

ผลทางเภสัชพลศาสตร์ของยากุ่มภูมิคุ้มกันบำบัดต่อเอนไซม์ไซโตโครม พี 450
ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงของมนุษย์


1. นางสาวภัชพร ทรัพย์ศรี 6036755933
2. นางสาวสิมิลัน ไชโย 6036782833
3. นางสาวอันนา เห็นชอบ 6036797233



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

โครงการปริญญาโทนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
เภสัชศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาการบริหารทางเภสัชกรรม
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2564

Pharmacodynamic effects of immunotherapeutic antibodies on
cytochrome P450 in human hepatoma cells

- 
1. Miss Patcharaporn Subsri 6036755933
 2. Miss Similan Chaiyo 6036782833
 3. Miss Anna Henchob 6036797233

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

A Senior Project Submitted in Partial Fulfillment of the
Requirement
for the Doctor of Pharmacy Program in Pharmaceutical Care
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2021

หัวข้อโครงการปริญญาโท

ผลทางเภสัชพลศาสตร์ของยากลุ่มภูมิคุ้มกัน
บำบัดต่อเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในเซลล์
ตับเพาะเลี้ยงของมนุษย์

นิสิตผู้ดำเนินโครงการ

นางสาวภัชพร ทรัพย์ศรี
นางสาวสมิลา ไชโย
นางสาวอรรษา เห็นชอบ

สาขาวิชา/ภาควิชา

การบริหารทางเภสัชกรรม /เภสัชวิทยาและ
สรีรวิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาโท

อาจารย์ เภสัชกร ดร.นนท์ธเนศ นลินรัตน์

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้โครงการปริญญาโทฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต

พรอนงค์ อร่ามวิทย์

..... คณบดี

(ศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.พรอนงค์ อร่ามวิทย์)

ดร.ฉัตรชัย เชาว์ธรรม

..... รองคณบดีฝ่ายวิชาการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เภสัชกร ดร.ฉัตรชัย เชาว์ธรรม)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

นนท์ธเนศ นลินรัตน์

..... อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาโท

(อาจารย์ เภสัชกร ดร.นนท์ธเนศ นลินรัตน์)

บทคัดย่อปริญาานิพนธ์

ชื่อโครงการ : ผลทางเภสัชพลศาสตร์ของยากลุ่มภูมิคุ้มกันบำบัดต่อเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงของมนุษย์

หัวหน้าโครงการ : นางสาวภัชพร ทรัพย์ศรี 6036755933

ผู้ร่วมโครงการ : นางสาวสิมิลัน ไชโย 6036782833

: นางสาวอันนา เห็นชอบ 6036797233

อาจารย์ที่ปรึกษา : อ.ภก.ดร.นนท์ธเนศ นลินรัตน์

สาขา/ภาควิชา : การบริหารทางเภสัชกรรม/เภสัชวิทยาและสรีรวิทยา

จากการค้นพบโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันในการกำจัดมะเร็ง ซึ่งได้นำไปสู่วิทยาการรักษารูปแบบภูมิคุ้มกันบำบัดมะเร็ง (Cancer immunotherapy) โดยเฉพาะกลุ่มยาที่สามารถยับยั้งโปรตีนimmune checkpoint (Immune Checkpoint Inhibitors; ICIs) ซึ่งในปัจจุบันมียาในกลุ่มนี้หลายชนิดที่ได้รับการอนุมัติให้ใช้ในมนุษย์ และแนะนำให้ใช้เป็นยา first-line drug ในการรักษามะเร็งหลาย ๆ ชนิด อย่างไรก็ตามเนื่องจากยาในกลุ่มนี้ทั้งเป็นยาชีววัตถุ การศึกษาถึงผลโดยตรงของยากลุ่ม ICIs ต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกหรือการทำงานของเอนไซม์ CYPs ดังเช่นตัวยาเคมีนั้นยังมีอยู่อย่างจำกัดดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาถึงผลทางเภสัชพลศาสตร์ของยากลุ่ม ICIs ต่อเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงของมนุษย์ โดยศึกษาผลของไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาจากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวของมนุษย์ (human peripheral blood mononuclear cells; PBMCs) ที่ได้รับยาแอนติบอดี Pembrolizumab ในสภาวะที่บ่มร่วมกับเซลล์ซึ่งมีการแสดงออกของโปรตีนชนิด PD-L1 บนผิวเซลล์ และยืนยันระดับของไซโตไคน์ IFN γ และ IL-2 ที่หลั่งออกมาด้วยเทคนิค ELISA หลังจากนั้นจึงนำไปบ่มกับเซลล์ตับเพาะเลี้ยงของมนุษย์ชนิด HepG2 และวัดระดับการแสดงออกของเอนไซม์ CYPs แต่ละชนิดด้วยเทคนิค real time Polymerase chain reaction (PCR) โดยเทียบระหว่างกลุ่มที่ได้รับยาแอนติบอดีกับกลุ่มควบคุมที่เหมาะสม และเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมบวกที่ประกอบด้วย human recombinant IFN γ หรือ IL-2 โดยจากผลการศึกษาพบว่าไซโตไคน์ที่เป็นผลมาจากการให้ยา Pembrolizumab จะไปมีผลลดการแสดงออกในระดับ mRNA ของ CYP1A2 และ CYP3A4 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และระดับ CYP2C8 มีแนวโน้มลดลง ขณะที่ CYP2C9 และ CYP2C19 นั้นไม่มีการเปลี่ยนแปลง ซึ่งข้อมูลจากการศึกษานี้จะเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่แสดงถึงผลโดยอ้อมทางเภสัชพลศาสตร์ของยากลุ่ม ICIs ที่อาจส่งผลต่อการเกิดอันตรกิริยาต่อดัวยาเคมีอื่นซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อศึกษาผลที่มีต่อการให้ยาร่วมกันทางคลินิก เพิ่มเติม หรือติดตามผลในผู้ป่วยที่มีการใช้ยา ICIs ร่วมกับยาชนิดอื่น ๆ ได้

คณะเภสัชศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ภัชพร ทรัพย์ศรี

นนท์ธเนศ นลินรัตน์

Abstract

Senior project title : Pharmacodynamic effects of immunotherapeutic antibodies on cytochrome P450 in human hepatoma cells

Students' name : Miss Patcharaporn Subsri 6036755933
: Miss Similan Chaiyo 6036782833
: Miss Anna Henchob 6036797233

Advisor/Co-advisor : Nonthaneth Nalinratana, Ph.D.

Field/Department : Pharmaceutical Care/ Pharmacology and Physiology

The discovery of immune checkpoint molecules on the cell surface which can inhibit the immune functions in eliminating the tumor cells could lead to the development on the cancer immunotherapy approach. Immune checkpoint inhibitors (ICIs) are the class of drugs that have been approved for human use and recommended to be the first-line drugs in treating many cancer types. However, since all of ICIs are now therapeutic proteins, the effects of ICIs on hepatic enzymes are still limited, compared the small molecule chemicals. Therefore, this study aims to examine the pharmacodynamic effect of ICIs on cytochrome P450 in cultured human hepatic cells. Pembrolizumab, anti-PD1 was incubated with human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and further co-cultured with PD-L1 expressing CHO cells (CHO-PDL1). Released cytokines in conditioned medium were examined using ELISA assays showing that the levels of IFN γ and IL-2 were increased when compared to non-treated PBMCs. The effects of cytokines on cytochrome P450 enzyme expression were performed by incubation of conditioned medium with cultured human hepatic HepG2 cells and mRNA levels of each CYP enzyme were determined by using real time polymerase chain reaction technic in comparison to those that receive antibody and the appropriate control group. The results showed that conditioned medium from Pembrolizumab-treated PBMCs exhibited a statistically significant diminishment in the mRNA expression levels of CYP1A2 and CYP3A4, as well as CYP2C8, which has the same tendency. Meanwhile, the levels of CYP2C9 and CYP2C19 remained unchanged. These results suggested that the drugs which are the substrates of CYP1A2, CYP3A4, and CYP2C8 might be affected when given together. The findings of this study provide the information on possible indirect pharmacodynamic effects of ICIs which may cause drug interaction to other chemical drugs. Hence, it could be applied to further study the concomitant medications in clinical uses or to follow up with patients who use ICIs with other medications.

Faculty of Pharmaceutical Sciences Student's signature Patcharaporn Subsri

Chulalongkorn University Advisor's signature Nonthaneth Nalinratana

คำนำ

โครงการปริญญาโทฉบับนี้จัดทำขึ้นโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลทางเภสัชพลศาสตร์ของยากุ่ม ภูมิคุ้มกันบำบัดชนิด Immune checkpoint inhibitors ต่อเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงของมนุษย์ โดยศึกษาผลของยาแอนติบอดี Pembrolizumab ต่อการสร้างไซโตไคน์ ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวของมนุษย์ (PBMCs) และศึกษาผลของไซโตไคน์ต่อการแสดงออกของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงของมนุษย์ โดยวัดระดับการแสดงออกของเอนไซม์ CYP แต่ละชนิดด้วยเทคนิค real time Polymerase chain reaction (PCR)

ทางคณะผู้วิจัยโครงการปริญญาโทคาดหวังเป็นอย่างยิ่งว่าปริญญาโทฉบับนี้จะมีประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจศึกษาเรื่องนี้ต่อไปหากมีข้อผิดพลาดประการใด ทางคณะผู้วิจัยโครงการปริญญาโทขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย



คณะผู้วิจัย

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาโครงการปริญญาโทนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ อ.ภก.ดร.นนท์ธเนศ นลินรัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่กรุณาให้คำแนะนำทางด้านระเบียบวิธี การดำเนินการวิจัย การวิเคราะห์ข้อมูล และการสรุปผล ช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของโครงการนี้ให้สมบูรณ์ถูกต้อง ตลอดจนให้ความรู้และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อโครงการนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยาที่กรุณาให้ความสะดวกในการทำโครงการ



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
คำนำ.....	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ซ
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	8
1.3 กรอบแนวความคิดการวิจัย.....	8
2 ปรีทศน์วรรณกรรม.....	10
2.1 Programmed cell death protein 1 (PD-1)/Programmed cell death-ligand 1 (PD-L1).....	10
2.2 การรักษาโดยใช้แอนติบอดี (Antibody Therapy).....	11
2.3 Pembrolizumab.....	11
2.3.1 ข้อบ่งใช้ของ Pembrolizumab.....	12
2.3.2 คุณสมบัติทางเภสัชพลศาสตร์ (Pharmacodynamics).....	12
2.3.3 คุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ (Pharmacokinetics).....	12
2.3.4 การกระจายตัวของยา (Distribution).....	13
2.3.5 การขจัดยาออกจากร่างกาย (Elimination).....	13
2.3.6 อาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ Pembrolizumab.....	13
2.4 Interleukins (ILs) และ Interferon-gamma (IFN- γ).....	13
2.4.1 Interleukin-2 (IL-2).....	13
2.4.2 Interferon-gamma (IFN- γ).....	14
2.5 เอนไซม์ไซโตโครม พี 450 (Cytochrome P450).....	15
2.6 Immune-related adverse events (irAEs).....	20
2.6.1 กลไกการเกิด Immune-related adverse events (irAEs).....	21

3	วิธีดำเนินการวิจัย.....	24
3.1	รูปแบบการวิจัย.....	24
3.2	อุปกรณ์ ยา และสารเคมีที่ใช้.....	24
3.2.1	อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....	24
3.2.2	ยาที่ใช้ในการวิจัย.....	24
3.2.3	สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	24
3.3	กลุ่มการทดลอง.....	25
3.3.1	การศึกษาผลของยาต่อการสร้างไซโตไคน์ในเซลล์เม็ดเลือดขาว.....	25
	ชนิดนิวเคลียสเดียวของมนุษย์	
3.3.1.1	การสร้าง IFN γ	25
3.3.1.2	การสร้าง IL-2	25
3.3.2	การศึกษาผลของไซโตไคน์ต่อการแสดงออกของเอนไซม์ไซโตโครม.....	25
	พี 450 ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงของมนุษย์	
3.3.2.1	การศึกษาผลโดยตรงของยาแอนติบอดี pembrolizumab	25
	ต่อการแสดงออกของ CYPs mRNA	
3.3.2.2	การศึกษาผลของอาหารเพาะเลี้ยงส่วนใสจาก PBMCs.....	26
	ที่ได้รับPembrolizumab ต่อการแสดงออกของ CYPs mRNA ในเซลล์HepG2	
3.4	ขั้นตอนการวิจัย.....	26
3.4.1	การศึกษาผลของยาต่อการสร้างไซโตไคน์ในเซลล์เม็ดเลือดขาว.....	26
	ชนิดนิวเคลียสเดียวของมนุษย์	
3.4.2	การศึกษาผลของไซโตไคน์ต่อการแสดงออกของเอนไซม์ไซโตโครม	26
	พี 450 ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงของมนุษย์	
3.5	สถิติและการวิเคราะห์ข้อมูล.....	27
4	ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	28
4.1	ผลวิเคราะห์ปริมาณการสร้างไซโตไคน์ในเซลล์เม็ดเลือดขาว.....	28
	ชนิดนิวเคลียสเดียวของมนุษย์	
4.2	ผลของไซโตไคน์ต่อการแสดงออกของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450.....	29
	ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงของมนุษย์	
5	อภิปรายผลการศึกษา สรุปผล และข้อเสนอแนะ.....	31
5.1	อภิปรายผลการศึกษา.....	31
5.2	สรุปผล.....	31
5.3	ข้อจำกัด.....	33

5.4 ข้อเสนอแนะ.....	33
รายการอ้างอิง.....	34



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงผลของไซโตโคร์ต่อการทำงานของเอนไซม์ CYPs แต่ละชนิด.....	5
ตารางที่ 2 แสดงตัวอย่าง CYP substrates.....	5
ตารางที่ 3 แสดงตัวอย่างยา, เอนไซม์ CYPs ที่ใช้ในการเมแทบอลิซึมยาและอาการไม่พึง ประสงค์จากการใช้ยา	15
ตารางที่ 4 แสดงระดับความรุนแรงของการเกิด irAEs.....	21
ตารางที่ 5 แสดงระบบอวัยวะ, อาการ และระยะเวลาที่เริ่มแสดงอาการ.....	21
ตารางที่ 6 แสดงตัวอย่างยาที่มีการใช้ในทางคลินิกซึ่งเป็น substrates ของเอนไซม์ CYPs ในมนุษย์	32



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 แสดงอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งของผู้ป่วยรายใหม่ในปี 2020 ของผู้ป่วยมะเร็งทุกชนิด..... 1	
ทั้งเพศหญิงและเพศชายในทุกช่วงอายุ	
รูปที่ 2 แสดงจำนวนผู้ป่วยรายใหม่ทั่วโลกของมะเร็งแต่ละชนิดที่พบได้บ่อยในปี 2020..... 2	
รูปที่ 3 แสดงจำนวนผู้ป่วยรายใหม่ในประเทศไทยของมะเร็งแต่ละชนิดในปี 2020.....2	
รูปที่ 4 แสดงกลไกการทำงานของยาแอนติบอดี Pembrolizumab ซึ่งเป็นยาที่ไปยับยั้ง..... 7	
การจับกันระหว่าง PD-1 และ PD-L1 โดยมีเป้าหมายอยู่ที่ PD-1 ที่อยู่บนผิว T cells	
รูปที่ 5 แสดงกรอบแนวความคิดการวิจัย..... 9	
รูปที่ 6 แสดงการจับกันระหว่าง PD-1 กับ PD-1 inhibitors และ PD-L1 กับ PD-L1 inhibitors.... 11	
รูปที่ 7 แสดงการสร้าง IFN γ 28	
รูปที่ 8 แสดงการสร้าง IL-2 29	
รูปที่ 9 แสดงผลโดยตรงของยาแอนติบอดี pembrolizumab ต่อการแสดงออกของ 30	
CYPs mRNA โดยการนำ pembrolizumab มาบ่มกับเซลล์ HepG2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	
และนำไปวิเคราะห์การแสดงออกของ CYPs mRNA	
รูปที่ 10 แสดงผลของอาหารเพาะเลี้ยงส่วนใสจาก PBMCs ที่ได้รับ Pembrolizumab 30	
ต่อการแสดงออกของ CYPs mRNA ในเซลล์ HepG2	

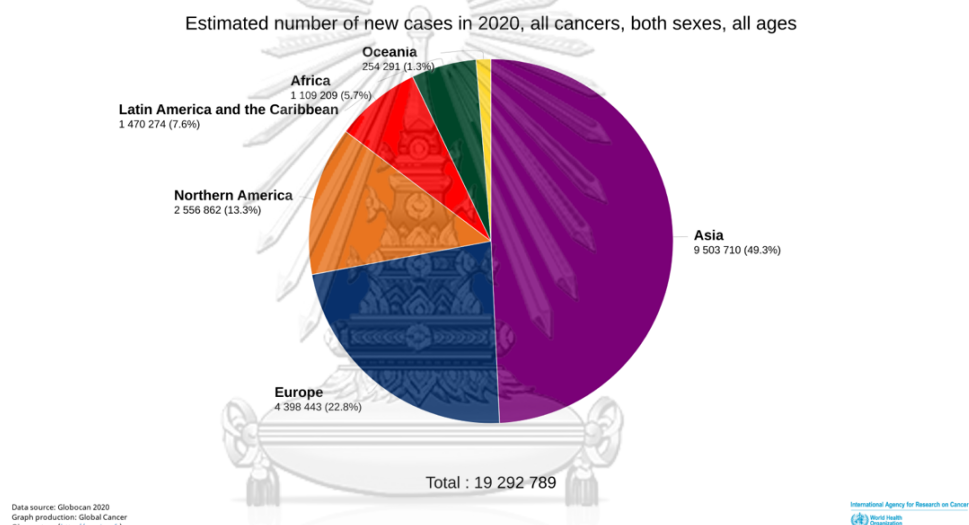
บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

มะเร็งเป็นกลุ่มโรคที่มีการสร้างเซลล์ที่ผิดปกติให้เจริญเติบโตออกนอกขอบเขตได้อย่างรวดเร็ว ทำให้ลุกลามไปสู่บริเวณข้างเคียงและแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่น โดยเรียกกระบวนการแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่น ๆ นี้ว่า metastasis ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการเสียชีวิตจากมะเร็ง⁽¹⁾

โดยข้อมูลจากองค์การอนามัยโลก (World Health Organization) พบว่าในปี 2020 มีอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งของผู้ป่วยรายใหม่ในเอเชียมากที่สุด คือ 49.3 % รองลงมาคือยุโรป 22.8%, อเมริกาเหนือ 13.3%, ละตินอเมริกาและแคริบเบียน 7.6%, แอฟริกา 5.7% และโอเชียเนีย 1.3% (รูปที่ 1)

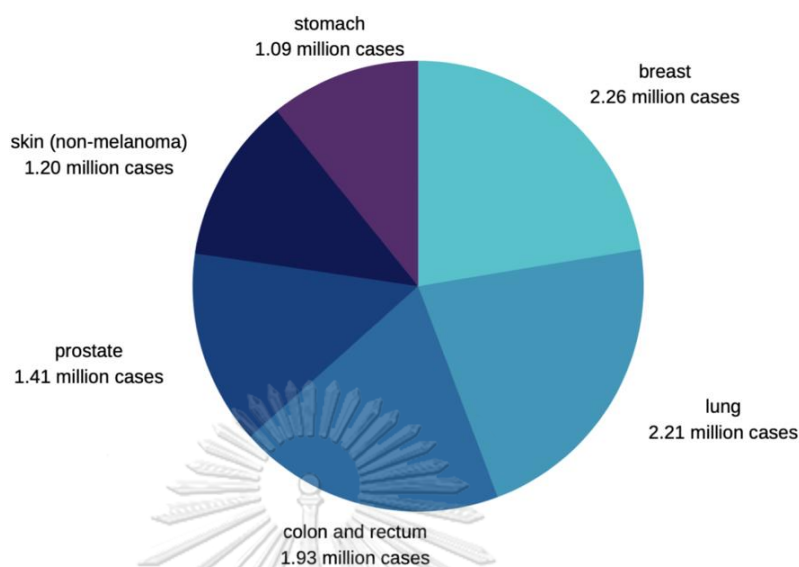


รูปที่ 1 แสดงอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งของผู้ป่วยรายใหม่ในปี 2020 ของผู้ป่วยมะเร็งทุกชนิด ทั้งเพศหญิงและเพศชายในทุกช่วงอายุ⁽²⁾

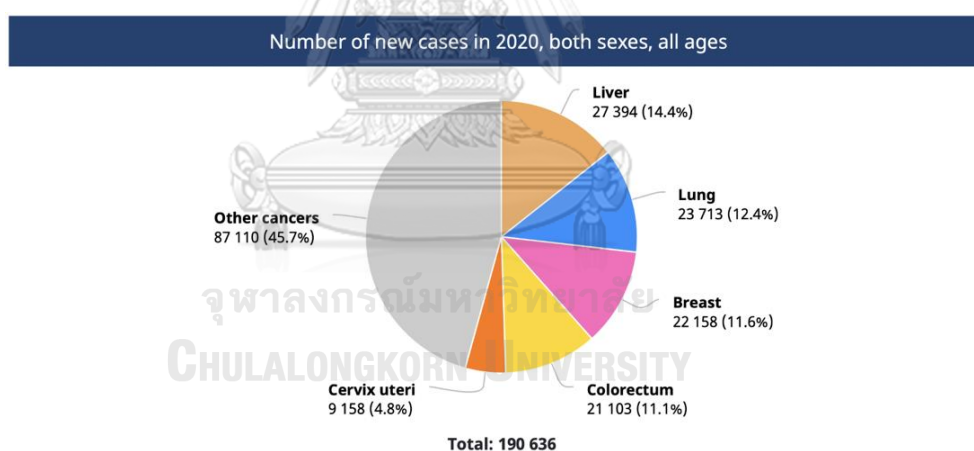
มะเร็งเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตของประชากรโลกเกือบ 10 ล้านคนในปี 2020 โดยมะเร็งชนิดที่พบได้บ่อย ได้แก่ มะเร็งเต้านม มะเร็งปอด มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก มะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งผิวหนัง และมะเร็งกระเพาะอาหาร (รูปที่ 2)

โดยผู้ป่วยมะเร็งรายใหม่ในประเทศไทย ในปี 2020 มีจำนวน 190,636 ราย แบ่งออกเป็น มะเร็งตับ 14.4%, มะเร็งปอด 12.4%, มะเร็งเต้านม 11.6%, มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก 11.1%, มะเร็งปากมดลูก 4.8% และมะเร็งชนิดอื่น ๆ 45.7% (รูปที่ 3)

The most common in 2020 (in terms of new cases of cancer)



รูปที่ 2 แสดงจำนวนผู้ป่วยรายใหม่ทั่วโลกของมะเร็งแต่ละชนิดที่พบได้บ่อยในปี 2020⁽¹⁾



รูปที่ 3 แสดงจำนวนผู้ป่วยรายใหม่ในประเทศไทยของมะเร็งแต่ละชนิดในปี 2020⁽³⁾

การวินิจฉัยมะเร็งที่ถูกต้องมีความจำเป็นสำหรับการรักษาที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสม การรักษามะเร็งมีหลายวิธี เช่น ผ่าตัด (surgery), การฉายรังสี (radiotherapy) และการรักษาเชิงระบบ (systemic therapy) ได้แก่ เคมีบำบัด (chemotherapy), ฮอร์โมนบำบัด (hormonal treatments), การรักษามะเร็งด้วยยาแบบมุ่งเป้า (targeted therapies)⁽¹⁾ โดย immunotherapies เป็นหนึ่งใน targeted therapies ซึ่งเป็นการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้ทำลายเซลล์มะเร็ง⁽⁴⁾

และจากการค้นพบการรักษาโรคมะเร็งโดยการใช้ภูมิคุ้มกันร่างกายในการต่อสู้กับโรคมะเร็งหรือภูมิคุ้มกันบำบัดมะเร็ง (Cancer immunotherapy) นั้น ได้นำไปสู่การพัฒนาในในกลุ่มนี้หลายชนิด โดยเฉพาะในกลุ่มยาที่ยับยั้ง immune checkpoint (Immune Checkpoint Inhibitors; ICIs) ซึ่งในปัจจุบันมียาในกลุ่มนี้ที่ได้รับการอนุมัติให้ใช้ในมนุษย์ และแนะนำให้เป็นทั้งยา first-line drug ในมะเร็งหลาย ๆ ชนิด รวมถึงเป็นยา second-line drug ในกรณีที่ไม่ตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดมาตรฐาน⁽⁵⁾ โดยยาในกลุ่ม ICIs ในปัจจุบันนี้ จะมีเป้าหมายอยู่ที่ 3 ตำแหน่ง ได้แก่ programmed cell death protein 1 (PD-1) ที่อยู่บน T-cells, programmed death-ligand 1 (PD-L1) ที่อยู่บนเซลล์มะเร็ง และ cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4) ที่อยู่บน T cells โดยหากยาไปยับยั้งการจับกันระหว่าง PD-1 และ PD-L1 รวมถึงการที่ยับยั้งการจับกันระหว่าง CTLA-4 และ CD80 จะสามารถทำให้ T-cells ไม่ถูกยับยั้งจึงทำหน้าที่กำจัดเซลล์มะเร็งได้ ซึ่งในปัจจุบันยาในกลุ่มนี้ที่ได้รับการอนุมัติให้ใช้ในมนุษย์ จะเป็นยาชนิด monoclonal antibody ที่สามารถแบ่งตามกลไกการยับยั้งการจับกับโมเลกุลเป้าหมาย ได้แก่

1. PD-1 inhibitors ได้แก่ Pembrolizumab (Keytruda®), Nivolumab (Opdivo®), Cemiplimab (Libtayo®)
2. PD-L1 inhibitors ได้แก่ Atezolizumab (Tecentriq®), Avelumab (Bavencio®), Durvalumab (Imfinzi®)
3. CTLA-4 inhibitors ได้แก่ Ipilimumab (Yervoy®)

โดยปกติแล้ว ปัญหาการเกิดอันตรกิริยาของยา (drug-drug interactions) นั้นเป็นปัญหาหนึ่งที่พบได้บ่อยในผู้ป่วยมะเร็ง เนื่องจากการที่ผู้ป่วยมักได้รับยาหลาย ๆ ชนิดร่วมกันทั้งอาจจะเป็นยาที่ใช้ในการรักษาโรคประจำตัวอื่น ๆ หรือยาที่ใช้รักษามะเร็ง ซึ่งอาจจะนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงระดับยาในร่างกาย ทำให้การรักษาไม่ได้ผล หรือเกิดอาการข้างเคียงมากขึ้น⁽⁶⁾ โดยอาจจะเกิดจากการที่ยาตัวหนึ่งไปเหนี่ยวนำ ให้เกิดการแสดงออกของเอนไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงยา เช่น เอนไซม์กลุ่มไซโตโครม พี 450 (cytochrome P450 หรือ CYPs) ให้มีการแสดงออกที่มากขึ้น ทำให้ยาตัวอื่นที่ถูกเอนไซม์ชนิด CYPs นั้นเปลี่ยน มีระดับยาลดลงจากการที่ถูกเอนไซม์เปลี่ยนแปลงยาไปมากกว่าเดิม หรือในอีกกรณีหนึ่งที่ยาตัวหนึ่งไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYPs บางชนิด ก็จะส่งผลให้ผลระดับยาตัวอื่นที่ถูกเอนไซม์ CYPs ชนิดนั้นเปลี่ยนมีระดับยาที่เพิ่มสูงขึ้นจากการที่ยาถูกเปลี่ยนแปลงน้อยลง⁽⁷⁾

การเกิดอันตรกิริยาเช่นนี้ มักเกิดเมื่อให้ยาที่เป็นตัวยาเคมีร่วมกัน แต่สำหรับยาที่เป็น therapeutic proteins โดยเฉพาะ monoclonal antibody นั้น พบว่าอาจจะไม่มีโอกาสในการเกิดอันตรกิริยากับยาอื่น ๆ ที่เป็นตัวยาเคมีโดยตรง เนื่องมาจากเหตุผล เช่น การออกฤทธิ์ของยา monoclonal antibody นั้นค่อนข้างจะจำเพาะกับเป้าหมายโดยตรง และมักจะจับโปรตีนเป้าหมาย

ที่บริเวณผิวเซลล์ ทำให้มีโอกาสน้อยที่จะไปออกฤทธิ์กระตุ้นตัวรับชนิด nuclear receptor ภายในเซลล์ แล้วเกิดการส่งสัญญาณเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของเอนไซม์ได้มากขึ้นได้⁽⁸⁾ ในทางกลับกันกระบวนการเปลี่ยนแปลงยา monoclonal antibody นั้นเกิดเช่นเดียวกับการสลายโปรตีน หรือสลายเปปไทด์ในร่างกาย⁽⁹⁾ ซึ่งต่างจากตัวยาเคมีที่ต้องอาศัยเอนไซม์ CYPs ในการทำปฏิกิริยาออกซิเดชันเพื่อเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของตัวยาเคมีจึงอาจกล่าวได้ว่าในแง่ทฤษฎีนั้นโอกาสในการเกิดอันตรกิริยาระหว่างตัวยา monoclonal antibody และตัวยาเคมีจึงมีไม่มากนักก็เป็นได้

อย่างไรก็ตาม มีรายงานการศึกษาว่าไซโตไคน์ (cytokines) บางชนิด สามารถส่งผลต่อการแสดงออกของเอนไซม์ CYPs ได้ เช่น มีรายงานในผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดมะเร็ง (high-risk melanoma) ที่ได้รับการรักษาด้วย IFN α -2b ขนาดสูง มีผลลดการทำงานของเอนไซม์ CYPs ชนิด CYP1A2 ขณะที่ไม่มีผลต่อ CYP2E1⁽¹⁰⁾ นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์ระหว่างระดับ interleukin 6 (IL-6) ที่เพิ่มขึ้นอันเนื่องมาจากการผ่าตัดโรคลมชัก กับการลดลงของการเปลี่ยนแปลงระดับยา carbamazepine⁽¹¹⁾ เป็นต้น

ซึ่งได้มีรายงานถึงผลการศึกษาในหลอดทดลองและในสิ่งมีชีวิตของไซโตไคน์ (cytokines) ชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อเอนไซม์ CYPs ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลของไซโตไคน์ต่อการทำงานของเอนไซม์ CYPs แต่ละชนิด ⁽¹²⁾

Cytokines	CYP enzymes						
	CYP1A2	CYP2B6	CYP2C8	CYP2C9	CYP2C19	CYP2E1	CYP3A4
IFN γ	↓	↓	↓	↓ หรือ ↔	↔		↓ หรือ ↔
TGF- β 1	↓	↓ หรือ ↑	↓	↓	↓		↓
TNF- α	↓	↓ หรือ ↑	↓	↓ หรือ ↔	↓ หรือ ↔	↓	↓
IL-1 β	↓	↓	↓	↓ หรือ ↔	↔	↓	↓
IL-2		↓					↓
IL-4	↓	↑				↑	↑ หรือ ↔
IL-6	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
IL-10		↔					↑

จากการที่ไซโตไคน์อาจจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงปริมาณและการทำงานของเอนไซม์ CYPs จึงอาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงยาชนิดต่าง ๆ ดังตัวอย่างที่แสดงในตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 2 ตัวอย่างยาที่เป็น substrate ของ CYP ⁽¹³⁻¹⁵⁾

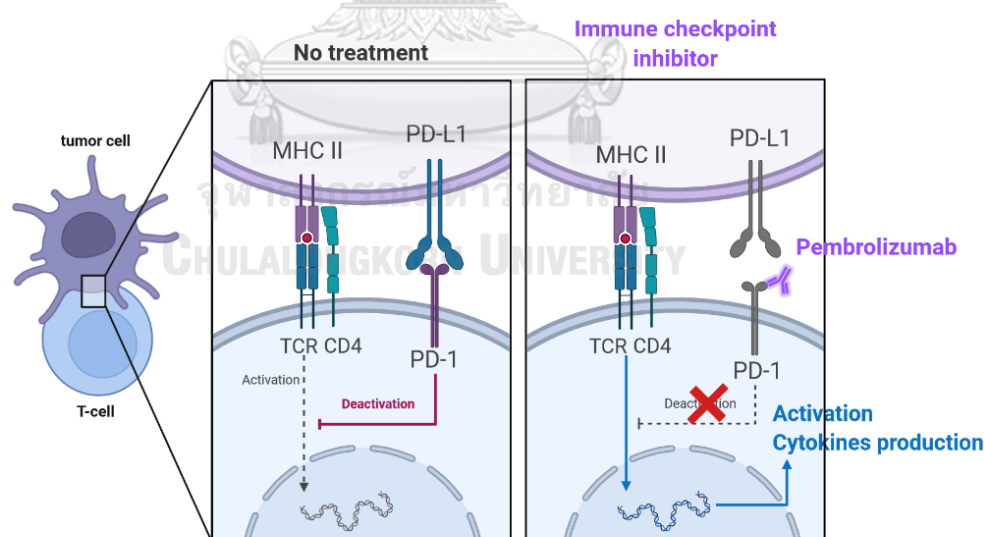
CYP enzymes	Substrates	
CYP1A2	Lidocaine (3A4, 2B6)	Olanzapine (2D6)
	Melatonin (1A1, 2C19)	Propranolol
	Naproxen (2C9, 2C8)	Theophylline
CYP2C8	Amiodarone	Paclitaxel (3A4)
	Amodiaquine	Retinoic acid (2C9)
	Cerivastatin (3A4 minor)	

CYP enzymes	Substrates
	Chloroquine (3A4 minor) Rosiglitazone (3A4minor) Troglitazone (3A4minor)
CYP2C9	Diclofenac Flurbiprofen Glibenclamide Glimepiride Ibuprofen (2C8, 3A4/5) Indomethacine (2C8) Irbesartan Losartan (3A4/5) Meloxicam (3A4/5) Phenytoin (2C19) Piroxicam Tolbutamide (2C19) S-warfarin (4F2)
CYP2C19	Amitriptyline (1A2,2C8, 2C9) Clomipramine (1A2) Imipramine Lansoprazole (3A4/5) Omeprazole (3A4/5) Pantoprazole (3A4/5) Proguanil (3A4/5)
CYP3A4	Alfentanil Alprazolam Atorvastatin Budesonide Buprenorphine Carbamazepine (2C8) Cisapride (2A6) Citalopram (2C19, 2D6) Clarithromycin Codeine (2B6) Cortisol Cyclobenzaprine (1A2, 2D6) Cyclophosphamide Cyclosporine A Etoposide Felodipine Fentanyl Granisetron Ifosfamide (2B6) Irinotecan Midazolam Mifepristone Nevirapine Quinidine Sildenafil (2C9) Simvastatin (2C8) Tacrolimus Teniposide

CYP enzymes	Substrates
	Dexamethasone Testosterone (2C9, 1A1)
	Dextromethorphan
	Diazepam (2C19) Tetrahydrocannabinol
	Diltiazem (2C8, 2C9) Triazolam
	Docetaxel Verapamil (2C8)
	Erythromycin (2B6) Vincristine
	Zolpidem (1A2)

* เอนไซม์ CYPs อื่น ๆ ที่มีส่วนในการเปลี่ยนแปลงยาแสดงในวงเล็บ

จากการที่หลักการของยาในกลุ่ม ICIs นั้น จะไปยับยั้งโมเลกุลที่ยับยั้งการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน โดยเฉพาะ T cells ส่งผลให้สุดท้ายแล้วเกิดการกระตุ้นการทำงานของ T cells ยกตัวอย่างเช่น กลไกการทำงานของ Pembrolizumab ซึ่งเป็นยาที่ไปยับยั้งการจับกันระหว่าง PD-1 และ PD-L1 โดยมีเป้าหมายอยู่ที่ PD-1 ที่อยู่บนผิว T cells เมื่อยาไปจับกับ PD-1 แล้วจะทำให้ไม่เกิดการยับยั้งการทำงานของ T cells ส่งผลให้เกิดการทำลายเซลล์มะเร็ง โดยผ่านทางกลไกต่าง ๆ เช่น การเพิ่มการสร้างไซโตไคน์ชนิด IL-2, IL-6, IL-17, IFN γ และ TNF- α จาก T cells ที่ถูกกระตุ้น⁽¹⁶⁾



รูปที่ 4 แสดงกลไกการทำงานของยาแอนติบอดี Pembrolizumab ซึ่งเป็นยาที่ไปยับยั้งการจับกันระหว่าง PD-1 และ PD-L1 โดยมีเป้าหมายอยู่ที่ PD-1 ที่อยู่บนผิว T cells

อย่างไรก็ตามการศึกษาถึงผลของยากกลุ่ม ICIs ต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกหรือการทำงานของเอนไซม์ CYPs นั้นยังมีอยู่อย่างจำกัด การศึกษาหนึ่งรายงานวาระดับของไซโตไคน์ที่

เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ (inflammatory cytokines) ในกระแสเลือดนั้นต่ำกว่าค่าที่วิเคราะห์ได้ (limit of detection) ในคนที่ได้รับ nivolumab (anti-PD1 antibody) ทำให้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ CYPs⁽¹⁷⁾ ซึ่งจากรายงานการศึกษานี้ยังไม่อาจสรุปถึงผลที่แน่ชัดของยาในกลุ่ม ICIs ต่อการแสดงออกของเอนไซม์ CYPs ได้

ดังนั้นในการศึกษานี้ จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาถึงผลของยาในกลุ่ม ICIs 1 ชนิดคือ Pembrolizumab (anti-PD1) ที่กระตุ้นการสร้างไซโตไคน์จากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดียวของมนุษย์ (human peripheral blood mononuclear cells; PBMCs) ต่อการแสดงออกของเอนไซม์ CYPs ในเซลล์ตับมนุษย์เพาะเลี้ยง ซึ่งข้อมูลจากการศึกษานี้จะเป็นข้อมูลเบื้องต้นถึงผลโดยอ้อมทางเภสัชพลศาสตร์ของยากลุ่ม ICIs ที่อาจส่งผลต่อการเกิดอันตรกิริยาต่อยาเคมีอื่น ๆ ที่ใช้ร่วมในผู้ป่วยได้

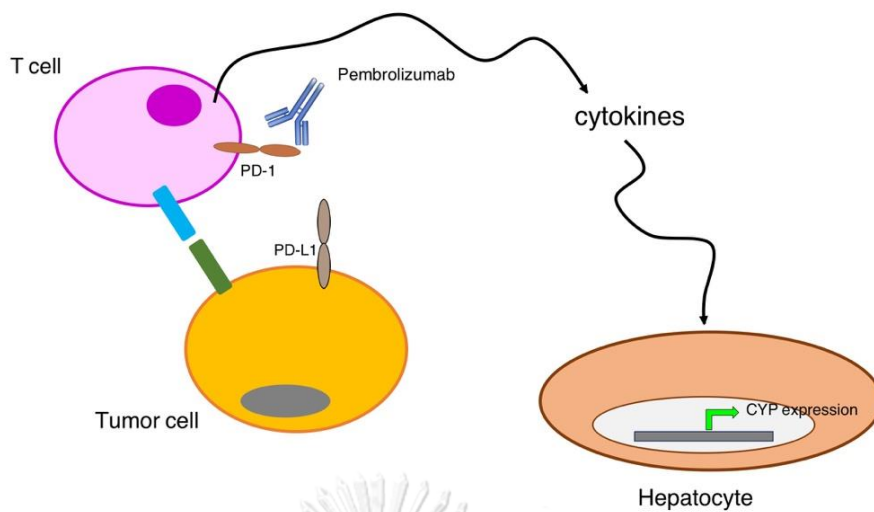
1.2 วัตถุประสงค์

ศึกษาผลทางเภสัชพลศาสตร์ของยากลุ่มภูมิคุ้มกันบำบัดชนิด Immune checkpoint inhibitors ต่อเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงของมนุษย์

1.3 กรอบแนวความคิดการวิจัย

เซลล์มะเร็งมีความสามารถในการป้องกันไม่ให้ภูมิคุ้มกันของร่างกายไปทำลายเซลล์มะเร็ง โดยการกระตุ้นระบบ Immune checkpoint ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันทำงานไม่ได้ ซึ่งยา Pembrolizumab (PD-1 inhibitors) จะไปขัดขวางการจับกันระหว่าง immune checkpoint บนผิวเซลล์มะเร็ง กับ T cells ทำให้ความสามารถในการทำลายเซลล์มะเร็งของ T cells กลับคืนมา และไซโตไคน์ชนิดต่าง ๆ ที่หลั่งออกมาจาก T cells หลังจากถูกกระตุ้นด้วยยาอาจจะมีผลต่อการแสดงออกของเอนไซม์กลุ่มไซโตโครม พี 450 ในเซลล์ตับมนุษย์เพาะเลี้ยงได้

ดังนั้นในการศึกษานี้จะมีการนำเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดียวของมนุษย์ (PBMCs) มาบ่มกับยาแอนติบอดี Pembrolizumab ซึ่งเป็น anti-PD-1 antibody ในสถานะที่มีเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด PD-L1 บนผิวเซลล์ จากนั้นจึงนำอาหารเพาะเลี้ยงส่วนใสที่ได้จากการบ่มยาแอนติบอดี Pembrolizumab กับเซลล์ PBMCs มาบ่มกับเซลล์ตับเพาะเลี้ยงของมนุษย์ชนิด HepG2 แล้วจึงสกัดเอา mRNA เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์ CYPs แต่ละชนิด



รูปที่ 5 แสดงกรอบแนวความคิดการวิจัย



บทที่ 2

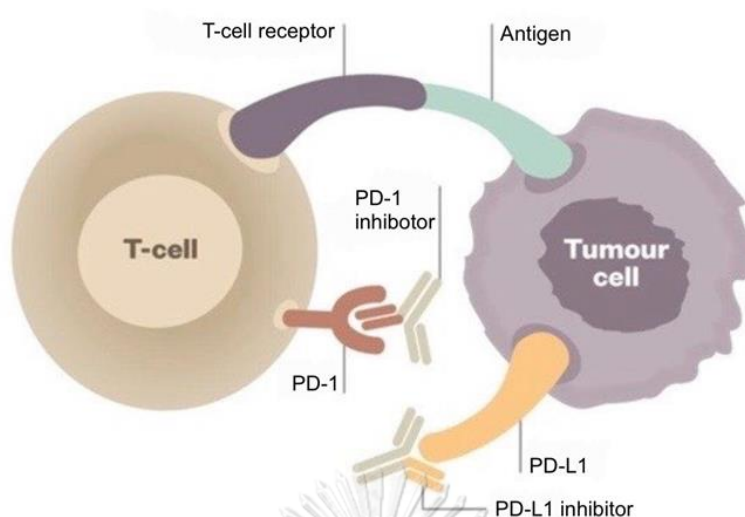
ปรีทัศน์วรรณกรรม

2.1 Programmed cell death protein 1 (PD-1)/Programmed cell death-ligand 1 (PD-L1)

Programmed cell death protein 1 (PD-1) เป็น checkpoint protein ที่เป็นส่วนหนึ่งของ CD28 family ซึ่งเกี่ยวกับกลุ่มของ suppressor T-cell receptors ซึ่งจะไม่แสดงออกเมื่อมี T cells เพียงอย่างเดียว แต่จะแสดงออกเมื่อถูกกระตุ้นจากแอนติเจน (antigen) และไซโตไคน์ (cytokines) ที่เกิดจากการกระตุ้น T cells นอกจากนี้ Programmed cell death protein 1 (PD-1) ยังแสดงออกที่ B cells, monocytes และ dendritic cells (DCs) อีกด้วย เพื่อทำหน้าที่ในการควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน

Programmed cell death-ligand 1 (PD-L1) เป็นทรานส์เมมเบรนไกลโคโปรตีนประเภทที่ 1 (type 1 transmembrane glycoprotein) ของ B7 ligand family ซึ่งไม่เพียงแต่มีการแสดงออกบน T cells และ B cells ที่ถูกกระตุ้น แต่ยังสามารถแสดงออกบน non-hematopoietic cells อีกด้วย โดยทำหน้าที่ในการควบคุมการทำหน้าที่ของ T cells ใน dendritic cells (DCs) และ antigen-presenting cells (APCs) โดย T cells จะทำหน้าที่ในการจดจำเซลล์มะเร็งในร่างกายและทำลายเซลล์เหล่านั้น แต่เมื่อเซลล์มะเร็งสามารถจดจำ PD-1 บน T cells ได้ เซลล์มะเร็งนั้นจะสร้าง PD-L1 เพิ่มขึ้นและเกิดการจับกันระหว่าง PD-1 และ PD-L1 ซึ่งทำให้ T cell-mediated immune surveillance ลดลง ส่งผลให้ไม่เกิดปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันและเกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis ของ T cells ในที่สุด นอกจากนี้ยังส่งผลให้เกิด tumor-infiltrating CD4⁺/CD8⁺ T cells (CD4⁺/CD8⁺ TILs) และนำไปสู่การลดลงของไซโตไคน์ต่าง ๆ รวมถึง tumor necrosis factor (TNF), IFN- γ และ Interleukin-2 (IL-2) ส่งผลให้เซลล์มะเร็งเกิดการหลบหลีกภูมิคุ้มกันได้

ดังนั้น PD-1/PD-L1 inhibitors จึงทำหน้าที่ในการป้องกันการกดการตอบสนองของ anti-tumor T cells ส่งผลให้ T cells เพิ่มจำนวนและซึมผ่านไปยังสภาวะแวดล้อมของเซลล์มะเร็ง รวมถึงทำให้ T cells กลับมามีฤทธิ์ในการต่อต้านเซลล์มะเร็ง⁽¹⁸⁾



รูปที่ 6 แสดงการจับกันระหว่าง PD-1 กับ PD-1 inhibitors และ PD-L1 กับ PD-L1 inhibitors⁽¹⁹⁾

2.2 การรักษาโดยใช้แอนติบอดี (Antibody Therapy)

PD-1/PD-L1 inhibitors เป็นกลุ่มของ immune checkpoint inhibitors (ICIs) ซึ่งเป็นยาที่ใช้ในการรักษามะเร็งหลายชนิด⁽²⁰⁾ ด้วยการยับยั้ง PD-1/PD-L1 signaling pathway ซึ่งมีความสำคัญทางคลินิกในการรักษามะเร็ง ทั้งนี้ FDA ได้รับรอง PD-1 inhibitors ได้แก่ Nivolumab, Pembrolizumab และ Cemiplimab และ PD-L1 inhibitors ได้แก่ Atezolizumab, Durvalumab และ Avelumab เพื่อใช้ในการรักษามะเร็งที่เกี่ยวข้องกับเลือดและมะเร็งชนิดก้อน PD-1/PD-L1 inhibitors ลดขนาดของก้อนมะเร็ง ยับยั้งการเกิดมะเร็งระยะลุกลาม และการแพร่กระจายของมะเร็งไปยังอวัยวะอื่น ๆ รวมถึงเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วย แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากยา PD-1/PD-L1 inhibitors มีค่าครึ่งชีวิตที่ยาวและมีระยะเวลาในการจับกับเป้าหมาย จึงง่ายที่จะเกิดเหตุการณ์ที่ไม่พึงประสงค์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน (immune-related adverse events) ที่รุนแรง⁽¹⁸⁾

2.3 Pembrolizumab

Pembrolizumab เป็น full-length human immunoglobulin G4 monoclonal anti-PD-1 antibody ซึ่งจะไปขัดขวาง PD-1 pathway โดยไปจับกับ PD-1 receptor ที่แสดงออกบนเยื่อหุ้มเซลล์ของ T-cells ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีระวิทยา ส่งผลต่อปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันและเกิดฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง (anti-tumor effects) ทำให้ T-cells กลับมามีบทบาทในการทำลายเซลล์มะเร็งอีกครั้ง⁽²⁰⁾

2.3.1 ข้อบ่งใช้ของ Pembrolizumab

1. Melanoma
2. Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC)
3. Head and neck Squamous Cell Cancer (HNSCC)
4. Classical Hodgkin Lymphoma (cHL)
5. Primary Mediastinal Large B-cell Lymphoma (PMBCL)
6. Urothelial Carcinoma
7. Microsatellite Instability-High or Mismatch Repair Deficient Cancer
8. Microsatellite Instability-High or Mismatch Repair Deficient Colorectal Cancer (CRC)
9. Gastric Cancer
10. Esophageal Cancer
11. Cervical Cancer
12. Hepatocellular Carcinoma (HCC)
13. Merkel Cell Carcinoma (MCC)
14. Renal Cell Carcinoma (RCC)
15. Endometrial Carcinoma
16. Tumor Mutational Burden-High (TMB-H) Cancer
17. Cutaneous Squamous Cell Carcinoma (cSCC)
18. Triple-Negative Breast Cancer (TNBC)

2.3.2 คุณสมบัติทางเภสัชพลศาสตร์ (Pharmacodynamics)

จากแบบจำลองความสัมพันธ์ระหว่างขนาดยา กับ ประสิทธิภาพและความปลอดภัย (dose/exposure efficacy and safety relationships) พบว่าข้อมูลด้านเภสัชจลนศาสตร์ที่สังเกตได้จาก interim analysis ของผู้ที่เป็น melanoma จำนวน 41 คน ซึ่งทำการรักษาด้วยยา Pembrolizumab 400 mg ทุก 6 สัปดาห์ เมื่อเปรียบเทียบกับการได้รับยา Pembrolizumab 200 mg/kg ทุก 3 สัปดาห์ พบว่ามีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางคลินิก ทั้งในด้านประสิทธิภาพและความปลอดภัย

2.3.3 คุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ (Pharmacokinetics)

ในการศึกษาด้านเภสัชจลนศาสตร์จะใช้การวิเคราะห์ระดับประชากรโดยการรวบรวมข้อมูลความเข้มข้นของยาจากผู้ป่วยมะเร็งจำนวน 2,993 คน ซึ่งได้รับ Pembrolizumab ที่ขนาดยาตั้งแต่ 1-

10 mg/kg ทุก 2 สัปดาห์, 2-10 mg/kg ทุก 3 สัปดาห์, หรือ 200 mg ทุก 3 สัปดาห์ เมื่อให้ยาซ้ำทุก 3 สัปดาห์ ความเข้มข้นของ Pembrolizumab จะถึงระดับยาคงที่ (steady state) เมื่อเวลาผ่านไป 16 สัปดาห์หลังจากให้ยาและมีการสะสมยาในกระแสเลือด (systemic accumulation) เป็น 2.1 เท่า สำหรับความเข้มข้นของยาที่ระดับสูงสุด (Cmax), ความเข้มข้นของยาที่ระดับต่ำสุด (Cmin) และพื้นที่ใต้กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของยาในพลาสมากับเวลาที่สภาวะคงที่ (AUCss) ของ pembrolizumab จะเพิ่มขึ้นตามสัดส่วนของขนาดยาที่ให้ในช่วง 2-10 mg/kg ทุก 3 สัปดาห์

2.3.4 การกระจายตัวของยา (Distribution)

geometric mean value (CV%) สำหรับปริมาตรกระจายตัว (volume of distribution) ที่สภาวะคงที่ (steady state) คือ 6.0 ลิตร (20%)

2.3.5 การขจัดยาออกจากร่างกาย (Elimination)

Pembrolizumab clearance (CV%) เมื่อระดับยาคงที่ (steady state) จะต่ำลงประมาณ 23% ซึ่งน้อยกว่าหลังจากให้ยาครั้งแรก [geometric mean, 195 mL/day (40%) vs 252 mL/day (37%)] การลดลงของการขจัดยากับเวลานั้นไม่มีความสำคัญทางคลินิกโดยมีค่าครึ่งชีวิต ($t_{1/2}$) คือ 22 วัน (32%)

2.3.6 อาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ Pembrolizumab

อาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ Pembrolizumab ที่พบได้บ่อย (มีรายงานการเกิด $\geq 20\%$ ของผู้ป่วย) ได้แก่ อ่อนเพลีย, ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อและกระดูก, ไข้, ท้องเสีย, มีไข้, ไอ, ความอยากอาหารลดลง, ลมพิษ, หายใจลำบาก, ท้องผูก, ปวดท้อง, คลื่นไส้ และ ภาวะพร่องฮอร์โมนไทรอยด์⁽²¹⁾

2.4 Interleukins (ILs) และ Interferon-gamma (IFN- γ)

2.4.1 Interleukin-2 (IL-2)

Interleukins (ILs) เป็นไซโตไคน์ (cytokines) ที่ถูกสร้างขึ้นโดย T lymphocytes ซึ่งทำให้เกิดการพัฒนาและการแบ่งตัวของ T cells, B cells และ hematopoietic cells การรักษาโดยใช้ IL-2 แสดงให้เห็นถึงผลทางด้านภูมิคุ้มกันหลายรูปแบบ รวมถึงการกระตุ้น cellular immunity และการสร้างไซโตไคน์ด้วย Recombinant IL-2 เคยถูกใช้รักษามะเร็งระยะลุกลาม แต่ยังมีข้อมูลทางคลินิกไม่มากเกี่ยวกับผลของ IL-2 ต่อ CYP metabolism แต่อย่างไรก็ตามการใช้ High-dose IL-2 ในผู้ป่วยมะเร็งระดับแสดงให้เห็น ถึงการแสดงออกของ

CYP1A2, CYP2C, CYP2E1 และ CYP3A4 ที่ลดลงประมาณ 40-60% รวมถึงทำให้ CYP1A2 และ CYP3A4 มีการทำงานลดลง 62 และ 50% ตามลำดับ ดังนั้นการใช้ IL-2 ในผู้ป่วยมะเร็งจึงอาจก่อให้เกิดปฏิกิริยาระหว่างยาที่มีความสำคัญทางคลินิกได้⁽¹²⁾

2.4.2 Interferon-gamma (IFN- γ)

เป็น IFN ชนิดเดียวที่อยู่ใน IFN ประเภทที่ 2 โดยโครงสร้างจะแตกต่างจาก IFNs ประเภทที่ 1 (IFN- α subtypes (14-20), IFN- β , IFN- ω และ IFN- τ) และจับที่ตัวรับต่างกัน IFN- γ นั้นหลังจากเซลล์หลายชนิด เช่น CD4+ T helper cell type 1 (Th1) lymphocytes, CD8+ cytotoxic lymphocytes, NK cells, B cells, NKT cells, professional antigen-presenting cells (APCs) โดย IFN- γ ที่สร้างจาก professional APCs [monocyte/macrophage, dendritic cells (DCs)] นั้นจะมีฤทธิ์เฉพาะที่ ซึ่งมีความสำคัญเกี่ยวกับการกระตุ้นตัวเองของเซลล์ (cell self-activation) และการกระตุ้นเซลล์ข้างเคียง นอกจากนี้ IFN- γ ที่หลังจาก NK cells และ professional APCs นั้นจะมีความสำคัญต่อการต้านการติดเชื้อของโฮสต์ในช่วงแรก ในขณะที่ T lymphocytes จะกลายเป็นแหล่งสำคัญของ IFN- γ ในการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (adaptive immune response)⁽²²⁾

นอกจากนี้มีการศึกษาเกี่ยวกับผลของไซโตไคน์ต่อการแสดงออกของไซโตโครม พี 450 ซึ่งทำในเซลล์ตับของมนุษย์ โดยได้นำเซลล์ที่ผ่านการบ่มด้วยไซโตไคน์ชนิดต่าง ๆ และนำมาวัดปริมาณ CYP mRNAs โดย Real Time Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR) อีกทั้งวัดระดับโปรตีน P450 ด้วยวิธีการ Western Blotting และจากผลการศึกษาพบว่า เซลล์ตับที่ได้รับการบ่มด้วย IFN- γ นั้น สามารถลดการแสดงออก CYP mRNAs ของ CYP2C8 ได้อย่างมีนัยสำคัญ อีกทั้งยังลดการแสดงออก CYP mRNAs ของ CYP3A4 และ CYP2B6 นอกจากนี้ยังพบว่า IFN- γ สามารถลดการแสดงออกของโปรตีน CYP2C9 ของผู้ป่วยได้ หลังจากรักษา 24 ชั่วโมง

ในส่วนของโปรตีน CYP3A4 นั้นพบว่า IFN- γ มีผลลดระดับการแสดงออกลง เช่นเดียวกัน อีกทั้งโปรตีน CYP2B6 นั้นเมื่อเซลล์ได้รับการบ่ม โดย IFN- γ ก็พบว่ามีระดับที่ลดลงเมื่อวัดที่ 24 ชั่วโมงและ 40 ชั่วโมงหลังได้รับการบ่ม⁽²³⁾

จากการรายงานของ Donato et al (1997) นั้นพบว่า IFN- γ สามารถลดการทำงานของ CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6 และ CYP3A4 ในเซลล์ตับของมนุษย์ อีกทั้งลดการแสดงออกของ mRNA และโปรตีนของ CYP1A2 และ CYP3A4 เช่นเดียวกัน ซึ่งผลดังกล่าวเป็นผลของไนตริกออกไซด์ (NO) ซึ่งเหนี่ยวนำโดย IFN- γ (NO-dependent)⁽²⁴⁾

2.5 เอนไซม์ไซโตโครม พี 450 (Cytochrome P450)

เอนไซม์ไซโตโครม พี 450 (Cytochrome P450) เป็นซูเปอร์แฟมิลี (superfamily) ของฮีโมโพรตีน (hemeproteins) ที่ทำหน้าที่ในการเมแทบอลิซึมยาใน phase I reactions ซึ่งประกอบด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation), ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) และปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) โดยส่วนใหญ่เอนไซม์ไซโตโครม พี 450 (Cytochrome P450) จะอยู่บริเวณร่างแหเอนโดพลาซึ่ม (endoplasmic reticulum) ของเซลล์ตับและเซลล์เยื่อบุลำไส้

เอนไซม์ไซโตโครม พี 450 (Cytochrome P450) มีความสำคัญต่อการศึกษเกี่ยวกับอาการไม่พึงประสงค์ จากการใช้ยา ทั้งนี้เหตุการณ์ไม่พึงประสงค์จากยาอาจก่อให้เกิดความเจ็บป่วยและการเสียชีวิต โดยในมนุษย์มีเอนไซม์ CYP ทั้งหมด 18 families ซึ่งมีเพียง 8 เอนไซม์ที่อยู่ใน subfamilies CYP1, CYP2 และ CYP3 ที่ตอบสนอง ต่อการเมแทบอลิซึมของสิ่งแปลกปลอมภายนอกในร่างกาย (xenobiotic) และยา ได้แก่ CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, และ CYP3A4/5⁽²⁰⁾ โดยตัวอย่างยา, CYPs ที่ใช้ในการ เมแทบอลิซึมยาและอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยาดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงตัวอย่างยา, เอนไซม์ CYPs ที่ใช้ในการเมแทบอลิซึมยาและอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยา (25-43)

Substrate of CYP1A2	Drug Class	Metabolic Pathway(s) Catalyzed by CYP1A2	Other CYP Enzymes Involved in overall Metabolism	Adverse Drug Reaction
Theophylline	Bronchodilator	N-demethylation, and 4'- and 5-hydroxylation	CYP2E1, CYP3A4	tachycardia, headache, insomnia, seizure, nausea, vomiting, tremor
Tizanidine	Muscle relaxant	-	-	hepatotoxicity, hypotension, sedation,

				withdrawal syndrome
Propranolol	β -blocker	N-deisopropylatio n	CYP2D6	bradyarrhythmias, bronchospasm, fatigue, insomnia, potentiation/masking of hypoglycemia
R-warfarin	Oral anticoagulant	6-,7-, and 8-Hydroxylation	CYP3A4	major hemorrhage, purple-toe syndrome, hepatitis
Substrate of CYP2C8	Drug Class	Metabolic Pathway(s) Catalyzed by CYP2C8	Other CYP Enzymes Involved in overall Metabolism	Adverse Drug Reaction
Paclitaxel (taxol)	Anticancer, taxane	6 α -hydroxylation	CYP3A4	alopecia, nausea, vomiting, diarrhea, anemia, easy bruising/bleeding, confusion, seizures
Pioglitazone	Antidiabetic, PPAR- γ agonist	hydroxylation	CYP3A4/5, CYP1A1	edema, hypoglycemia,

				upper respiratory tract infection
Amiodarone	Antiarrhythmic	N-deethylation	CYP3A4, (CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6)	nausea, vomiting, epithelial keratopathy, pulmonary toxicity
Chloroquine	Antimalarial	N-deethylation	CYP3A4/5, (CYP2D6)	ECG changes, hypotension, severe hypoglycemia, diarrhea, nausea, vomiting
Substrate of CYP3A4	Drug Class	Metabolic Pathway(s) Catalyzed by CYP3A4	Other CYP Enzymes Involved in overall Metabolism	Adverse Drug Reaction
Simvastatin	HMG-CoA reductase inhibitors	6'- β -hydroxylation	CYP3A5, CYP2C8	atrial fibrillation, abdominal pain, bronchitis, upper respiratory infection, headache

Atorvastatin	HMG-CoA reductase inhibitors	O-hydroxylation and P-hydroxylation	CYP3A5	diarrhea, arthralgia, nasopharyngitis, myalgia
Docetaxel	Anticancer, taxane	hydroxylation	CYP3A5	alopecia, dermatological reaction, fluid retention, nausea, diarrhea, nail disease
Tacrolimus	Immunosuppressive agents	O-demethylation	CYP3A5	cardiac arrhythmia, edema, flushing, dermatitis, Cushing's syndrome, urinary retention
Morphine	Opioid agonist	N-demethylation	CYP3A5	constipation, nausea, drowsiness, dizziness, anxiety
Carbamazepine	Anticonvulsant	10,11-epoxidation	CYP3A5, CYP2C8	blood dyscrasia, cardiac effects (cardiac failure, sinus tachycardia),

				hepatotoxicity, hyponatremia, Neuropsychiatric effects (ataxia, dizziness, drowsiness), nausea, vomiting
Substrate of CYP2C9	Drug Class	Metabolic Pathway(s) Catalyzed by CYP2C9	Other CYP Enzymes Involved in overall Metabolism	Adverse Drug Reaction
S-warfarin	Vitamin K antagonist	S-warfarin 7- hydroxylation	CYP4F2	major hemorrhage, purple-toe syndrome, hepatitis
Diclofenac	NSAIDs	4'- hydroxylation	-	Edema, Nausea
Tolbutamide	Antidiabetes	4'- hydroxylation	CYP2C19	Disulfiram-like reaction, headache, hypoglycemia
Substrate of CYP2C19	Drug Class	Metabolic Pathway(s) Catalyzed by CYP2C19	Other CYP Enzymes Involved in overall Metabolism	Adverse Drug Reaction

Omeprazole	Proton-pump inhibitor	5-hydroxylation	3A4/5	respiratory system disorder, headache, abdominal pain, diarrhea
Phenytoin	Anticonvulsant	S-mephenytoin 4'-hydroxylation	-	agranulocytosis, granulocytopenia, confusion, dizziness, headache
Clopidogrel	P2Y12 Platelet Inhibitor	2-oxo-clopidogrel formation	CYP3A4/5, CYP2B6, CYP1A2	hemorrhagic stroke, intracranial hemorrhage

2.6 Immune-related adverse events (irAEs)

ในปัจจุบันที่มีการใช้ยาในกลุ่ม Immune checkpoint inhibitors (ICIs) มากยิ่งขึ้น จึงส่งผลให้พบอาการไม่พึงประสงค์จากยาดังกล่าวมากขึ้น โดยอาการไม่พึงประสงค์ที่พบบ่อยจากการใช้ยา ในกลุ่มนี้คือ irAEs ซึ่งเป็นผลมาจากการที่ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายถูกกระตุ้น โดยพบว่าระบบผิวหนัง (Dermatologic system), ระบบย่อยอาหาร (Gastrointestinal system), ระบบต่อมไร้ท่อ (Endocrine system) และ ระบบทางเดินหายใจ (pulmonary system) เป็นระบบอวัยวะในร่างกายที่มีการเกิดของ irAEs บ่อยที่สุด ทั้งนี้พบว่าระบบหัวใจและหลอดเลือด (Cardiovascular system) มีการเกิดของ irAEs น้อยแต่มี อัตราการตายสูงที่สุด

ทั้งนี้ความรุนแรงของการเกิด irAEs สามารถประเมินโดยใช้ National Cancer Institute's Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) สามารถแบ่งได้ 5 ระดับ ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงระดับความรุนแรงของการเกิด irAEs⁽⁴⁴⁾

Severity	Symptoms
Grade 1	Asymptomatic/mild
Grade 2	Moderate
Grade 3	Severe
Grade 4	Life-threatening
Grade 5	Death

2.6.1 กลไกการเกิด Immune-related adverse events (irAEs)

กลไกการเกิด irAEs นั้นยังไม่แน่ชัด แต่มีสมมติฐานคือ เกิดจากการใช้ยาในกลุ่ม ICIs ซึ่งไปรบกวนสมดุลของระบบภูมิคุ้มกัน (immunologic homeostasis) และลด T-cell tolerance นอกจากนี้ ICIs ยังสามารถเพิ่มระดับอโตแอนติบอดี (autoantibodies) และไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (inflammatory cytokines) ได้ ดังนั้น ICIs จึงสามารถรบกวนกลไกการป้องกันตนเอง (self-protect system) ได้ ด้วยเหตุผลที่กล่าวมาข้างต้นจึงทำให้ irAEs มีลักษณะที่คล้ายคลึงกับโรคภูมิคุ้มกันทำลายตนเอง (autoimmune diseases)⁽⁴⁵⁾

ตารางที่ 5 แสดงระบบอวัยวะ, อาการ และระยะเวลาที่เริ่มแสดงอาการ⁽⁴⁴⁾

ระบบอวัยวะ (Organ system)	อาการ	ระยะเวลาที่เริ่มแสดงอาการ
พิษต่อระบบผิวหนัง (Dermatologic toxicities)	dry mouth mucositis rash pruritus vitiligo Stevens-Johnson syndrome (SJS) Bullous Pemphigoid (BP) Drug Reaction with Eosinophilia and	มักปรากฏขึ้นเร็วที่สุดหลังจากได้รับยาในกลุ่ม ICIs ประมาณ 3-6 สัปดาห์

	<p>Systemic Symptoms (DRESS)</p> <p>Acute Generalized Exanthematous Pustulosis (AGEP)</p> <p>Dermatomyositis (DM)</p>	
<p>พิษต่อระบบย่อยอาหาร (Gastrointestinal toxicities)</p>	<p>diarrhea</p> <p>colitis</p> <p>gastritis</p> <p>enteritis</p> <p>hepatitis</p> <p>pancreatitis</p>	<p>ภาวะท้องเสียและลำไส้อักเสบ มักจะเกิดขึ้นหลังจากการเริ่มยาในกลุ่ม ICIs 5-10 สัปดาห์</p> <p>แต่อย่างไรก็ตามบางครั้งอาการดังกล่าวส สามารถเกิดขึ้นหลังจากได้รับยาครั้งแรก หรืออาจเกิดขึ้นหลังจากหยุดยาไปแล้ว (delayed toxicity) สำหรับตับอักเสบ (hepatitis) มักจะเกิดขึ้นใน 6-14 สัปดาห์หลังจากได้รับยาครั้งแรก</p>
<p>พิษต่อระบบต่อมไร้ท่อ (Endocrine toxicities)</p>	<p>hypophysitis</p> <p>hypothyroidism</p> <p>hyperthyroidism</p> <p>Graves' disease</p> <p>hypoparathyroidism</p>	<p>ค่ามัธยฐานของเวลาที่จะเกิดภาวะไทรอย ด์เป็นพิษ (thyroid toxicity) มักจะเกิดขึ้น หลังจากได้รับยาภายใน 3 เดือน</p> <p>แต่ในบางกรณีอาการดังกล่าวสามารถเกิด ขึ้นได้หลังจากหยุดยาไปแล้ว</p>
<p>พิษต่อระบบทางเดินหายใจ (Pulmonary toxicities)</p>	<p>pneumonitis</p> <p>sarcoidosis</p> <p>pleural effusion</p> <p>reactive airway disease</p>	<p>ระยะเวลาเริ่มมีอาการค่อนข้างหลากหลาย</p> <p>โดยอาจจะเริ่มมีพิษต่อระบบทางเดินหายใจ (pulmonary toxicities) หลังจากเริ่มยาไม่กี่วัน ไปจนถึง 19 เดือน โดยอาการแรกเริ่มที่พบบ่อยคือหายใจลำ บาก (dyspnea)</p>

		หรือภาวะพร่องออกซิเจน (hypoxia) แย่งจากเดิม
พิษต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด (Cardiovascular toxicities)	myocarditis pericarditis	ค่ามัธยฐานของเวลาที่จะเกิดกล้ามเนื้อหัวใจอักเสบ (myocarditis) คือ 34 วันหลังจากเริ่มยา ICIs โดยส่วนใหญ่อาการดังกล่าวมักเกิดขึ้นหลังเริ่มยาภายใน 3 เดือน



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 รูปแบบการวิจัย

เป็นงานวิจัยเชิงทดลอง (Experimental Research) โดยทำการทดลองในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงของมนุษย์

3.2 อุปกรณ์ ยา และสารเคมีที่ใช้

3.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

- serological pipette
- pipette tips
- 96-well plate
- plastic tubes
- ชุด ELISA kits (ELISA MAX, BioLegend, San Diego, CA, USA)
- เครื่อง Realtime-polymerase chainreaction (CFX96, Bio-RadLaboratory Inc.)
- centrifuge tube
- centrifuge tube rack
- foambox
- microcentrifuge tube
- micropipette
- micropipette tips
- เครื่อง Centrifuge

3.2.2 ยาที่ใช้ในการวิจัย

- ยาแอนติบอดี Pembrolizumab (Keytruda®) ซึ่งเป็นชนิด fully humanized immunoglobulin (Ig) G4-kappa monoclonal antibody ต่อ PD-1 (anti-PD-1)

3.2.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

- อาหารเลี้ยงเซลล์
- น้ำยา PCR
- Primers
- Trizol

3.3 กลุ่มการทดลอง

3.3.1 การศึกษาผลของยาต่อการสร้างไซโตไคน์ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดียวของมนุษย์

3.3.1.1 การสร้าง IFN γ

- กลุ่มที่ไม่มีการแสดงออกของโปรตีน PD-L1 (CHO wild type)
- กลุ่มที่มีการแสดงออกของโปรตีน PD-L1
- กลุ่มที่มีการแสดงออกของโปรตีน PD-L1 และได้รับยาแอนติบอดี Pembrolizumab 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- กลุ่มที่มีการแสดงออกของโปรตีน PD-L1 และได้รับยาแอนติบอดี Pembrolizumab 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.3.1.2 การสร้าง IL-2

- กลุ่มที่ไม่มีการแสดงออกของโปรตีน PD-L1 (CHO wild type)
- กลุ่มที่มีการแสดงออกของโปรตีน PD-L1
- กลุ่มที่มีการแสดงออกของโปรตีน PD-L1 และได้รับยาแอนติบอดี Pembrolizumab 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- กลุ่มที่มีการแสดงออกของโปรตีน PD-L1 และได้รับยาแอนติบอดี Pembrolizumab 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.3.2 การศึกษาผลของไซโตไคน์ต่อการแสดงออกของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงของมนุษย์

3.3.2.1 การศึกษาผลโดยตรงของยาแอนติบอดี pembrolizumab ต่อการแสดงออกของ CYPs mRNA

- กลุ่มควบคุม คือ กลุ่มที่ไม่ได้รับยาใด ๆ
- กลุ่มที่ได้รับยาแอนติบอดี pembrolizumab 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- กลุ่มที่ได้รับยาแอนติบอดี pembrolizumab 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- กลุ่มที่ได้รับยาที่เหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกที่ลดลงของเอนไซม์ CYPแต่ละชนิด
- กลุ่มที่ได้รับยาที่เหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของเอนไซม์ CYPแต่ละชนิด

3.3.2.2 การศึกษาผลของอาหารเพาะเลี้ยงส่วนใสจาก PBMCs ที่ได้รับ Pembrolizumab ต่อการแสดงออกของ CYPs mRNA ในเซลล์ HepG2

- กลุ่มควบคุม คือ กลุ่มที่ไม่ได้รับยาใด ๆ
- กลุ่มที่ได้รับยาแอนติบอดี pembrolizumab 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- กลุ่มที่ได้รับยาแอนติบอดี pembrolizumab 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- กลุ่มที่ได้รับ IFN γ ที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร
- กลุ่มที่ได้รับ IL-2 ที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร
- กลุ่มที่ได้รับยาที่เหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกที่ลดลงของเอนไซม์ CYPแต่ละชนิด
- กลุ่มที่ได้รับยาที่เหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของเอนไซม์ CYPแต่ละชนิด

3.4 ขั้นตอนการวิจัย

3.4.1 การศึกษาผลของยาต่อการสร้างไซโตไคน์ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด นิวเคลียสเดียวของมนุษย์

ยาแอนติบอดี Pembrolizumab ที่เจือจางในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นำมาบ่มกับเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดียวของมนุษย์ที่แยกมาจากอาสาสมัครสุขภาพดี (human peripheral blood mononuclear cells; PBMCs) ในสภาวะที่มีเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด PD-L1 บนผิวเซลล์ ได้แก่ Chinese hamster ovary cell line (CHO) ที่ถูกดัดแปลงให้มีการแสดงออกของโปรตีน PD-L1 (CHO-PDL1) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำ cell suspension ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บส่วนใส โดยนำส่วนใสมาวิเคราะห์ปริมาณไซโตไคน์ด้วยเทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; Biolegend) เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ IFN γ และ IL2 รวมถึง cytokines อื่น ๆ

3.4.2 การศึกษาผลของไซโตไคน์ต่อการแสดงออกของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงของมนุษย์

นำอาหารเพาะเลี้ยงส่วนใสที่ได้จากการบ่มยาแอนติบอดีกับเซลล์ PBMCs มาบ่มกับเซลล์ตับเพาะเลี้ยงของมนุษย์ ชนิด HepG2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำเซลล์ HepG2 แต่ละกลุ่มไปวัดระดับการแสดงออกของเอนไซม์ CYP แต่ละชนิดด้วยเทคนิค real time Polymerase chain reaction (PCR)

ทำการสกัด total mRNA โดยนำเซลล์ HepG2 แต่ละกลุ่มมาสกัดด้วยน้ำยา Trizol และชุดสกัด mRNA (Qiagen) นำ mRNA ที่ได้ไปทำปฏิกิริยาต่อ และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง real time PCR โดยเทียบระหว่างกลุ่มที่ได้รับยาแอนติบอดีกับกลุ่มควบคุมที่เหมาะสม และเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมบวกที่ประกอบด้วย human recombinant IFN γ หรือ IL2 ที่ละลายในอาหารเพาะเลี้ยง

3.5 สถิติและการวิเคราะห์ข้อมูล

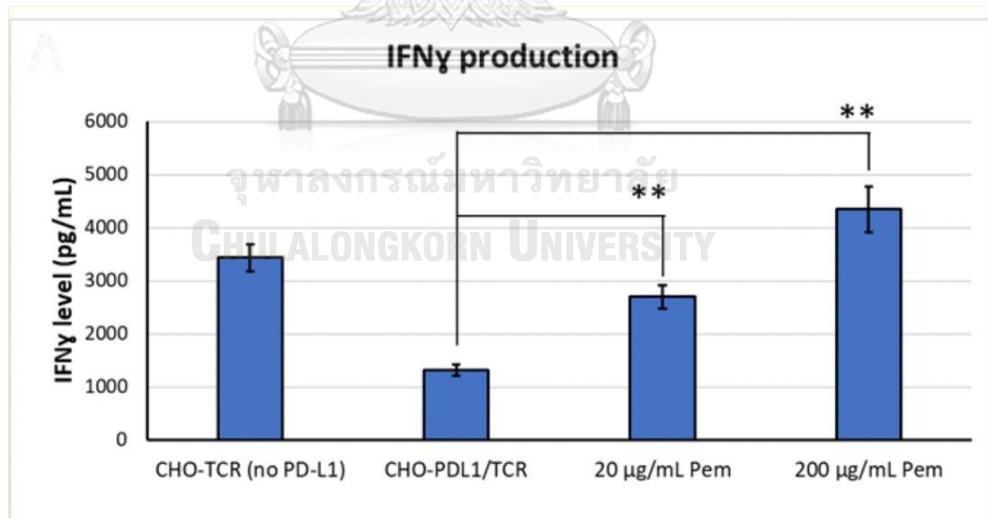
การวิเคราะห์ข้อมูลต่าง ๆ โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS software, version 22.0 (SPSS. Co., Ltd, Bangkok, Thailand) โดยทดสอบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มด้วยการวิเคราะห์แบบ one-way analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยภายหลังการทดสอบรวมโดยใช้ Bonferroni post hoc test ทั้งนี้ในการศึกษาผลของยาต่อการสร้างไซโตไคน์ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวของมนุษย์กำหนดค่า $P < 0.01$ และในการศึกษาผลของไซโตไคน์ต่อการแสดงออกของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงของมนุษย์กำหนดค่า $P < 0.05$ คือมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 4

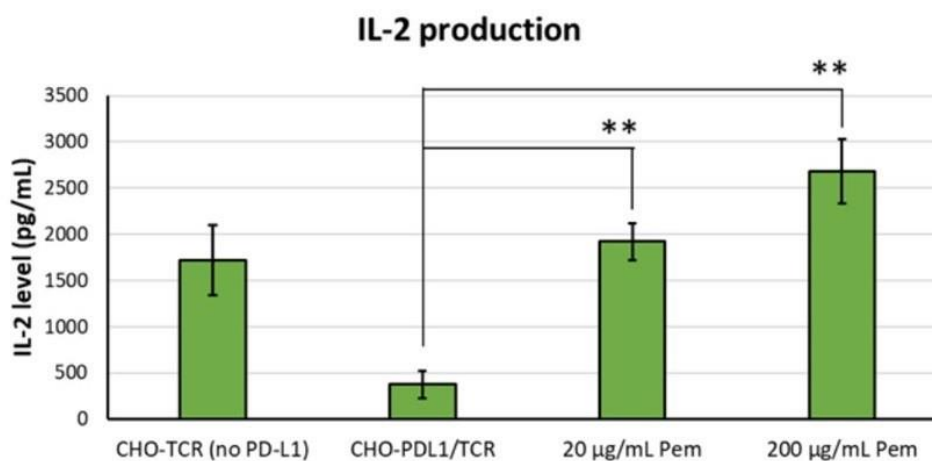
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 ผลวิเคราะห์ปริมาณการสร้างไซโตไคน์ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวของมนุษย์

เพื่อดูผลของยาแอนติบอดี Pembrolizumab ต่อการสร้างไซโตไคน์ในเซลล์กลุ่ม PBMCs ในสถานะที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน PD-L1 คือ CHO-PDL1 พบว่าในกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับยาแอนติบอดี Pembrolizumab นั้น จะมีระดับของไซโตไคน์ ชนิด IFN γ และ IL-2 ในระดับต่ำ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่บ่มกับเซลล์ที่ไม่มีโปรตีน PD-L1 (CHO wild type) แสดงให้เห็นว่าโปรตีน PD-L1 ที่อยู่บนผิวเซลล์จะสามารถจับกับโปรตีน PD-1 บน T cells ใน PBMCs ได้ ส่งผลให้เกิดการกดการสร้างไซโตไคน์ (รูปที่ 7 และรูปที่ 8) และเมื่อให้ยาแอนติบอดี Pembrolizumab ที่ความเข้มข้น 20 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ายาดังกล่าวสามารถเพิ่มระดับของการสร้างไซโตไคน์เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับยาได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P value = 0.002, <0.01 ตามลำดับ) ดังนั้นยาแอนติบอดี Pembrolizumab จึงสามารถฟื้นฟูการสร้างไซโตไคน์โดยไปฟื้นฟูการทำงานของ T cells ที่ถูกยับยั้งจากกลไก PD-1/PD-L1 ส่งผลให้มีระดับของ IFN γ และ IL-2 เพิ่มสูงขึ้น



รูปที่ 7 ผลของยา pembrolizumab ที่ความเข้มข้น 20 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อการสร้าง IFN γ จาก human PBMCs เมื่อเลี้ยงร่วมกับเซลล์ CHO-PDL1 สัญลักษณ์ * แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (CHO-PDL1/TCR) ที่ $P < 0.01$

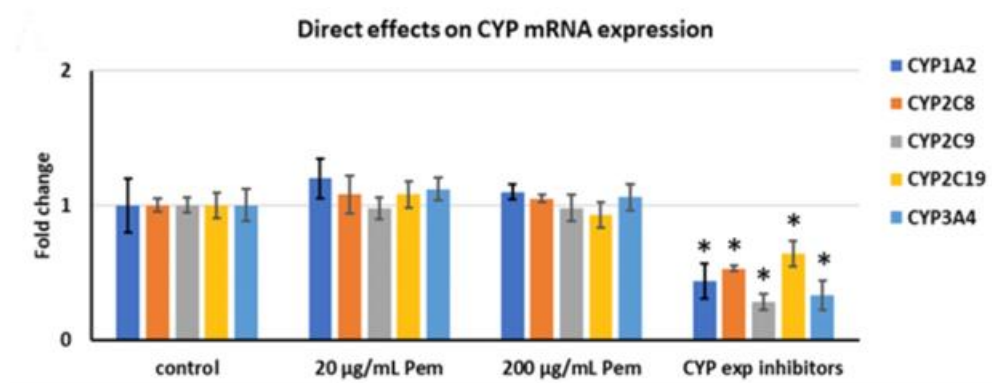


รูปที่ 8 ผลของยา pembrolizumab ที่ความเข้มข้น 20 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อการสร้าง IL-2 จาก human PBMCs เมื่อเลี้ยงร่วมกับเซลล์ CHO-PDL1 สัญลักษณ * แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (CHO-PDL1/TCR) ที่ $P < 0.01$

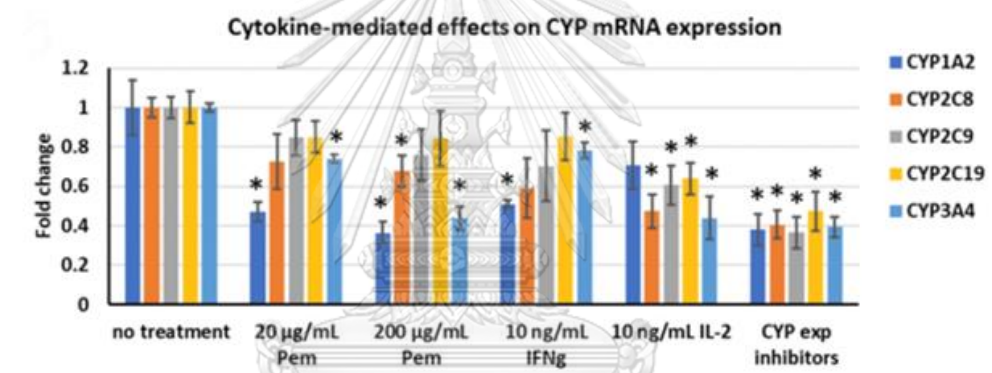
4.2 ผลของไซโตไคน์ต่อการแสดงออกของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450

ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงของมนุษย์

เพื่อดูผลของไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาจาก T cells หลังจากที่ได้รับยาแอนติบอดี pembrolizumab ต่อการแสดงออกของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงของมนุษย์ โดยนำอาหารเพาะเลี้ยงส่วนใสที่ได้มาจาก PBMCs มาบ่มกับเซลล์ตับ HepG2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำไปหาการแสดงออกของระดับ mRNA ด้วยเทคนิค real-time PCR พบว่าอาหารเพาะเลี้ยงส่วนใสจากกลุ่มที่ได้รับ Pembrolizumab ที่ความเข้มข้นทั้ง 20 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลลดการแสดงออกของระดับ mRNA ของเอนไซม์ CYP1A2, CYP2C8 และ CYP3A4 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (P value < 0.05) ในขณะที่ระดับ mRNA ของเอนไซม์ CYP2C9 และ CYP2C19 นั้นมีการเปลี่ยนแปลงอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 10)



รูปที่ 9 แสดงผลโดยตรงของยาแอนติบอดี pembrolizumab ต่อการแสดงออกของ CYPs mRNA โดยการนำ pembrolizumab มาบ่มกับเซลล์ HepG2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำไปวิเคราะห์การ แสดงออกของ CYPs mRNA * แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) ที่ $P < 0.05$



รูปที่ 10 แสดงผลของอาหารเพาะเลี้ยงส่วนใสจาก PBMCs ที่ได้รับ Pembrolizumab ต่อการ แสดงออกของ CYPs mRNA ในเซลล์ HepG2 * แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ กลุ่มควบคุม (control) ที่ $P < 0.05$

บทที่ 5

อภิปรายผลการศึกษา สรุปผล และข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผลการศึกษา

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลทางเภสัชพลศาสตร์ของยากลุ่มภูมิคุ้มกันบำบัดชนิด Immune checkpoint inhibitors ต่อเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงของมนุษย์ ชนิด HepG2 โดยดำเนินการทดสอบผลของยาแอนติบอดี Pembrolizumab ต่อการสร้างไซโตโครม ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดียวของมนุษย์ (PBMCs) และทดสอบผลของไซโตโครมต่อการแสดงออกของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงของมนุษย์ชนิด HepG2 โดยวัดระดับการแสดงออกของเอนไซม์ CYPs แต่ละชนิดด้วยเทคนิค real time Polymerase chain reaction (PCR)

5.2 สรุปผล

ผลทางเภสัชวิทยาของยาแอนติบอดี Pembrolizumab ซึ่งเป็นยา anti-PD1 ในการฟื้นฟูการทำงานของ T cell สามารถนำไปสู่การเพิ่มการหลั่งของไซโตโครมบางชนิด เช่น IFN γ และ IL-2 ซึ่งอาจจะมีผลต่อการแสดงออกของเอนไซม์ในเซลล์ตับได้ และในการศึกษานี้แม้ว่ายาแอนติบอดี Pembrolizumab จะไม่แสดงถึงผลโดยตรงต่อการแสดงออกของเอนไซม์ CYPs ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงของมนุษย์ชนิด HepG2 แต่พบว่าระดับของเอนไซม์ CYP1A2, CYP2C8 และ CYP3A4 มีการลดลงเมื่อเซลล์ตับได้ exposed กับไซโตโครมที่หลั่งออกมาจาก T cells ดังนั้นจึงอาจส่งผลให้ยาที่ต้องใช้เอนไซม์เหล่านี้เปลี่ยนแปลงให้เป็นรูปออกฤทธิ์ (active form) มีประสิทธิภาพลดลง รวมถึงยาที่ต้องใช้เอนไซม์เหล่านี้ในกระบวนการเปลี่ยนแปลงยาเป็นรูปไม่มีฤทธิ์ (inactive form) ก่อนที่จะขจัดออกจากร่างกายนั้นเกิดการขจัดออกได้ช้าลง ส่งผลให้มีระดับยาในเลือดสูงขึ้น และอาจก่อให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยาที่เกิดจากอันตรกิริยาระหว่างยาขึ้นได้ ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงตัวอย่างยาที่มีการใช้ในทางคลินิกซึ่งเป็น substrates ของเอนไซม์ CYPs ในมนุษย์

Enzyme	Substrate	Indication	ADR
CYP1A2	Theophylline	Reversible airflow obstruction	tachycardia, headache, insomnia
	Tizanidine	Spasticity	hepatotoxicity, hypotension, sedation
	Ondansetron	Moderately-Highly emetogenic cancer chemotherapy	QT prolongation, serotonin syndrome, myocardial ischemia
CYP2C8	Paclitaxel (taxol)	Breast cancer, NSCLC	anemia, confusion, seizures
	Pioglitazone	Type 2 Diabetes Mellitus	edema, hypoglycemia,
	Repaglinide	Type 2 Diabetes Mellitus	hypoglycemia, upper respiratory infection, headache
CYP3A4	Simvastatin	Hypercholesterolemia	atrial fibrillation, bronchitis
	Carbamazepine	Prevent and control seizures	cardiac failure, sinus tachycardia
	Aprepitant	Prevention of acute and delayed N/V associated with	alopecia, anorexia, headache

		cancer chemotherapy	
--	--	------------------------	--

5.3 ข้อจำกัด

เนื่องจากการศึกษานี้เป็นเพียงการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงของมนุษย์ แม้ว่าไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาจาก T cells หลังจากที่ได้รับยาแอนติบอดี Pembrolizumab จะส่งผลให้เอนไซม์ CYPs มีการแสดงออกที่ลดลง ซึ่งจะมีผลทางคลินิกเมื่อใช้ร่วมกับยาอื่น ๆ หรือไม่นั้น จะต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

5.4 ข้อเสนอแนะ

เพื่อให้ทราบถึงผลทางคลินิกของยาแอนติบอดี Pembrolizumab หรือยาตัวอื่นในกลุ่ม ICIs เมื่อใช้ร่วมกับยาอื่น ๆ ในมนุษย์ จึงอาจทำการศึกษาในผู้ป่วยที่ได้รับยาแอนติบอดี Pembrolizumab หรือยาในกลุ่ม ICIs เพื่อดูความสัมพันธ์ของระดับไซโตไคน์ในเลือด กับการแสดงออกของเอนไซม์ CYPs ในเซลล์ตับว่ามีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางคลินิกหรือไม่ หรืออาจทำการศึกษาโดยเก็บข้อมูลย้อนหลัง (retrospective study) เพื่อเก็บข้อมูลของผู้ป่วยที่ได้รับยาแอนติบอดี Pembrolizumab หรือยาในกลุ่ม ICIs ว่าระดับยาในเลือดของยาอื่น ๆ ที่เป็น substrate ของเอนไซม์ CYPs นั้นมีการเปลี่ยนแปลงหรือไม่ รวมถึงเกิดอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยาที่เกิดจากอันตรกิริยาระหว่างยาเพิ่มมากขึ้นหรือไม่

นอกจากนี้อาจทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้ยาตัวอื่น ๆ ในกลุ่ม ICIs ที่มีกลไกการยับยั้งการจับโมเลกุลเป้าหมายที่แตกต่างกัน ได้แก่ ยาในกลุ่ม PD-L1 inhibitors คือ Atezolizumab, Durvalumab, Avelumab, และ Cemiplimab รวมทั้งยาในกลุ่ม CTLA-4 inhibitors คือ Ipilimumab

รายการอ้างอิง

1. Organization WH. Cancer 2022 [cited 2022 10 February]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
2. Organization WH. Cancer Today 2022 [cited 2022 10 February]. Available from: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=population&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=0&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0.
3. Organization WH. Thailand
Source: Globocan 2020 2021 [cited 2022 10 February]. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/764-thailand-fact-sheets.pdf>.
4. Healthv Nlo. Targeted Cancer Therapies 2022 [cited 2022 10 February]. Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/targeted-therapies/targeted-therapies-fact-sheet>.
5. Huang Z, Su W, Lu T, Wang Y, Dong Y, Qin Y, et al. First-Line Immune-Checkpoint Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer: Current Landscape and Future Progress. *Front Pharmacol*. 2020;11:578091.
6. van Leeuwen RWF, Jansman FGA, van den Bemt P, de Man F, Piran F, Vincenten I, et al. Drug-drug interactions in patients treated for cancer: a prospective study on clinical interventions. *Ann Oncol*. 2015;26(5):992-7.
7. Scripture CD, Figg WD. Drug interactions in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(7):546-58.
8. Huang SM, Zhao H, Lee JI, Reynolds K, Zhang L, Temple R, et al. Therapeutic protein-drug interactions and implications for drug development. *Clin Pharmacol Ther*. 2010;87(4):497-503.
9. FP T. Current knowledge on clearance mechanisms: drug-drug interaction potential for monoclonal antibodies with other protein biotherapeutics and small molecule drugs. *AAPS Natl Biotechnol Conf*. 2008:22-5.

10. Islam M, Frye RF, Richards TJ, Sbeitan I, Donnelly SS, Glue P, et al. Differential effect of IFN α -2b on the cytochrome P450 enzyme system: a potential basis of IFN toxicity and its modulation by other drugs. *Clin Cancer Res.* 2002;8(8):2480-7.
11. Gidal BE, Reiss WG, Liao JS, Pitterle ME. Changes in interleukin-6 concentrations following epilepsy surgery: potential influence on carbamazepine pharmacokinetics. *Ann Pharmacother.* 1996;30(5):545-6.
12. Christensen H, Hermann M. Immunological response as a source to variability in drug metabolism and transport. *Front Pharmacol.* 2012;3:8.
13. Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics.* 2013;138(1):103-41.
14. Zuber R, Anzenbacherová E, Anzenbacher P. Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. *J Cell Mol Med.* 2002;6(2):189-98.
15. Totah RA, Rettie AE. Cytochrome P450 2C8: substrates, inhibitors, pharmacogenetics, and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther.* 2005;77(5):341-52.
16. Deeks ED. Pembrolizumab: A Review in Advanced Melanoma. *Drugs.* 2016;76(3):375-86.
17. Medina PJ, Adams VR. PD-1 Pathway Inhibitors: Immuno-Oncology Agents for Restoring Antitumor Immune Responses. *Pharmacotherapy.* 2016;36(3):317-34.
18. Liu J, Chen Z, Li Y, Zhao W, Wu J, Zhang Z. PD-1/PD-L1 Checkpoint Inhibitors in Tumor Immunotherapy. *Front Pharmacol.* 2021;12:731798.
19. BANCROFT D. Rabbit Antibodies proven to be more specific than Mice in Immuno-oncology PD-L1 Research 2015 [cited 2022 16 February]. Available from: <https://www.labiotech.eu/trends-news/rabmabs-monoclonal-antibodies-from-mice-alpacas-hamsters-rabbits/>.
20. Desta Z, Flockhart DA. Chapter 18 - Pharmacogenetics of Drug Metabolism. In: Robertson D, Williams GH, editors. *Clinical and Translational Science (Second Edition)*: Academic Press; 2017. p. 327-45.
21. KEYTRUDA® (pembrolizumab) injection, for intravenous use Initial U.S. Approval: Merck&CO., Inc. ; 2014 [Available from: <https://www.bayer.ca/omr/online/xarelto-pm-en.pdf>].

22. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* 2004;75(2):163-89.
23. Aitken AE, Morgan ET. Gene-specific effects of inflammatory cytokines on cytochrome P450 2C, 2B6 and 3A4 mRNA levels in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* 2007;35(9):1687-93.
24. Donato MT, Guillén MI, Jover R, Castell JV, Gómez-Lechón MJ. Nitric oxide-mediated inhibition of cytochrome P450 by interferon-gamma in human hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997;281(1):484-90.
25. Theophylline: Hudson (OH): Lexicomp, Inc.; [updated 1 February 2022; cited 2022 13 February]. Available from: <http://online.lexi.com>.
26. Tizanidine: Hudson (OH): Lexicomp, Inc.; 2022 [updated 12 February 2022; cited 2022 13 February]. Available from: <http://online.lexi.com>.
27. Propranolol: Hudson (OH): Lexicomp, Inc.; 2022 [updated 9 February 2022; cited 2022 13 February]. Available from: <http://online.lexi.com>.
28. Warfarin: Hudson (OH): Lexicomp, Inc.; 2022 [updated 1 February 2022; cited 2022 13 February]. Available from: <http://online.lexi.com>.
29. Paclitaxel: Hudson (OH): Lexicomp, Inc.; 2022 [updated 1 February 2022; cited 2022 13 February]. Available from: <http://online.lexi.com>.
30. Pioglitazone: Hudson (OH): Lexicomp, Inc.; 2022 [updated 12 February 2022; cited 2022 13 February]. Available from: <http://online.lexi.com>.
31. Amiodarone: Hudson (OH): Lexicomp, Inc.; 2022 [updated 1 February 2022; cited 2022 13 February]. Available from: <http://online.lexi.com>.
32. Chloroquine: Hudson (OH): Lexicomp, Inc.; 2022 [updated 16 January 2022; cited 2022 13 February]. Available from: <http://online.lexi.com>.
33. Simvastatin: Hudson (OH): Lexicomp, Inc.; 2022 [updated 16 February 2022; cited 2022 16 February]. Available from: <http://online.lexi.com>.
34. Atorvastatin: Hudson (OH): Lexicomp, Inc.; 2022 [updated 15 February 2022; cited 2022 16 February]. Available from: <http://online.lexi.com>.
35. Docetaxel: Hudson (OH): Lexicomp, Inc.; 2022 [updated 1 February 2022; cited 2022 16 February]. Available from: <http://online.lexi.com>.

36. Tacrolimus: Hudson (OH): Lexicomp, Inc.; 2022 [updated 1 February 2022; cited 2022 16 February]. Available from: <http://online.lexi.com>.
37. Morphine: Hudson (OH): Lexicomp, Inc.; 2022 [updated 15 February 2022; cited 2022 16 February]. Available from: <http://online.lexi.com>.
38. Carbamazepine: Hudson (OH): Lexicomp, Inc.; 2022 [updated 15 February 2022; cited 2022 16 February]. Available from: <http://online.lexi.com>.
39. Diclofenac: Hudson (OH): Lexicomp, Inc.; 2022 [updated 12 February 2022; cited 2022 16 February]. Available from: <http://online.lexi.com>.
40. Tolbutamide: Hudson (OH): Lexicomp, Inc.; 2022 [updated 16 January 2022; cited 2022 16 January]. Available from: <http://online.lexi.com>.
41. Omeprazole: Hudson (OH): Lexicomp, Inc.; 2022 [updated 15 January 2022; cited 2022 15 January]. Available from: <http://online.lexi.com>.
42. Phenytoin: Hudson (OH): Lexicomp, Inc.; 2022 [updated 16 January 2022; cited 2022 13 February]. Available from: <http://online.lexi.com>.
43. Clopidogrel: Hudson (OH): Lexicomp, Inc.; 2022 [updated 1 February 2022; cited 2022 16 February]. Available from: <http://online.lexi.com>.
44. Darnell EP, Mooradian MJ, Baruch EN, Yilmaz M, Reynolds KL. Immune-Related Adverse Events (irAEs): Diagnosis, Management, and Clinical Pearls. *Curr Oncol Rep.* 2020;22(4):39.
45. Choi J, Lee SY. Clinical Characteristics and Treatment of Immune-Related Adverse Events of Immune Checkpoint Inhibitors. *Immune Netw.* 2020;20(1):e9.