy cytydynowej. Średni czas półtrwania azacytydyny wynosi 41–90 minut po podaniu *s.c.* i 40 minut po podaniu *i.v.* [21, 22, 25]. U większości chorych 8 godzin po podaniu azacytydyny jej stężenie we krwi było niewykrywalne [21]. Jest wydalana głównie z moczem.

Decytabina nie wiąże się z białkami. Maksymalne stężenie w surowicy osiąga 2,5 godziny po podaniu *i.v.* Okres półtrwania jest krótki — wynosi około 25 minut. W dotychczasowych badaniach

wykazano, że decytabina nie hamuje ani nie indukuje enzymów cytochromu P450. Dokładna droga jej metabolizmu i eliminacji nie została jeszcze zbadana. Jednym z możliwych sposobów eliminacji jest deaminacja z udziałem deaminazy cytydynowej, która występuje w wątrobie, granulocytach i nabłonku jelit. Nie jest znany wpływ niewydolności nerek i wątroby na farmakokinetykę decytabiny [26].

Skuteczność leków hipometylujących w leczeniu MDS

Skuteczność dużych dawek azacytydyny oceniano po raz pierwszy w badaniach I i II fazy u chorych z nawrotem AML ponad 40 lat temu. Lek stosowano *i.v.* w monoterapii lub w skojarzeniu, w dawkach 150–750 mg/m², uzyskując nietrwale odpowiedzi na poziomie od 0% do 58%. Analiza w podgrupach wykazała wyższą efektywność mniejszych dawek azacytydyny [27–29].

Skuteczność małych dawek azacytydyny w leczeniu chorych na MDS potwierdzono w dwóch randomizowanych, wieloośrodkowych badaniach III fazy. W badaniu CALGB 9221 (*Cancer and Leukemia Group B*) porównano wyniki leczenia chorych za pomocą azacytydyny w dawce 75 mg/m²/dobę (lek podawano przez 7 dni, co 28 dni) z wynikami leczenia objawowego. W grupie badanej dominowali chorzy z grupy ryzyka pośredniego-2 i wysokiego według Międzynarodowego Wskaźnika Rokowniczego (IPSS, *International Prognostic Scoring System*), a mediana wieku chorych wynosiła 68 lat. Odpowiedź na leczenie uzyskano u 60% w grupie leczonej azacytydynam w porównaniu z 5% pacjentów leczonych objawowo ($p < 0,0001$) [4]. Wykazano ponadto wydłużenie czasu do transformacji białaczkowej lub zgonu z 12 do 21 miesięcy po leczeniu azacytydynam ($p = 0,007$), mniejsze zapotrzebowanie na przetoczenia koncentratu krwinek czerwonych (kkcz) i płytkowych (kkp) oraz lepszą jakość życia w tej grupie chorych [30].

W badaniu AZA-001 podawanie azacytydyny porównano z innymi standardowymi metodami leczenia stosowanymi w MDS — intensywną chemioterapią, podawaniem małych dawek cytarabiny oraz leczeniem objawowym. Badaną grupę stanowili chorzy, których mediana wieku wynosiła 69 lat, należący w większości przypadków do grup ryzyka pośredniego-2 i wysokiego według IPSS oraz, zgodnie z systemem klasyfikacji FAB (*French-American-British*), z niedokrwistością oporną na leczenie z nadmiarem blastów, z niedokrwistością oporną na leczenie z nadmiarem blastów w okresie transforma-

cji (obecnie takie osoby są klasyfikowane jako chorujące na AML) oraz z przewlekłą białaczką mielomonocytową. W badaniu wykazano statystycznie znamienne wydłużenie całkowitego przeżycia chorych leczonych azacytydynam w porównaniu z innymi formami terapii — 24,5 miesiąca *versus* 15 miesięcy ($p = 0,0001$) — niezależnie od wieku, odsetka blastów w szpiku i kariotypu [31]. W badaniu potwierdzono także wcześniejsze obserwacje dotyczące opóźnienia progresji do AML, zmniejszenia zapotrzebowania na przetoczenia kkcż i kkp oraz ryzyka zakażeń wśród chorych otrzymujących azacytydynę. Odsetek odpowiedzi całkowitych i częściowych u chorych leczonych azacytydynam wyniósł 29%, a w grupie leczonej standardowo — 12%. Odsetek chorych, u których nastąpiła poprawa hematologiczna, w wyżej wymienionych grupach wyniósł odpowiednio 49% i 29%. Należy podkreślić, że odsetek odpowiedzi w podgrupie chorych leczonych intensywną chemioterapią wynosił 40% i był wyższy niż u pacjentów leczonych azacytydynam (29%). Nie wpłynęło to jednak na wydłużenie przeżycia chorych leczonych intensywną chemioterapią w porównaniu z leczonymi azacytydynam — 15,7 miesiąca *versus* 25,1 miesiąca (różnica nieznamienna statystycznie). Lek jest obecnie zaaprobowany do leczenia chorych na MDS przez Agencję ds. Żywności i Leków (FDA, *Food and Drug Administration*) w Stanach Zjednoczonych oraz przez Europejską Agencję ds. Leków (EMA, *European Medicines Agency*) w Unii Europejskiej. Wskazania do leczenia azacytydynam przedstawiono w tabeli 1. Trwają również badania nad czynnikami predykcyjnymi odpowiedzi na azacytydynę (tab. 2).

Grupa Frankofońska ds. MDS przedstawiła dane dotyczące największej grupy 282 chorych leczonych azacytydynam [32]. Niższy odsetek odpowiedzi na to leczenie uzyskiwali chorzy, którzy wcześniej byli leczeni małymi dawkami cytarabiny, którzy mieli nieprawidłowy kariotyp oraz ci, u których odsetek blastów w szpiku przekraczał 15%. Ta sama grupa badaczy opracowała indeks prognostyczny u chorych leczonych azacytydynam (tab. 3, 4). Najgorsze rokowanie dotyczyło pacjentów, u których stwierdzano: ECOG równe 2 lub więcej, zmiany cytogenetyczne o niekorzystnym rokowaniu, zależność od przetoczeń kkcż (> 4 j. kkcż/8 tygodni), obecność blastów we krwi obwodowej.

W badaniach I i II fazy w latach 90. ubiegłego wieku decytabinę stosowano również w dużych dawkach (500–750 mg/m²/d. przez 3 dni), co pozwoliło na uzyskanie odpowiedzi zaledwie u 6% chorych z oporną lub nawrotową AML, przy jednoczesnym występowaniu znacznych powikłań terapii [9].

Tabela 1. Wskazania do leczenia azacytydyną w MDS

Table 1. Indications for azacitidine therapy in MDS

Wskazania do leczenia azacytydyną dotyczą dorosłych chorych niekwalifikujących się do allo-HSCT z następującymi postaciami MDS:

- MDS o pośrednim-2 i wysokim ryzyku wg IPSS
- przewlekła białaczka mielomonocytoza z obecnością 10–29% blastów w szpiku, bez cech choroby mieloproliferacyjnej
- AML z 20–30% blastów i wieloliniową dysplazją, zgodnie z klasyfikacją WHO

MDS (*myelodysplastic syndrome*) — zespół mielodysplastyczny; allo-HSCT (*allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*) — allogeniczne przeszczepienie krwiotwórczych komórek macierzystych; IPSS (*International Prognostic Scoring System*) — Międzynarodowy System Prognostyczny; AML (*acute myeloid leukemia*) — ostra białaczka szpikowa; WHO (*World Health Organization*) — Światowa Organizacja Zdrowia

Tabela 2. Czynniki predykcyjne i prognostyczne odpowiedzi na leczenie oraz czasu przeżycia u chorych na zespoły mielodysplastyczne leczonych azacytydyną

Table 2. Predictive and prognostic factors for response and survival in patients with myelodysplastic syndrome on azacitidine treatment

Czynniki predykcyjne	Piśmiennictwo
Stan ogólny wg ECOG	Itzykson i wsp. [32]
Zależność od przetoczeń kkcż	Itzykson i wsp. [32]
Blasty we krwi obwodowej i szpiku	Itzykson i wsp. [32]
Ryzyko cytogenetyczne	Itzykson i wsp. [32]
Mutacja TET2	Itzykson i wsp. [33]
Ekspresja STAT3 i STAT5	Miltiades i wsp. [34]
Stężenie LDH	Moon i wsp. [35]
Podwojenie liczby płytek po 1 cyklu azacytydyny	Helm i wsp. [36]
Wcześniejsze leczenie małymi dawkami cytarabiny	Itzykson i wsp. [32]

ECOG — *Eastern Cooperative Study Group*; kkcż — koncentrat krwinek czerwonych; LDH (*lactate dehydrogenase*) — dehydrogenaza kwasu mlekowego

Tabela 3. Indeks prognostyczny Grupy Frankofońskiej ds. MDS (GFM) u chorych na zespoły mielodysplastyczne leczonych azacytydyną

Table 3. Prognostic index according to the Groupe Francophone des Myelodysplasies (GFM) in patients with myelodysplastic syndrome on azacitidine treatment

Czynnik prognostyczny	Punktacja
ECOG \geq 2	1
Ryzyko cytogenetyczne — średnie wg IPSS	1
Ryzyko cytogenetyczne — wysokie wg IPSS	2
Obecność blastów we krwi obwodowej	1
Zależność od przetoczeń kkcż \geq 4 j./8 tygodni	1

ECOG — *Eastern Cooperative Study Group*; IPSS — (*International Prognostic Scoring System*) — Międzynarodowy Wskaźnik Rokowniczy; kkcż — koncentrat krwinek czerwonych

Tabela 4. Mediana czasu przeżycia chorych na zespoły mielodysplastyczne leczonych azacytydyną według Grupy Frankofońskiej ds. MDS (GFM)

Table 4. Median survival of patients with myelodysplastic syndrome on azacitidine treatment according to the Groupe Francophone des Myelodysplasies (GFM)

Liczba punktów wg indeksu GFM	Mediana czasu przeżycia
0	Nieosiągnięta
1–3	15 miesięcy
4–5	6,1 miesiąca

Efektywność decytabiny zastosowanej w małych dawkach w leczeniu MDS potwierdzają wyniki badań II i III fazy. Skuteczność leku podanego *i.v.* w dawce 3 razy po 15 mg/m² przez kolejne 3 dni co 6 tygodni porównano z leczeniem objawowym

u chorych na MDS z grup ryzyka pośredniego niskiego, pośredniego wysokiego i wysokiego według IPSS. Wykazano wyższy odsetek odpowiedzi hematologicznej w grupie leczonej decytabiną w porównaniu z leczonymi objawowo (30% *v.* 0%; $p < 0,001$). Stwierdzono ponadto, że leczenie decytabiną niezamiennie wydłuża czas do progresji do AML (12,1 *v.* 7,8 miesiąca; $p = 0,19$) [5]. W analizie przeprowadzonej w 2006 roku badano różne dawki decytabiny i różne metody podawania leku chorym na MDS: 20 mg/m² *i.v.* przez 5 dni; 20 mg/m² *s.c.* przez 5 dni lub 10 mg/m² *i.v.* przez 10 dni. Najwyższy odsetek odpowiedzi hematologicznych uzyskano w grupie otrzymującej decytabinę w dawkach 20 mg/m² *i.v.* [37]. Dotychczas nie wykazano wpływu tego leku na przeżycie chorych na MDS. Decytabina jest zaaprobowana do leczenia chorych na MDS w Stanach Zjednoczonych.

Inne działania leków hipometylujących

Niewątpliwie ważnym zagadnieniem, intensywnie badanym w ostatnich latach, jest pośredni i bezpośredni wpływ leków hipometylujących na układ immunologiczny. Wykazano, że azanukleozydy, indukując różnicowanie komórek białaczkowych, zwiększają ekspresję antygenów HLA-DR i antygenów białaczkowych na ich powierzchni, co może stymulować układ immunologiczny. U chorych po allogenicznym przeszczepieniu krwiotwórczych komórek macierzystych przeprowadzonym z powodu AML lub MDS azacytydyna, zastosowana w ramach terapii podtrzymującej lub w leczeniu nawrotu, wykazuje zdolność indukcji biologicznego efektu „przeszczep przeciwko białaczce” (GvL, *graft versus leukemia*) przy udziale limfocytów T dawcy [38]. Odsetek obserwowanych odpowiedzi sięga około 50%, ale należy dodać, że analizy dotyczyły małych grup chorych [39–42]. Ostatnie badania wskazują ponadto na niezależny wpływ azacytydyny na układ immunologiczny w odniesieniu do proliferacji i aktywacji regulatorowych limfocytów T [43, 44].

Przyszłość leków hipometylujących

Leki hipometylujące, jako terapia epigenetyczna, otwierają nowe możliwości terapeutyczne w odniesieniu do nowotworów hematologicznych, a w szczególności MDS i AML. Leki te są skuteczne w monoterapii, a także w leczeniu skojarzonym z inhibitorami deacetylazy histonowej i lekami immunomodulującymi [45, 46]. Charakteryzują się korzystnym profilem bezpieczeństwa i dobrą tole-

rancją, co umożliwia prowadzenie terapii bez konieczności długotrwałej hospitalizacji, a formy dostaw leków dodatkowo ten proces ułatwią [9].

Identyfikacja zaburzeń molekularnych leżących u podstaw zmian epigenetycznych może pomóc w przewidywaniu odpowiedzi na terapię stosowaną u chorych na MDS i AML, i takie właśnie są kierunki prowadzonych obecnie badań [16].

Piśmiennictwo

1. Esteller M. Cancer epigenomics DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat. Rev. Genet.* 2007; 8: 286–298.
2. Quesnel B., Guillem G., Verecque R. i wsp. Methylation of the p15(INK4b) gene in myelodysplastic syndromes is frequent and acquired during disease progression. *Blood* 1998; 91: 2985–2990.
3. Jiang Y., Dunbar A., Gondek L.P. i wsp. Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. *Blood* 2009; 113: 1315–1325.
4. Silverman L.R., Demakos E.P., Peterson B.L. i wsp. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group Br. *J. Clin. Oncol.* 2002; 20: 2429–2440.
5. Kantarjian H., Issa J.P., Rosenfeld C.S. i wsp. Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study. *Cancer* 2006; 106: 1794–1803.
6. Stresemann C., Brueckner B., Musch T., Stopper H., Lyko F. Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines. *Cancer Res.* 2006; 66: 2794–2800.
7. Chuang J.C., Yoo C.B., Kwan J.M. i wsp. Comparison of biological effects of non-nucleoside DNA methylation inhibitors versus 5-aza-2'-deoxycytidine. *Mol. Cancer Ther.* 2005; 4: 1515–1520.
8. Sorm F., Piskala A., Cihak A., Vesely J. 5-azacytidine, a new, highly effective cancerostatic. *Experientia* 1964; 20: 202–203.
9. Issa J.P., Garcia-Manero G., Giles F.J. i wsp. Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies. *Blood* 2004; 103: 1635–1640.
10. Jones P.A., Taylor S.M. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell.* 1980; 20: 85–93.
11. Stresemann C., Bokelmann I., Mahlknecht U., Lyko F. Azacitidine causes complex DNA methylation responses in myeloid leukemia. *Mol. Cancer Ther.* 2008; 7: 2998–3005.
12. Mund C., Hackanson B., Stresemann C., Lubbert M., Lyko F. Characterization of DNA demethylation effects induced by 5-Aza-2'-deoxycytidine in patients with myelodysplastic syndrome. *Cancer Res.* 2005; 65: 7086–7090.
13. Mund C., Brueckner B., Lyko F. Reactivation of epigenetically silenced genes by DNA methyltransferase inhibitors: basic concepts and clinical applications. *Epigenetics* 2006; 1: 7–13.
14. Christman J., Mendelsohn N., Herzog D. i wsp. Effect of 5-azacytidine on differentiation and DNA methylation in human promyelocytic leukemia cells (HL-60). *Cancer Res.* 1983; 43: 763–769.
15. Komashko V.M., Farnham P.J. 5-azacytidine treatment reorganizes genomic histone modification patterns. *Epigenetics* 2010; 5 (3).
16. Stresemann C., Lyko F. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacitidine and decitabine. *Int. J. Cancer* 2008; 123: 8–13.

17. Kim M., Oh B., Kim S.Y. i wsp. p15INK4b methylation correlates with thrombocytopenia, blast percentage, and survival in myelodysplastic syndromes in a dose dependent manner: quantitation using pyrosequencing study. *Leuk. Res* 2010; 34: 718–722.
18. Musch T., Oz Y., Lyko F., Breillig A. Nucleoside drugs induce cellular differentiation by caspase-dependent degradation of stem cell factors. *PlosOne* 2010; 5: 1–15.
19. Lopez-Karpowitch O., Barralez-Benitez O., Flores M., Piedras J. Effect of azacytidine in the release of leukemia inhibitory factor, oncostatin M, interleukin 6 and interleukin 11 by mononuclear cells of patients with refractory anemia. *Cytokine* 2002; 20: 154–162.
20. Olivieri N., Sauntharajah Y., Thayalasuthan V. i wsp. A pilot study of subcutaneous decitabine in β -thalassemia intermedia. *Blood* 2011; 118: 2708–2711.
21. Rudek M., Zhao M., He P. i wsp. Pharmacokinetics of 5 azacitidine administered with phenylbutyrate in patients with refractory solid tumors or hematologic malignancies. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23: 3906–3911.
22. Lomen P.L., Baker L., Neil G., Samson M.K. Phase I study of 5-azacitidine using 24-hour continuous infusion for 5 days. *Cancer Chemother. Rep.* 1975; 59: 1123–1126.
23. Uchida T., Ogawa Y., Kobayashi Y. i wsp. Phase I and II study of azacitidine in Japanese patients with myelodysplastic syndromes. *Cancer Sci.* 2011; 102: 1680–1686.
24. Garcia-Manero G., Gore S., Cogle C. i wsp. Phase I study of oral azacitidine in myelodysplastic syndromes, chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2011; 20: 2521–2527.
25. Garcia-Manero G., Gore S., Cogle C., Jabbour J., Kantarjian H., Skikne B. Evaluation of oral azacitidine using extended treatment schedules: a phase I study. *Blood* 2010; 116: abstrakt 603.
26. Blum K., Liu Z., Lucas D. i wsp. Phase I of low dose decitabine targeting DNA hypermethylation in patients with chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphoma: dose-limiting myelosuppression without evidence of DNA hypomethylation. *Br. J. Hem.* 2010; 150: 189–195.
27. Goldberg J., Gryn J., Raza A. i wsp. Mitoxantrone and 5-azacytidine for refractory/relapsed ANLL or CML in blast crisis: a leukemia intergroup study. *Am. J. Hematol.* 1993; 43: 286–290.
28. Saiki J.H., Bodey G.P., Hewlett J.S. i wsp. Effect of schedule on activity and toxicity of 5-azacytidine in acute leukemia: a Southwest Oncology Group Study. *Cancer* 1981; 47: 1739–1742.
29. Vogler W.R., Miller D.S., Keller J.W. 5-azacytidine (NSC 102816): a new drug for the treatment of myeloblastic leukemia. *Blood* 1976; 48: 331–337.
30. Kornblith A.B., Herndon J.E., Silverman L.R. i wsp. Impact of azacytidine on the quality of life of patients with myelodysplastic syndrome treated in a randomized phase III trial: a Cancer and Leukemia Group B study. *J. Clin. Oncol.* 2002; 20: 2441–2452.
31. Fenaux P., Mufti G.J., Hellstrom-Lindberg E. i wsp. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol.* 2009; 10: 223–232.
32. Itzykson R., Thepot S., Quesnel B. i wsp. Prognostic factors for response and overall survival in 282 patients with higher-risk myelodysplastic syndromes treated with azacitidine. *Blood* 2011; 117: 403–411.
33. Itzykson R., Kosmider O., Cluzeau P. i wsp. Prevalence of TET2 mutation predicts a higher response to azacitidine in MDS and AML post MDS. *Blood* 2010; 116: abstrakt 439.
34. Miltiades P., Bouchliou I., Nakou E. i wsp. Alterations in the signaling profile of leukemic progenitors can predict the response of myelodysplastic syndrome patients to azacitidine. *Blood* 2010; 116: abstrakt 2921.
35. Moon J., Kim S., Kang B. i wsp. Predictive value of pretreatment risk group and baseline LDH levels in MDS patients receiving azacitidine treatment. *Ann. Hematol.* 2010; 89: 681–689.
36. van der Helm L.H., Alhan C., Wijermans P. i wsp. Platelet doubling after the first azacitidine cycle is a promising predictor for response in myelodysplastic syndromes, chronic myelomonocytic leukaemia and acute myeloid leukemia patients in the Dutch azacitidine compassionate named patient programme. *Br. J. Hematol.* 2011; 155: 599–606.
37. Kantarjian H., Oki Y., Garcia-Manero G. i wsp. Results of a randomized study of 3 schedules of low-dose decitabine in higher-risk myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 2007; 109: 52–57.
38. Jabbour E., Giralt S., Kantarjian H. i wsp. Low-dose azacitidine after allogeneic stem cell transplantation for acute leukemia. *Cancer* 2009; 115: 1899–1905.
39. Vigil C.E., Martin-Santos T., Garcia-Manero G. Safety and efficacy of azacitidine in myelodysplastic syndromes. *Drug Des. Devel. Ther.* 2010; 4: 221–229.
40. Platzbecker U., Wermke M., Radke J. i wsp. Azacitidine for treatment of imminent relapse in MDS or AML patients after allogeneic HSCT: results of the RELAZA trial. *Leukemia* 2012; 26: 381–389.
41. Lubbert M., Bertz H., Wasch R. i wsp. Efficacy of a 3-day, low-dose treatment with 5-azacytidine followed by donor lymphocyte infusions in older patients with acute myeloid leukemia or chronic myelomonocytic leukemia relapsed after allografting. *Bone Marrow Transplant.* 2010; 45: 627–632.
42. de Lima M., Giralt S., Thall P.F. i wsp. Maintenance therapy with low-dose azacitidine after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for recurrent acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome: a dose and schedule finding study. *Cancer* 2010; 116: 5420–5431.
43. Tang K.F., He C.X., Zeng G.L. i wsp. Induction of MHC class I-related chain B (MICB) by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008; 370: 578–583.
44. Sanchez-Abarca L.I., Gutierrez-Cosio S., Santamaria C. i wsp. Immunomodulatory effect of 5-azacytidine (5-azaC): potential role in the transplantation setting. *Blood* 2011; 115: 107–121.
45. Raffoux E., Cras A., Recher C. i wsp. Phase 2 clinical trial of 5-azacitidine, valproic acid, and all-trans retinoic acid in patients with high-risk acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome. *Oncotarget* 2010; 1: 34–42.
46. Raza A., Mehdi M., Mumtaz M., Ali F., Lascher S., Galili N. Combination of 5-azacytidine and thalidomide for the treatment of myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Cancer* 2008; 113: 1596–1604.