

บทคัดย่อ

DBG5480010

การนำส่งยาต้านมะเร็งรูปแบบอนุภาคนาโนหลายหน้าที่สู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวจากผู้ป่วย
อย่างจำเพาะเจาะจง

ชฎารัตน์ อัมพะเสวต^{1*}, ทรงยศ อนุชปรีดา², รังษิณี พงษ์ประดิษฐ์¹, พิมพ์ลักษณ์ เจริญขวัญ³ อติศักดิ์
ตันติวรวิทย์⁴

¹ภาควิชาวิทยาศาสตร์เภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

²ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

³ภาควิชาภูมิเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

⁴ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

จ.เชียงใหม่ 50200 ประเทศไทย

E-mail Address : chadarat.a@cmu.ac.th และ aimchadarat@windowslive.com

ระยะเวลาโครงการ: 2554 - 2557

การนำส่งยาแบบมุ่งเป้าสู่เซลล์มะเร็งเป็นงานที่ท้าทายที่จะเอาชนะการรักษามะเร็งด้วยยาแบบดั้งเดิมที่ทำลายเซลล์แบบไม่จำเพาะโดยทำลายทั้งเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ ในการวิจัยนี้จึงมุ่งหวังที่จะพัฒนาและประเมินระบบนำส่งยาอย่างจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่มีการแสดงออกของโปรตีนสูงบนผิวเซลล์ คือโปรตีน Lymphocyte Function Associated Antigen-1 (LFA-1) และ Feline McDonough Sarcoma-Like Tyrosine kinase 3 (FLT3) นอกจากนั้นยังมีการตรวจวัดระดับของโปรตีนเหล่านี้บนเซลล์ไขกระดูกจากผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวโดยวิธีโพลีไซโตเมตรีที่รวดเร็ว ประหยัด และน่าเชื่อถือ ด้วยหลักการการจับกันระหว่างแอนติบอดีที่เรืองแสงได้กับโปรตีนเป้าหมายบนผิวเซลล์ ในการเตรียมระบบนำส่งอนุภาคนาโนไปยังเซลล์ที่มี LFA-1 ได้ทำการสังเคราะห์อนุภาคนาโนที่มีเปปไทด์ cIBR ติดอยู่ (cIBR-NPs) และมีการกักเก็บตัวยาต้านมะเร็ง paclitaxel (Taxol[®]) โดยวิธีต่างๆ พบว่าการเชื่อมต่อแบบ coupling ระหว่างแกนอนุภาคนาโนกับเปปไทด์ cIBR ทำให้ได้ระบบที่กักเก็บยาเพื่อส่งตรงสู่เป้าหมาย การนำเข้าสู่เซลล์ การปลดปล่อยยา และความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่มี LFA-1 ได้สูงที่สุด ความจำเพาะเจาะจงของระบบนำส่งสู่เซลล์ที่มี LFA-1 แสดงได้จากการจับและนำเข้าเซลล์ที่มีการผสมและไม่ผสมระหว่างเซลล์

ต้นแบบที่มี LFA-1 คือเซลล์ Molt-3 กับเซลล์ที่ไม่มี LFA-1 คือ PBMC โดยพบความสัมพันธ์ของการมี LFA-1 กับการนำระบบนำส่งเข้าสู่เซลล์ และเช่นเดียวกันกับการทดสอบกับเซลล์จากผู้ป่วย เมื่อทำการทดสอบกับเซลล์ที่ได้จากผู้ป่วย 57 ราย ที่ถูกวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาว ชนิด B-ALL, T-ALL และ AML โดยพบว่าระดับ LFA-1 สูงสามารถเจอได้ในมะเร็งที่ศึกษาทุกชนิด พบประมาณ 43-44 % ในแต่ละกลุ่ม การแสดงออกของ LFA-1 ในกลุ่มเด็กและผู้ใหญ่มีความแตกต่างกันมาก ในกลุ่มเด็กที่เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาว (อายุ < 15 ปี) เป็นมะเร็งชนิด B-ALL ถึง 80 % และพบว่ามีระดับ LFA-1 สูงในกลุ่มที่พักรักษา ซึ่งลักษณะนี้ในพบในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวที่เป็นผู้ใหญ่ที่มักพบว่าเป็นมะเร็งชนิด AML เป็นส่วนใหญ่ และระดับของ LFA-1 พบว่าค่อนข้างสูงในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นกลุ่มที่กลับมาเป็นซ้ำและต้องการรักษา (52.91) ซึ่งสูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยใหม่ ที่กำลังมีอาการ (24.97) นอกจากนั้นระดับของโปรตีน LFA-1 ยังสัมพันธ์อย่างมากต่อการนำ cIBR-NP เข้าสู่เซลล์ ($p < 0.0001$) แสดงถึงความจำเพาะเจาะจงของระบบนำส่งยาต่อเซลล์ชนิดนี้ สำหรับการศึกษากการแสดงออกที่สูงของโปรตีน FLT3 บนผิวเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ได้เริ่มจากการพัฒนาวิธีการตรวจวัด โดยอาศัยหลักการการจับกันระหว่างแอนติบอดีและ FLT3 บนผิวเซลล์ ก่อนการนำไปวัดด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ ในสภาวะการเตรียมตัวอย่างและการวิเคราะห์ที่เหมาะสม พร้อมทั้งเปรียบเทียบกับหาปริมาณด้วยวิธี Western-blot analysis แบบดั้งเดิม โดยใช้ EoL-1 cell line ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการแสดงออกสูงของโปรตีน FLT3 เป็นต้นแบบของเซลล์ควบคุมทางบวก จากวิธีที่ได้นำไปตรวจวัดหาระดับการแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์ไขกระดูกที่ได้จากผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวจำนวน 41 ราย ซึ่งพบการแสดงออกของโปรตีนสำคัญนี้ในผู้ป่วยทุกกลุ่มที่ศึกษา (B-ALL, T-ALL และ AML) ในระดับที่แตกต่างกัน โดยพบว่าปริมาณ FLT3 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มที่มีอาการกลับมาเป็นซ้ำและต้องการรักษา ซึ่งสอดคล้องกับที่มีรายงานว่าปริมาณ FLT3 ที่สูงสัมพันธ์กับการทำนายโรคที่ไม่ดี และท้ายสุดการพัฒนากระบวนการนำส่งยา โดยใช้สารเคอร์คิวมินจากขมิ้นชันเป็นต้นแบบ พบว่าการเตรียมระบบนำส่งที่มีเปปไทด์ที่จำเพาะต่อโปรตีน FLT3 เมื่อจับกับโพลิเมอร์ และเตรียมเป็นไมเซลล์ สามารถนำส่งได้อย่างจำเพาะต่อเซลล์ที่มีการแสดงออกของ FLT3 บนผิวเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวสูงได้ ดังนั้นการพัฒนากระบวนการนำส่งหลายหน้าที่ที่มีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเป้าหมายนี้ สามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนา

ระบบนำส่งยาที่มีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง และมีความเป็นไปได้ในการพัฒนาต่อเพื่อใช้ในทางคลินิกได้ในอนาคต

คำสำคัญ ระบบนำส่งยา อนุภาคนาโนเปปไทด์คอนจูเกต มะเร็งเม็ดเลือดขาว Lymphocyte Function Associated Antigen-1 (LFA-1), Feline McDonough Sarcoma-like tyrosine kinase 3 (FLT3) เซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนเกินปกติ

Abstract

Project Code : DBG5480010

Specific Delivery of Multi-functional Anticancer Nanoparticles to Patient Leukemic Cells

Chadarat Ampasavate^{1*}, Songyot Anuchapreeda², Rungsinee Phongpradist¹, Pimlak Jaroenkuan³ and Adisak Tantiworawit⁴

¹Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University,

²Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University,

³Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chiang Mai University,

⁴Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, 50200 Thailand.

E-mail Address : chadarat.a@cmu.ac.th และ aimchadarat@windowslive.com

ระยะเวลาโครงการ: 2554 - 2557

Targeted drug delivery to cancer cells is a challenge way to overcome the nonspecific chemotherapy in cancer. The aims of this study were to develop and evaluate specific drug delivery systems for specific targeting to certain leukemic cells with over-expressed cell-surface proteins, Lymphocyte Function Associated Antigen-1 (LFA-1) and Feline McDonough Sarcoma-like tyrosine kinase 3 (FLT3). In addition, determination of these targeted proteins on leukemic patient bone marrow cells was performed with rapid, economical and validated flow cytometric methods after dye-antibody conjugation to the protein markers. The cIBR-conjugated nanoparticles (cIBR-NPs) were synthesized to entrap the paclitaxel (Taxol[®]) as the anticancer agent. The coupling between nanoparticle core and cIBR peptide yielded the highest entrapment efficiency, targetability, uptake, drug releasing, and cytotoxicity against the LFA-1 expressing cells. The specific uptake of cIBR-NPs was exhibited with mixed cell culture model (Molt-3 and PBMC) and

leukemic cells from patients. In 57 cases diagnosed with B-ALL, T-ALL and AML, high LFA-1 level samples were found in all studied types, approximately 43-44 % in each group. LFA-1 expression characters were different between child and adult patients. In young leukemic patients (< 15 years old), B-ALL was a dominant leukemia (80 %) and expressed significantly high levels of LFA-1 in remission group. This difference was not found in adult patients, in which AML was the major leukemia. The LFA-1 level was found higher in relapse and refractory group (52.91) than the new diagnosis patients (24.97). In addition, strong relationship between LFA-1 levels and cIBR-NP uptake into the cells was found in this study ($p < 0.0001$). For investigation of FLT3 overexpressing leukemic cells, antibody-ligand on cell-surface interaction had been developed and validated with flow cytometric method. Optimal conditions for cell treatment and analysis were titrated and compared with the conventional Western-blot analysis. EoL-1 cell line, the positive control cells, was employed as the FLT3 overexpressed cell model. The degree of FLT-3 expression on bone marrow leukemic cells (41 cases) was monitored using the developed protocol. This protein marker was found in all cell types, B-ALL, T-ALL and AML with different levels. The level of FLT3 was significantly different in patients with relapse and refractory status which referred to the poor prognosis in this group. Finally, the FLT3-specific curcumin loaded polymeric micelles had been fabricated and evaluated for treating FLT3-overexpressing leukemic cells. Consequently, the investigation of these multi-functions drug delivery devices can be the guidance for development of specific drug delivery system targeted to leukemic cells with possible clinical application in the future.

Keywords: drug delivery system, peptide-conjugate nanoparticle, leukemia, Lymphocyte

Function Associated Antigen-1 (LFA-1), Feline McDonough Sarcoma-like tyrosine kinase 3 (FLT3) protein-overexpressing cells