



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: อิทธิพลของความหลากหลายทางพันธุกรรมของ
UGT1A1 และ ABCB1 ต่อเภสัชจลนศาสตร์และพิษของยา
ไอริโนทีแคนในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่

โดย ผศ. ดร. พ.อ.หญิง จีราณัฐ ตันคณิตเลิศ
สังกัดภาควิชาเภสัชวิทยา วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า
315 ถนนราชวิถี แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

เสร็จโครงการ เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2558

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: อิทธิพลของความหลากหลายทางพันธุกรรมของ UGT1A1 และ
ABCB1 ต่อเภสัชจลนศาสตร์และพิษของยาไอริโนทีแคน
ในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่

โดย ผศ. ดร. พ.อ.หญิง จีราหนู ตันคณิตเลิศ
สังกัดภาควิชาเภสัชวิทยา วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า
315 ถนนราชวิถี แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและวิทยาลัยแพทยศาสตร์
พระมงกุฎเกล้า

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของบุคคลหลายฝ่ายอันประกอบด้วย เจ้าหน้าที่ภาควิชาเภสัชวิทยา วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้าและภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาลัยมหิดล ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือเป็นอย่างดี ตลอดจนผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่ทุกท่าน นอกจากนี้ยังได้รับการช่วยเหลือและให้คำแนะนำอย่างดีเลิศจากนักวิจัยที่ปรึกษา รศ. ดร. นพวรรณ ภูมาลา มอราเลส และที่สำคัญโครงการวิจัยนี้จะไม่สำเร็จได้หากไม่ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจาก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)และวิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า

คณะผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง มา ณ โอกาสนี้

ผศ.ดร.พ.อ.หญิง

(จีราหนู ตันคณิตเลิศ)

หัวหน้าโครงการ

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ RSA5580033
 ชื่อโครงการ อิทธิพลของความหลากหลายทางพันธุกรรมของ UGT1A1 and ABCB1 ต่อเภสัชจลนศาสตร์และพิษของยาไอริโนทีแคนในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่
 ชื่อนักวิจัย ผศ.ดร.พินเอกหญิง จีรานูช ตันคณิตเลิศ
 ภาควิชาเภสัชวิทยา วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า
 โทรศัพท์ e: 02-354-7752, 086-460-1773
 E-mail address :Jeeranuts@yahoo.com, iranut@pmk.ac.th

ระยะเวลาโครงการ 3 ปี

ยาไอริโนทีแคน (7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidinocarbonyloxy]camptothecin; CPT-11) เป็นยารักษามะเร็งลำไส้ใหญ่ที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย ซึ่งมีค่าความปลอดภัยต่ำและมีความผันแปรในประสิทธิภาพการรักษาและผลข้างเคียงของยาค่อนข้างมาก ยาจะถูกเปลี่ยนแปลงที่ตับเป็นหลักได้ 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin; SN-38 ซึ่งเป็นเมตาโบไลต์ที่มีฤทธิ์แรงกว่ายาแม่ SN-38 จะถูกกำจัดด้วยกระบวนการ glucuronidation ได้เป็น SN-38G ซึ่งกระบวนการนี้ต้องอาศัยเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญคือ UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A1) และยังถูกขจัดได้โดยอาศัยโปรตีนที่เป็นตัวพาเฉพาะเช่น ABCB1 ความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบ UGT1A1*6 และ ABCB1*2 พบมากในคนไทย และเกือบไม่พบ genotype นี้เลยในชนผิวขาว และความผิดปกตินี้มีความเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงยาโดยทำให้ระดับ SN-38 สูงขึ้นและมีผลข้างเคียงมาก เช่นเม็ดเลือดขาวต่ำ ท้องเสีย ชีตเป็นต้น แม้จะพบความถี่ของ UGT1A1*6 และ ABCB1*2 ในคนไทยมากกว่าคนผิวขาวแต่ การศึกษาเกี่ยวกับผลการเกิดร่วมกันของ UGT1A1*6 และ ABCB1*2 ต่อยาไอริโนทีแคน ยังมีน้อยมากและข้อมูลที่มีอยู่ในปัจจุบันก็เป็นการศึกษาในรูปแบบและขนาดของยาที่แตกต่างกัน ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาถึงอิทธิพลของ UGT1A1*6 และ ABCB1*2 ต่อเภสัชจลนศาสตร์ และการเกิดพิษหรือผลข้างเคียงของยาไอริโนทีแคนในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่ ซึ่งต้องใช้เครื่องมือและการพัฒนาเทคนิควิธีการวัดให้เหมาะสม ถูกต้อง แม่นยำและครอบคลุมระดับยาและเมตาโบไลต์ของยา โดยใช้เครื่อง UHPLC-MS/MS คอลัมน์ที่ใช้เป็น Hypersil Gold column(1.9 μ m, 100 mm x 2.1 mm) สารละลายที่ใช้เป็นตัวพาและเมตาโบไลต์เป็นกรดฟอร์มิก 0.1 % ในน้ำและเมทานอล 100% เลือกใช้ positive ion mode และ selected reaction monitoring พบว่า CPT-11 ถูกชะล้างออกมาที่เวลา 1.88 นาที ระดับต่ำสุดที่สามารถวัดได้เป็น 1 ng/mL, SN-38 ถูกชะล้างออกมาที่เวลา 2.7 นาที ระดับต่ำสุดที่สามารถวัดได้เป็น 0.1 ng/mL และ SN-38G ถูกชะล้างออกมาที่เวลา 1.5 นาที ระดับต่ำสุดที่สามารถวัดได้เป็น 1 ng/mL และ CPT ซึ่งใช้เป็น internal standard ถูกชะล้างออกมาที่เวลา 2.6 นาที ระดับต่ำสุดที่สามารถวัดได้เป็น 1 ng/mL โดย standard ทุกตัวค่าความถูกต้องอยู่ในช่วง 81.97-110 % และค่าความคลาดเคลื่อนอยู่ในช่วง 0.01-13.3 % กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารกับค่าที่เครื่องวัดได้ พบความสัมพันธ์เป็นแบบเส้นตรง ($R^2 > 0.994$) โดยใช้ความเข้มข้นของ CPT-11 อยู่ในช่วง

10-1000 ng/mL ความเข้มข้นของ SN-38 อยู่ในช่วง 1-300 ng/mL และความเข้มข้นของ CPT อยู่ในช่วง 10-300 ng/mL วิธีการนี้ได้นำมาใช้วัดยาและเมตาโบไลต์ในตัวอย่างเลือดที่ได้จากคนไข้มะเร็งลำไส้ใหญ่ ที่มี UGT1A1*6 และ ABCB1*2 ที่แตกต่างกัน ที่ได้รับยาไอริโนทีแคน ขนาด 180 mg/m² จำนวน 3 ราย โดยเก็บตัวอย่างเลือด ก่อนและหลังได้รับยาที่เวลา 0.5, 2, 4, 8, 12, และ 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการวัดระดับยาและเมตาโบไลต์ ผลแสดงให้เห็นว่า UGT1A1*6 homozygote มีแนวโน้มทำให้ระดับ SN-38 สูงขึ้น ในขณะที่ผู้ป่วยที่มี ABCB1*2 heterozygote มีระดับของ CPT-11 และ SN-38 สูงขึ้นด้วย ไม่พบผลข้างเคียงที่รุนแรงระดับ 3 หรือ 4 ในผู้ป่วยทุกราย

กล่าวโดยสรุปคือการพัฒนาการตรวจวัดระดับยาและเมตาโบไลต์ด้วย UHPLC-MS/MS ในการศึกษาวิจัยนี้ สามารถวัดระดับ CPT-11, SN-38 และ SN-38G ได้ครอบคลุมระดับยาในพลาสมา และมีความถูกต้องและเที่ยงตรง อีกทั้งการเตรียมตัวอย่างที่ไม่ซับซ้อนและกระบวนการวิเคราะห์ที่ใช้เวลาน้อย สามารถนำไปใช้ในการตรวจวัด CPT-11, SN-38 และ SN-38G ในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่ที่มี UGT1A1*6 and ABCB1*2 แตกต่างกันเป็นครั้งแรก

Abstract

Project Code : RSA5580033

Project Title : Influence of UGT1A1 and ABCB1 genetic variances on pharmacokinetics and toxicity of irinotecan in patients with colorectal cancer

Investigator : Assist. Prof. Dr. Col. Jeeranut Tankanitlert

Department of Pharmacology

Phramongkutklao College of Medicine

Telephone: 02-354-7752, 086-460-1773

E-mail address :Jeeranuts@yahoo.com, jeeranut@pmk.ac.th

Project Period : 3 years

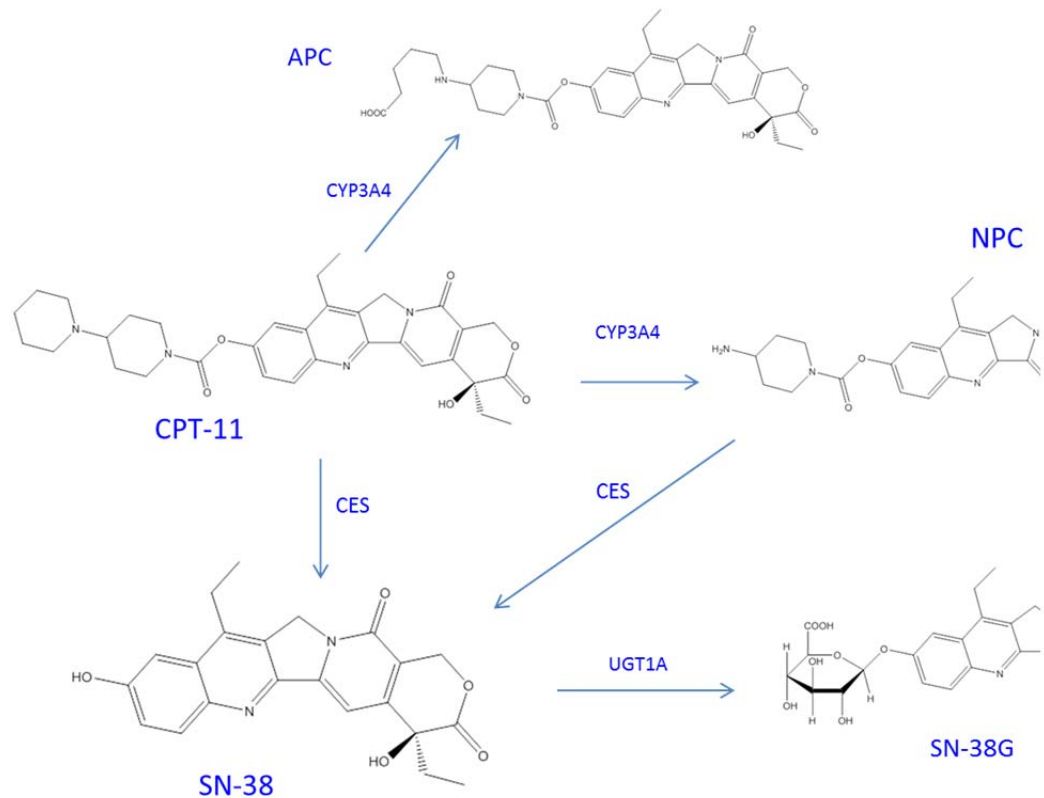
Irinotecan (7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidinocarbonyloxy]camptothecin (CPT-11) is a widely used for advanced colorectal cancer. It is converted to 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) mediated by UGT1A1 to produce SN-38 glucuronide (SN-38G). Many studies had described a wide range of the drug efficacy and toxicity focusing on genetic variances especially UGT1A1*28, UGT1A1*6 and ABCB1*2 which closely related to irinotecan-induced toxicity. Even though the frequencies of UGT1A1*6 and ABCB1*2 were higher in Asian than Caucasian, but only few studies had revealed the effect of concurrence of UGT1A1*6 and ABCB1*2 on irinotecan in patient with advanced colorectal cancer. To understand the influence of these genetic variances on the drug and its major metabolites, an analytical method should be sensitive and effective. The purpose of this study were to validate method by using UHPLC-MS/MS to obtain sensitivity for the low level of CPT-11 and its metabolites and study the effect of UGT1A1*6 and ABCB1*2 on pharmacokinetics and toxicity of irinotecan in patients with advanced colorectal cancer. The Hypersil Gold column (1.9 μ m, 100 mm x 2.1 mm) was selected and 0.1 % formic acid in water and 100% methanol was used as mobile phase. A positive ion mode and a selected reaction monitoring were used. The retention time were 1.88, 2.7, 1.5 and 2.6 min for CPT-11, SN-38, SN-38G, and CPT as internal standard, respectively. The limit of quantification (LOQ) were 0.1 ng/mL for SN-38 and 1 ng/mL for CPT-11 and CPT. The accuracy and coefficient of variation of all standards ranged from 81.97-110 % and 0.01-13.3 %, respectively. The calibration curves of all standards were linear ($R^2 > 0.994$) over the concentration ranges from 1-1000 ng/mL for CPT-11 and 1-300 ng/mL for SN-38 and CPT. This method was applied to three advanced colorectal cancer patients with different UGT1A1*6 and ABCB1*2 genotypes. After, 180 mg/m² of irinotecan (FOFLIRI) was administered by intravenous infusion within 1.5 hr, blood samples were collected

for 24 hours. Plasma levels of CPT-11 and its metabolites were measured by UHPLC-MS/MS. Our results showed that the UGT1A1*6 homozygote seem to associate with the increase of SN-38 plasma level and ABCB1*2 heterozygote may associate with the increase of CPT-11 plasma level. This analytical method is a rapid and sensitive method for CPT-11 and its metabolites because of its uncomplicated sample preparation and high sensitivity. This method was first applied to determine CPT-11 and its metabolites in advanced colorectal cancer patients with different UGT1A1*6 and ABCB1*2 genotypes.

ความสำคัญและที่มาของปัญหาในการทำวิจัย

โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่เป็นมะเร็งที่เกิดขึ้นจากเซลล์ที่เกิดขึ้นจากเซลล์เยื่อบุของลำไส้ใหญ่มีการเปลี่ยนแปลงและเจริญเติบโตผิดปกติจนมีลักษณะเป็นก้อนขึ้นมา รวมถึงสามารถที่จะกระจายไปยังที่อื่นๆ สาเหตุของการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ยังไม่ชัดเจนว่าเกิดจากอะไร แต่ที่ทราบคือปัจจัยเสี่ยงที่อาจส่งผลให้โอกาสการเกิดมะเร็งสูงขึ้น แม้จะไม่ได้เป็นสาเหตุโดยตรงก็ตาม ปัจจัยเสี่ยงดังกล่าวได้แก่ อายุ 50 ปี หรือมากกว่า ประวัติมะเร็งลำไส้ใหญ่ในครอบครัวโดยเฉพาะถ้าบุคคลนั้นเป็นญาติสายตรงและได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ก่อนอายุ 60 ปี มีประวัติเป็นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งรังไข่ มะเร็งมดลูก และมะเร็งเต้านม มีประวัติเป็นติ่งเนื้อในลำไส้ใหญ่ มีประวัติเป็นลำไส้อักเสบเรื้อรัง (inflammatory bowel disease) โรคอ้วน สูบบุหรี่ การรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่นั้นขึ้นอยู่กับระยะและตำแหน่งที่เป็น ซึ่งในปัจจุบันการรักษาได้พัฒนามากขึ้นทำให้ผู้ป่วยมีชีวิตที่ยืนยาวมากขึ้นและมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้นด้วย การรักษาประกอบไปด้วยการผ่าตัด การรักษาด้วยยาเคมีบำบัดทั้งในส่วนที่ใช้ในการรักษาเสริมภายหลังการผ่าตัดหรือการรักษาในผู้ป่วยที่อยู่ในระยะแพร่กระจายก็ตาม และการรักษาประคับประคอง เช่น การฉายรังสีเพื่อควบคุมอาการปวดและอาการอื่น ที่เกิดจากโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ และการใช้ยาเพื่อบรรเทาอาการปวดจากโรคมะเร็ง เป็นต้น

ยาไอริโนทีแคน (7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidinocarbonyloxy]camptothecin, CPT-11, Camtosar[®], Camtow[®]) เป็นยารักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ระยะแพร่กระจายที่ใช้กันมากและเป็นยาที่มีค่าความปลอดภัยแคบ (narrow therapeutic index) ยาออกฤทธิ์โดยการยับยั้ง Topoisomerase I (topo-1) CPT-11 เป็นอนุพันธ์ของ camptothecin (CPT) ซึ่งเป็นสารกึ่งสังเคราะห์ที่ละลายน้ำได้ อาจใช้ irinotecan เป็นแบบ monotherapy หรือให้ร่วมกับ 5-fluorouracil หรือ leucovorin (FOLFIRI) โดยการฉีดเข้าหลอดเลือดดำที่เตี๋ยหมดหรือหยดเข้าหลอดเลือดดำ และพบว่ามีอัตราการรอดชีวิตยาวนานกว่าการใช้ 5-fluorouracil หรือ leucovorin เพียงอย่างเดียว ตัวยาแม่ (CPT-11) จะถูกเปลี่ยนแปลงโดยเอนไซม์ carboxylesterase-2 (CES) ได้เมตาโบไลต์เป็น 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) ซึ่งเป็น active metabolite มีพิษต่อการแบ่งเซลล์ใน s-phase และมีฤทธิ์แรงกว่ายาแม่ประมาณ 100-1000 เท่า นอกจากนี้ CPT-11 ยังถูกเปลี่ยนแปลงโดยเอนไซม์ cytochrom P450 (CYP3A4) ผ่านทาง oxidative pathway ได้เป็น 7-ethyl-10-[4-N-(5 aminopentanoic acid)-1-piperidino] carbonyloxy-camptothecin (APC) และ 7-ethyl-10-(4-amino-1-piperidino) carbonyloxy-camptothecin (NPC) ซึ่ง NPC อาจถูก CES ในลำไส้เปลี่ยนไปเป็น SN-38 ได้อีก อันจะนำมาซึ่งอาการท้องเสียภายหลังได้รับยาไปแล้ว 5-7 วัน และบางรายนานถึง 1 เดือน (รูปที่ 1) พิษหรือผลข้างเคียงของ SN-38 ที่พบส่วนใหญ่ได้แก่ ท้องเสียรุนแรง (20%), เม็ดเลือดขาวต่ำ (79%) และ ชีด (59%) คลื่นไส้อาเจียน (10%) ท้องผูก (10%) เป็นต้น (1-2) ร่างกายจะขจัด SN-38 ผ่านกระบวนการหลักคือ glucuronidation นอกจากนี้ยังถูกพาออกจากเซลล์ โดย P-glycoprotein transporter ซึ่งจัดเป็น efflux transporter (2,3)



รูปที่ 1: กระบวนการเปลี่ยนแปลงยาไอริโนทีแคนในร่างกาย

ในกระบวนการ glucuronidation ต้องอาศัยเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญคือ UDP-glucuronosyltransferase (UGTs) ซึ่งมีหลาย isoform ยาไอริโนทีแคนเป็น substrate และมีความจำเพาะมากที่สุดต่อ เอนไซม์ UGT1A1 เอนไซม์นี้ยังมีบทบาทในการเมตาโบไลต์สารในร่างกาย เช่น บิลิรูบิน ได้อีกด้วย ดังนั้นหากประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์นี้ลดลงอาจเนื่องจากปัจจัยทางพันธุกรรมหรือปัจจัยอื่นก็จะส่งผลกระทบต่อการทำงานของยาหรือสารบางอย่างในร่างกายได้ตัวอย่าง เช่น ความผิดปกติที่บริเวณ promoter ของยีนของ เอนไซม์ UGT1A1 ซึ่งปกติมีการซ้ำกันของ TA จำนวน 6 ครั้ง ($(A(TA)_6TAA)$) เปลี่ยนไปเป็นซ้ำกัน 7 ครั้ง ($(A(TA)_7TAA)$) หรือที่เรียกว่า UGT1A1*28 มีการศึกษาหลายการศึกษาพบว่าผู้ป่วยมีระดับของบิลิรูบินในเลือดสูงขึ้นมีความสัมพันธ์กับ UGT1A1*28 (4-6) และมีการศึกษาค่อนข้างมากถึงบทบาทของ UGT1A1*28 พบว่ามีความสัมพันธ์อย่างมาก (strong association) กับการเกิดพิษหรือผลข้างเคียงของยาไอริโนทีแคน เป็นระดับ 3/4 diarrhea และ neutropenia เป็นต้น (7-8) UGT1A1*28 จึงถือเป็น biomarker ที่ช่วยในการคาดการณ์การเกิดพิษของ ไอริโนทีแคน (9) จนกระทั่งในปี ค.ศ. 2005 องค์การอาหารและยา (FDA : <http://www.fda.gov/>) ได้ประกาศให้ชี้แจงภาวะเสี่ยงจากปัจจัยนี้ในเอกสารกำกับยา อย่างไรก็ตามจากการศึกษาเบื้องต้นของคณะผู้วิจัยพบว่า UGT1A1*28 homozygote ในคนไทยมีเพียง 2-3% (10) ซึ่งถือว่าต่ำเมื่อเทียบกับชนผิวขาว (20-30%) ในขณะที่ความผิดปกติบริเวณ coding region ที่ codon 71 อันทำให้ glycine เปลี่ยนเป็น arginine (rs4148323) หรือที่เรียกว่า UGT1A1*6 พบมากในคนไทย (13-24%) (11) และ

เกือบไม่พบ genotype นี้เลยในชนผิวขาว นอกจากนี้ยังพบว่า UGT1A1*6 ส่งผลให้ระดับบิลิรูบินในเลือดของการกสูงได้ (11) UGT1A1*6 ยังมีความสัมพันธ์กับระดับที่สูงขึ้นของ SN-38 และการเกิดพิษของ CPT-11 และ SN-38 ในผู้ป่วยมะเร็ง (12-16) นอกจากนี้ SN-38 จะถูกขจัดด้วยกระบวนการ glucuronidation แล้วการขจัด (clearance) ของ CPT-11 และ SN-38 ยังเกิดขึ้นได้โดยอาศัยโปรตีนเฉพาะหลายชนิดที่ผลิตจากยีนต่างๆ เช่น ABCB, ABCC, ABCG, SLCO1B1 รายละเอียดในรูปที่ 2 (17). ABCB1 เป็น efflux transporter ที่สำคัญต่อการจัดการกับสารพิษหรือการดื้อยาหลายชนิด ABCB1 gene กระจายอยู่ในหลายอวัยวะเช่น ทางเดินอาหาร ตับ ไต สมอง เป็นต้น (18) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ABCB1 gene มีความหลากหลายทางพันธุกรรมหลายแบบเช่น C3435T, C1236T และ G2677T/A (19-23) polymorphism ที่ G2677T/A ที่ทำให้ serine เปลี่ยนเป็น alanine (rs2032582) หรือที่เรียกว่า ABCB1*2 ซึ่ง polymorphism นี้พบได้ในคนเอเชียมีความถี่ เป็น 0.5 ขณะที่ในคนผิวขาวพบเพียง 0.3 เท่านั้น (24) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ABCB1*2 มีบทบาทสำคัญในการพา SN-38 และ CPT-11 จากตับเข้าสู่ทางเดินอาหารและมีความสัมพันธ์กับระดับที่สูงขึ้นของ SN-38 (รูปที่ 2) (25-28) แม้จะพบความถี่ของ UGT1A1*6 และ ABCB1*2 ในคนเอเชียมากกว่าคนผิวขาวแต่การศึกษาเกี่ยวกับผลการเกิดร่วมกันของ UGT1A1*6 และ ABCB1*2 ยังมีน้อยมากและข้อมูลที่มีอยู่ในปัจจุบันก็เป็นการศึกษาในรูปแบบและขนาดของยาไอริโนทีแคนที่แตกต่างกัน ดังนั้นการศึกษถึงอิทธิพลของ UGT1A1*6 และ ABCB1*2 ต่อเภสัชจลนศาสตร์ และการเกิดพิษหรือผลข้างเคียงของยาไอริโนทีแคนน่าจะนำมาซึ่งองค์ความรู้ใหม่และประโยชน์ในการนำมาใช้ตรวจทางคลินิกก่อนการให้ยา เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดพิษ ตลอดจนการปรับขนาดยาให้เหมาะสมต่อไป ซึ่งการศึกษาวิจัยดังกล่าวต้องการการพัฒนาเทคนิคและวิธีการวัดที่เหมาะสม มีความถูกต้องและแม่นยำและครอบคลุมระดับยาและเมตาโบไลต์ของยาในผู้ป่วย

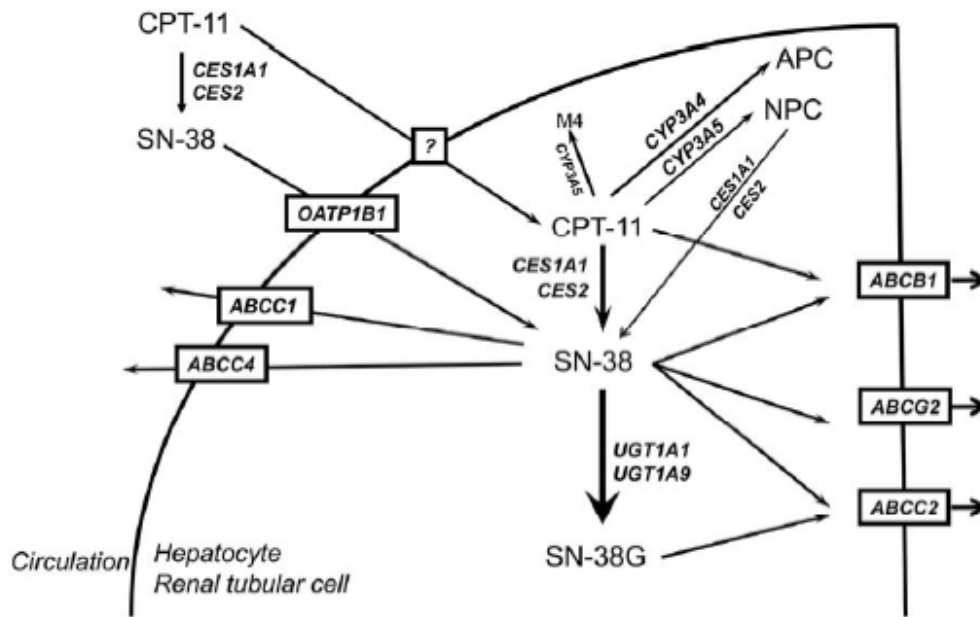
วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. พัฒนาวิธีวัดระดับยาไอริโนทีแคน และ เมตาโบไลต์ของยาโดยเริ่มแรกใช้ HPLC (ต่อมาเปลี่ยนมาใช้ UHPLC-MS/MS)
2. ศึกษาเภสัชจลนศาสตร์และผลข้างเคียงของยาไอริโนทีแคน ในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่
3. เพื่อศึกษาถึงผลของ UGT1A1*6 และ ABCB1*2 ที่มีความสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงและขจัดยาไอริโนทีแคน และ เมตาโบไลต์ของยา

แบบแผนการวิจัย

การวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 3 ส่วนดังนี้

1. พัฒนาวิธีการตรวจวัดระดับยาไอริโนทีแคนและเมตาโบไลต์ด้วยเครื่อง HPLC (ต่อมาเปลี่ยนมาใช้ UHPLC-MS/MS)
2. พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ยีน UGT1A1*28 และ ABCB1*2
3. คัดเลือกผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่จำนวน 30 ราย ที่ได้รับยาไอริโนทีแคน ขนาด 180 mg/m² ร่วมกับ 5-FU, leucovorin (FOLFIRI) เข้าร่วมโครงการวิจัย



รูปที่ 2. ตัวพามีบทบาทในการนำไอริโนทีแคนเข้าหรือออกจากตับ (3)

การคำนวณขนาดตัวอย่าง

$$n = \frac{(Z_{\alpha} \sqrt{2P(1-P)} + Z_{\beta} \sqrt{P_0(1-P_0) + P_1(1-P_1)})^2}{(P_1 - P_0)^2}$$

$$= \frac{(1.96 \sqrt{2 \times 0.45(1-0.45)} + 0.84 \sqrt{0.60(1-0.60) + 0.30(1-0.30)})^2}{(0.60 - 0.30)^2}$$

$$= 27.9$$

หมายเหตุ

P_0 =โอกาสที่ UGT1A1*6 จะมีผลต่ออิริโนทีแคนประมาณ 60%

P_1 =โอกาสที่ ABCB1*2 จะมีผลต่ออิริโนทีแคนประมาณ 30%

$P = (P_0 + P_1)/2 = 0.45$

ระดับความเชื่อมั่น 95%, $\alpha = 0.05$ ดังนั้น $Z_{\alpha} = 1.96$

อำนาจการทดสอบ=80% ดังนั้น $Z_{\beta} = 0.84$

วิธีดำเนินการวิจัย

1. พัฒนาวิธีการตรวจวัดระดับยาไอริโนทีแคนและเมตาโบไลต์ด้วยเครื่อง HPLC ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Thandranese S, 2003 (29) โดยหาวิธีมาตรฐานสำหรับการทำ

- Standard solution และ calibration curve - Separation และ specificity
- Linearity - Precision
- Lower limit of quantitation - Recovery

2. คัดเลือกผู้ป่วยมะเร็งมาตรวจและวิเคราะห์ยีนของเอนไซม์ UGT1A 1

2.1 คัดเลือกผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่มะเร็งลำไส้ใหญ่ จำนวน 30 ราย อายุ 18-85 ปี และเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้าหรือโรงพยาบาลรามาธิบดี(ส่งผู้ป่วยมารักษา)โดยได้รับยา ไอริโนทีแคน ขนาด 180 mg/m^2 ร่วมกับ 5-Fuoruracil และ leucovorin (FOLFIRI) เมื่อได้รับใน first cycle ทางหลอดเลือด (infusion) และได้รับการตรวจเลือด การทำงานของตับ ซึ่งรวมถึง Aspartate aminotransferase (AST), Alanine aminotransferase (ALT), Alkaline phosphate (ALP), และ blood count อยู่ในเกณฑ์ที่แพทย์พิจารณาให้รับยาได้ นอกจากนี้ต้องไม่ได้รับยาที่มีผลทำให้เกิดท้องเสียหรือเม็ดเลือดขาวต่ำ ผู้ป่วยทุกรายที่เข้าร่วมวิจัยจะต้องเซ็นติบายนยอมเข้าร่วมวิจัย โดยโครงการนี้ได้เสนอเพื่อการพิจารณาจริยธรรมจากคณะกรรมการพิจารณาโครงการวิจัยในมนุษย์ โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้าก่อนเริ่มโครงการ และติดตามผลข้างเคียงของยาหลังได้รับยาเป็นเวลา 1 เดือน โดยใช้เกณฑ์ของ NCI CTCAE version 4

2.2 เก็บตัวอย่างเลือดครั้งละ 3 ml ก่อนและหลังได้รับยา ที่เวลา 0.5, 2, 8, 12, และ 24 ชั่วโมง

2.3 นำตัวอย่างเลือดไปปั่นที่ 1700 rpm 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C แล้วเก็บส่วนพลาสมาไว้ที่ อุณหภูมิ -80°C จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์ด้วย HPLC

2.4 นำพลาสมา 0.5 mL มาเติม mobile phase 0.5 mL แล้ว vortex 3 วินาที centrifuged 760 g 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นเติม 45 μL methanol เขย่าเบาๆ และนำสารละลายนี้ 100 μL ฉีดเข้า HPLC column เพื่อตรวจวัดระดับยาไอริโนทีแคนและเมตาโบไลต์ของยา

2.5 วิเคราะห์ค่าทางเภสัชจลนศาสตร์ได้แก่ $\text{AUC}_{0-\text{inf}}$, C_{max} , $t_{1/2}$, Ke , Cl_{app} และ Vd_{app} ของ irinotecan โดยโปรแกรมสำเร็จรูป PK solution และใช้ non-compartment model ในการคำนวณ และวิเคราะห์ทางสถิติดังนี้

2.6 ตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วย รายละ 3 มิลลิลิตร ถูกนำมา สกัด DNA โดยใช้ Grnomic DNA Mini Kit และวิเคราะห์ UGT 1A1*6, ABCB1*2 โดยใช้เทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

A. เปรียบเทียบ pharmacokinetic parameters ของผู้ป่วยที่มี UGT1A1 genotype ที่ต่างกัน โดยโปรแกรม SPSS version 14 ด้วย one way ANOVA และ กำหนดนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ ที่ 95 % confidence intervals

B. คำนวณสถิติอื่นๆของ pharmacokinetic parameters ที่ทำการวิเคราะห์ทั้งหมดได้แก่ mean, median, minimum, maximum, standard error of mean, standard deviation

แผนการดำเนินงานตลอดโครงการ

กิจกรรม	ปีที่ 1				ปีที่ 2			
	1-3	4-6	7-9	10-12	1-3	4-6	7-9	10-12
1. เตรียมสารเคมีและวัสดุ และส่งโครงร่างฯต่อ คณะกรรมการพิจารณา จริยธรรม	←→							
2. การพัฒนาวิธีการ ตรวจวัด ระดับยา irinotecan ด้วยเครื่อง HPLC และ genotypic assay		←→						
3. ศึกษา pharmacokinetics ของ ยาไอริโนทีแคน ในผู้ป่วย		←→						
4. genotype analysis		←→						
5. วิเคราะห์ผลและเขียน รายงาน							←→	

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

1. พัฒนาการตรวจวัดระดับยาและเมตาโบไลต์ด้วย HPLC ได้ผลดังนี้

Chromatographic condition

Mobile phase : 75 mM ammonium acetate buffer pH 6 และ Acetonitrile (85:15)

Column : C18, Thermo, 0.5 μ m

Detector : UV wavelength 254 nm

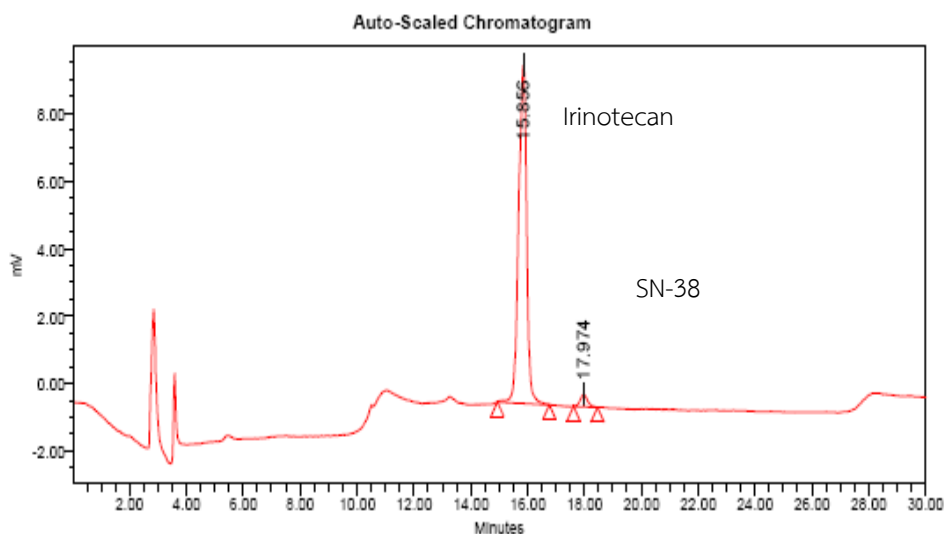
การเตรียม mobile phase

เตรียม 75 mM ammonium acetate buffer pH 6 และ Acetonitrile (85:15) ผสมเข้าด้วยกัน และกรองด้วย filtering membrane ที่มี pore size เท่ากับ 0.45 μ m จากนั้น degases ด้วย 20% helium นาน 30 นาที

Standard solution and calibration curve

เตรียม CPT-11 และ SN-38 โดยใช้ buffer เป็นตัวทำละลาย ให้มีความเข้มข้น 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 ng/mL. กรองผ่าน solid extraction แล้วฉีดเข้าคอลัมน์ โดย retention time ของ

CPT-11 และ SN-38 เท่ากับ 15.8 และ 17.9 นาที ตามลำดับ ได้ chromatogram ดังรูปที่ 3 และ ตารางที่ 1 และ 2



รูปที่ 3 : Chromatogram ของ 10 ng/mL standard CPT-11 และ SN-38

ตารางที่ 1 : Peak area ของ CPT-11 ในหลายความเข้มข้น

Concentrations (ng/mL)	Peak area (AU)	CV (%)
0.5	8128.25± 393.68	4.8
1	17937.25± 873.23	4.9
2.5	53224.75± 335.16	0.6
5	131657.5± 12430.24	9.4
10	192212.25± 2815.47	1.5
25	462035.5± 11000.78	2.4
50	937092.5± 20545.95	2.2
100	1924746.75±42326.93	2.2

Values are expressed as mean $\pm$ SD (n=3)

ตารางที่ 2 : Peak area ของ SN-38 ในหลายความเข้มข้น

Concentrations (ng/mL)	Peak area (AU)	CV (%)
------------------------	----------------	--------

1	657.0 $\pm$ 20.5	4.5
2.5	2154.0 $\pm$ 33.2	1.5
5	3610.7 $\pm$ 639.7	17.7
10	6087.7 $\pm$ 148.7	2.4
25	15772.3 $\pm$ 334.0	2.1
50	30097.7 $\pm$ 959.5	3.1
100	63020.5 $\pm$ 1711.5	2.7

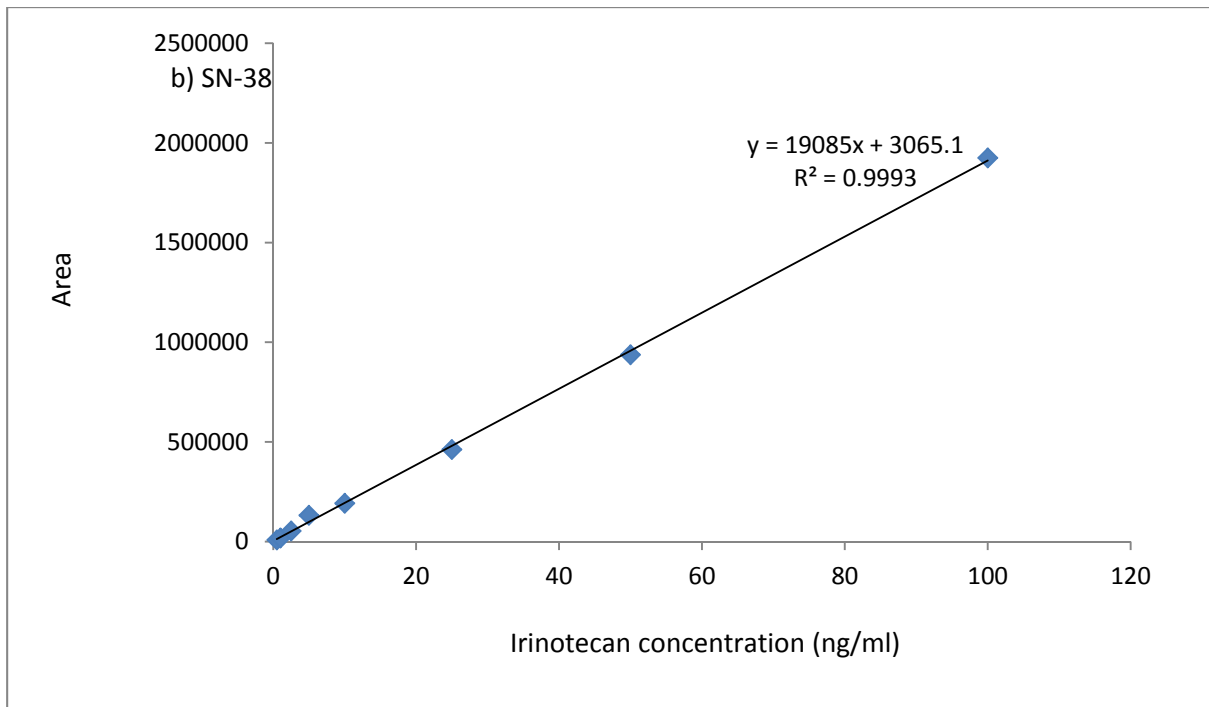
Values are expressed as mean $\pm$ SD (n=3)

นำค่าที่ได้มาหาความสัมพันธ์เส้นตรงโดยใช้ least square regression analysis ได้ regression equation of calibration curves ดังนี้

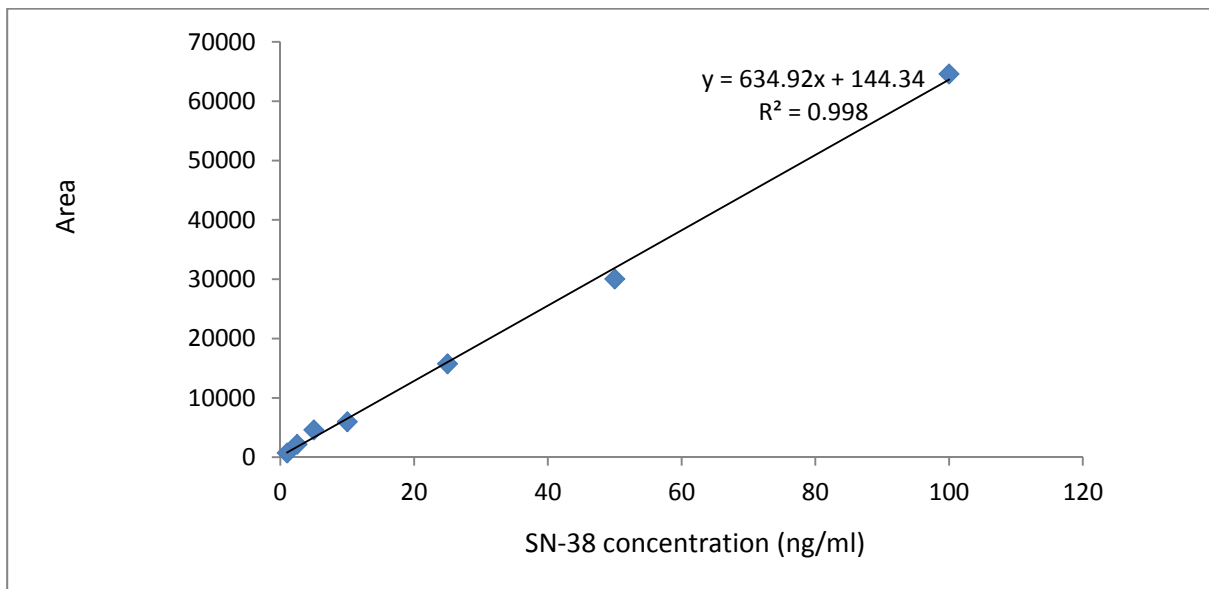
สำหรับ CPT-11 $y = 19085x + 3065.1$ $r^2 = 0.999$

สำหรับ SN-38 $y = 634.92x + 144.3$ $r^2 = 0.998$ ดังรูปที่ 4

A) CPT-11



B) SN-38

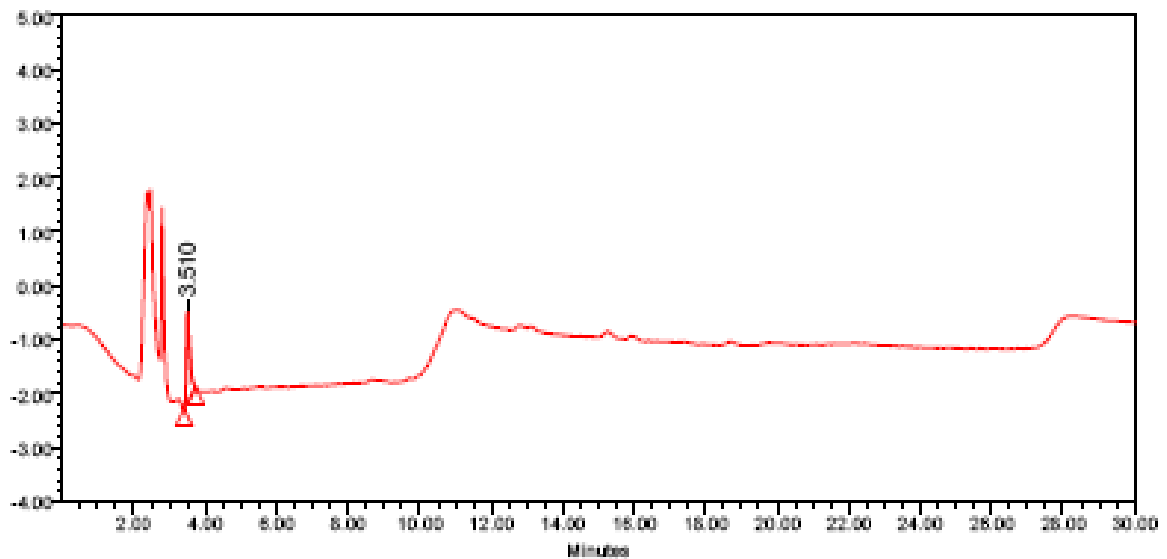


รูปที่ 4 : calibration curves ของ (A) CPT-11 และ (B) SN-38 (n=3)

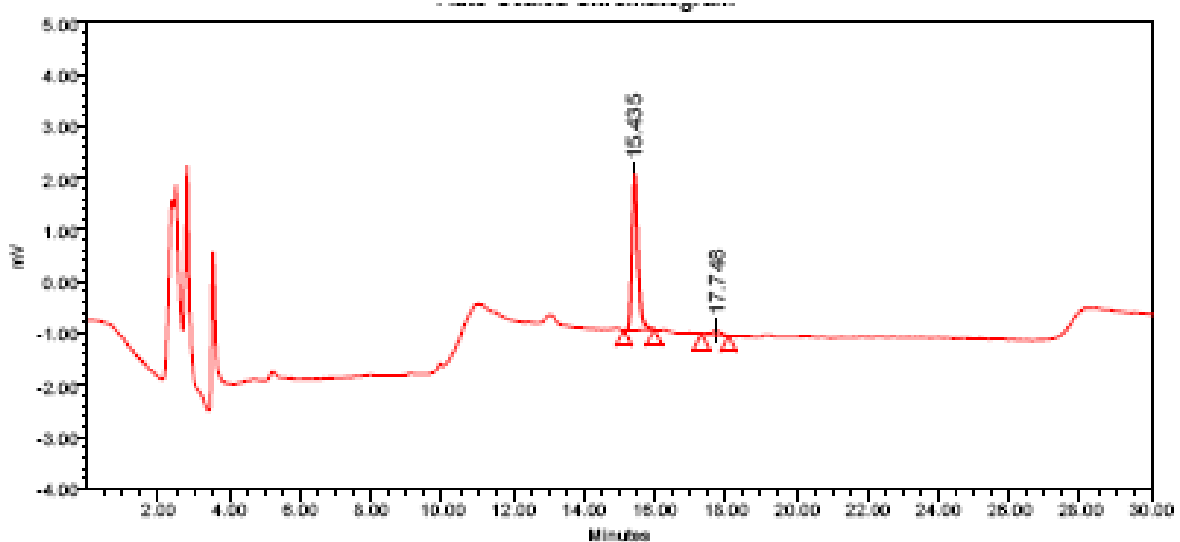
Plasma sample preparation

เตรียมตัวอย่างโดยผสม CPT-11 และ SN-38 ในพลาสมา โดยให้ ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.17, 1.7, and 8.5 ng/mL และ vortex 10 วินาที จากนั้นเติม 500 μ L ของ methanol/1 M hydrochloric acid (98:2) เพื่อ ตกตะกอนโปรตีน นำไป centrifuged ที่ 10000 rpm นาน 15 นาที และ ฉีด 20 μ L supernatant เข้าคอลัมน์ วิธีการนี้สามารถแยก สารในร่างกายนอื่นๆ CPT-11, SN-38 และ CPT ออกจากกันได้ดี (separation and specificity) ได้ chromatogram ดังรูปที่ 5

A)



B)



รูปที่ 5 : Chromatograms ของ (A) blank plasma and, (B) 1.7 n g/mL ของ CPT-11 และ

SN- 38 ใน พลาสมา

วิธีการดังกล่าวนี้ให้เปอร์เซ็นต์ recovery ของ CPT-11 เฉลี่ยเป็น 89.3 % และ recovery ของ SN-38 เฉลี่ยเป็น 96.5% ตามตารางที่ 3 และ 4

ตารางที่ 3 : Recovery ของ CPT-11 ในพลาสมา

Standard concentration (ng/mL)	% Recovery of CPT-11
0.17	121.2 $\pm$ 5.11
1.7	80.1 $\pm$ 2.12
8.5	75.1 $\pm$ 1.00
Mean of recovery	89.3%

Values are expressed as mean $\pm$ SD

ตารางที่ 4 : Recovery ของ SN-38 ในพลาสมา

Standard concentration (ng/mL)	% Recovery of SN-38
0.17	108.5 $\pm$ 9.40
1.7	105.4 $\pm$ 6.47
8.5	75.4 $\pm$ 4.54
Mean of recovery	96.5 %

Values are expressed as mean $\pm$ SD

Precision

ทดลองหาความเที่ยงตรงและถูกต้องโดยฉีด standard ความเข้มข้นละ 3 ครั้งภายในวันเดียวกัน (intra-day assay) และระหว่างวัน (inter-day assay) แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์ของ coefficient of variation (% CV) ดังสมการ

$$\%CV = \frac{\overline{SD}}{\overline{X}} \times 100$$

SD = standard deviation

X = mean value of CPT-11, SN-38 concentration

ค่า coefficient of variation ของ CPT-11 ในวันเดียวกันน้อยกว่า 4.4% และระหว่างวันน้อยกว่า 4.9 %
ค่า coefficient of variation ของ SN-38 ในวันเดียวกันมีค่าน้อยกว่า 9.7% และระหว่างวันมีค่าน้อยกว่า 9.1 % ตามตารางที่ 5 และ 6

ตารางที่ 5 : ความแม่นยำในการตรวจวัด CPT-11 ในพลาสมา

Standard concentration n (ng/mL)	Intra-day assay (ng/mL)	% of deviation	CV (%)	Inter-day assay (ng/mL)	% of deviation n	CV (%)
1	0.72 ± 0.05	2.8	2.40	0.77 ± 0.17	22.1%	4.9
10	9.79 ± 0.24	2.1	1.75	9.90 ± 0.28	0.89%	2.4
100	104.43 ± 0.40	4.4	0.10	100.70 ± 0.23	0.69%	0.50

Values are expressed as mean ± SD (n=3)

ตารางที่ 6 : ความแม่นยำในการตรวจวัด SN-38 ในพลาสมา

Standard concentration (ng/mL)	Intra-day assay (ng/mL)	% of deviation	CV (%)	Inter-day assay (ng/mL)	% of deviation	CV (%)
1	0.91 ± 0.12	9.3	6.5	0.9 ± 0.01	10.0	9.1
10	9.03 ± 1.31	9.7	3.1	9.2 ± 0.80	8.0	5.4
100	102.13 ± 1.98	2.1	0.5	101.5 ± 1.23	1.5	2.4

Values are expressed as mean ± SD (n=3)

Lower limit of quantitation (LLOQ)

วิธีการวัดระดับยาด้วย HPLC ที่ได้พัฒนานี้สามารถวัดระดับ CPT-11 และ SN-38 ได้ต่ำถึง 1.0 ng/mL ได้ค่า CV ที่ยอมรับได้ 2.6-9.1 % อย่างไรก็ตามหลังจากนำตัวอย่างเลือดในผู้ป่วยมาวัดระดับยาและเมตาโบไลต์พบว่า ระดับของ SN-38 และ SN-38G ก่อนข้างต่ำมากและแม้จะเพิ่ม injection volume เป็น 30 µL แล้วก็ยังไม่สามารถตรวจวัดได้ คณะผู้วิจัยจึงปรับเปลี่ยนวิธีตรวจวัดระดับยาใหม่โดยใช้ Ultra high-performance liquid chromatography –tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) ซึ่งทางภาควิชาเพิ่งได้รับเครื่องมาในปี พ.ศ. 2557 จึงได้พัฒนาวิธีการวัดระดับยาและเมตาโบไลต์ให้สามารถวัด SN-38 ในระดับต่ำกว่า 1 ng/mL ได้ อีกทั้งยังได้พัฒนาการเตรียมตัวอย่างจากเลือดให้รวดเร็วขึ้น

4. พัฒนาการตรวจวัดระดับยาและเมตาโบไลต์ด้วย UHPLC-MS/MS ดังนี้

Standards และ สารเคมี

Standard ของ irinotecan (7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino] carbonyloxy amptothecin; CPT-11) purity> 99.5%, SN-38 (7-ethyl-10-hydroxycamptothecin) purity>99.0% และ camptothecin (internal standard) purity>95% สั่งซื้อจากบริษัท Sigma-Aldrich (St.Louis, MO) สารเคมีอื่นๆเป็น LC-MS grade เช่น methanol, acetonitrile และ formic acid เป็นต้น

Preparation of stock solution and standard

เตรียม CPT-11, SN-38 และ CPT stock solution ใน 10%DMSO ที่ความเข้มข้น 1000 µg/mL และ series working solutions เตรียมโดยเจือจาง stock solution ด้วย methanol แล้วเก็บไว้ที่ -80° C.

UHPLC-MS/MS conditions

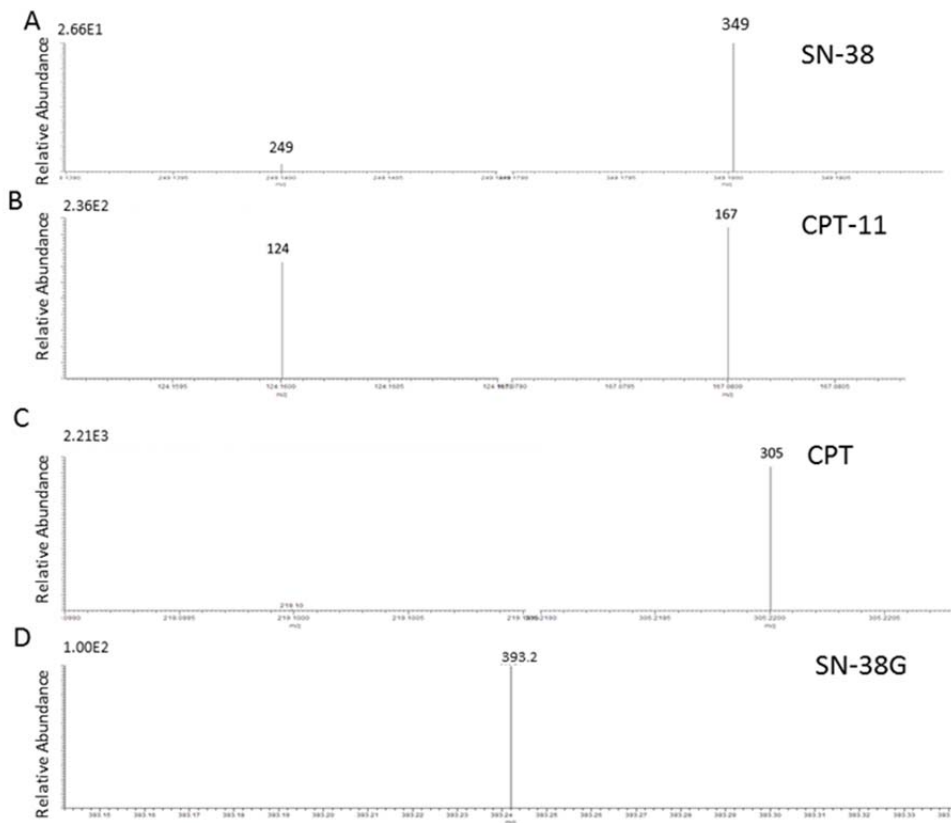
การตรวจวัดระดับยาและเมตาโบไลต์ ด้วยเครื่อง UHPLC-MS/MS (TSQ Quantum Access MAX, Thermo Scientific, USA) คอลัมน์ที่ใช้เป็น Hypersil Gold column (2.1 mm × 100 mm, particle size 1.9 µm, Thermo Scientific) ตู้ของ column ควบคุมอุณหภูมิ 40°C, Pump (HPG-3400RS, Thermo Scientific) ปลอ่ย mobile phase ไหลในอัตรา 0.4 mL/min โดย mobile phase เป็น 0.1% formic acid in water (mobile phase A) และ 100% methanol เป็น (mobile phase B) โดยใช้ระบบ gradient of mobile phase คือ

1. 65 % mobile phase A 35 % mobile phase B ใน 1 นาที ในช่วง initial phase
2. 65 % to 25% mobile phase A และ 35 % to 75% mobile phase B ใน 2.5 นาที
3. 25 % to 65% mobile phase A และ 75 % to 35% mobile phase B ใน 1.5 นาที

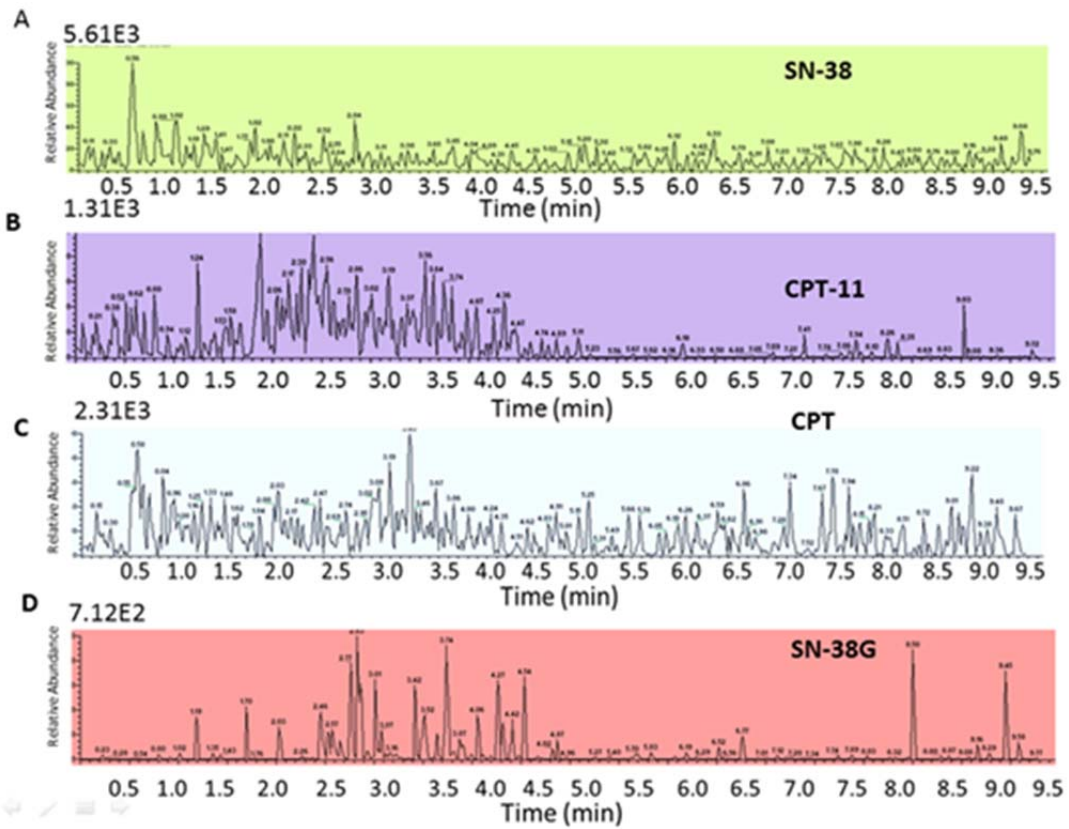
แต่ละ run time ใช้เวลา 3 นาที ปริมาณสารที่ฉีดในแต่ละครั้งเป็น 10 µL ในส่วนของ autosampler (WPS-3000TRS, Thermo Scientific) ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 4°C จากนั้นยาและเมตาโบไลต์จะถูก วิเคราะห์ผ่านเครื่อง triple quadrupole mass spectrometer ด้วย heated-electrospray ionization (HESI-II) probe และใช้ spray voltage (3500□V); sheath gas pressure (40□psi); auxiliary gas pressure (11 arbitrary units); skimmer offset (0□V), ion transfer tube temperature (350°C), vaporizer temperature (400°C); high purity argon (>99.98%) ซึ่งใช้เป็น collision gas (1.5□mTorr) เลือกใช้ positive selected reaction monitoring (SRM) mode และใช้โปรแกรม Xcalibur 2.1 (Thermo Scientific) สำหรับ instrument control, data acquisition และ processing สำหรับ parameter ที่ใช้ใน standard แต่ละตัวมีรายละเอียดดัง ตารางที่ 7 ซึ่งตามวิธีการนี้สามารถแยกสารได้เจาะจงและสามารถใช้ตรวจวัดระดับยาและเมตาโบไลต์ได้อย่างชัดเจนดังรูปที่ 6 และไม่ถูกรบกวนจากสารในร่างกาย รูปที่ 7-8

ตารางที่ 7: Mass spectrometer for SRM setting

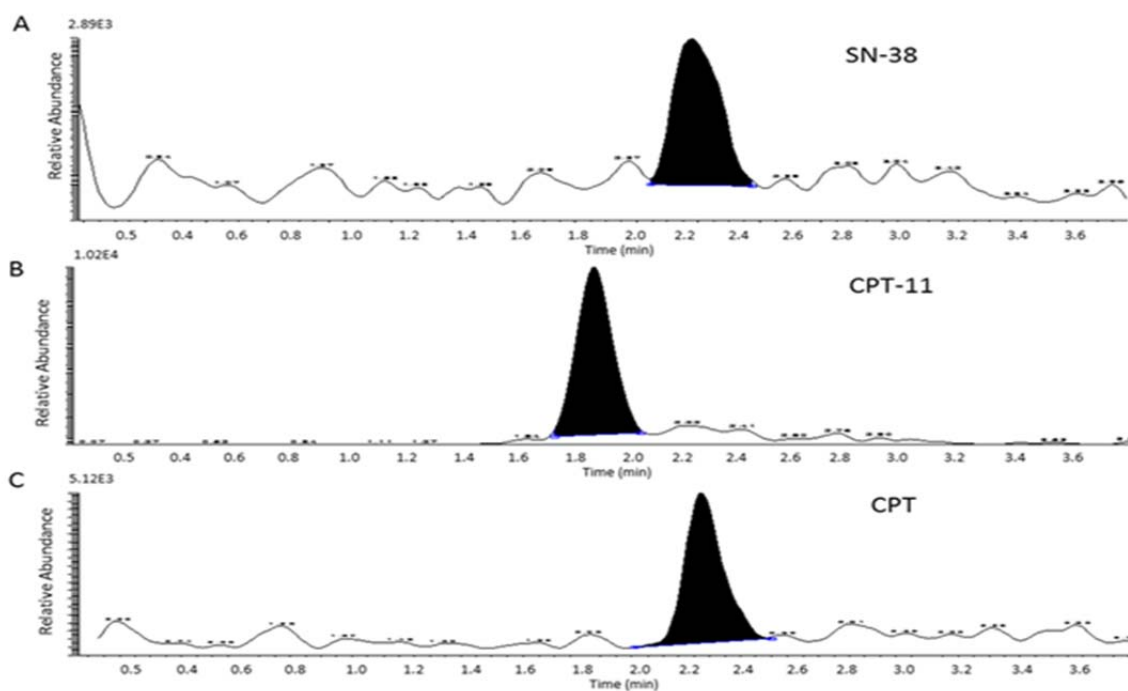
SRM setting	CPT-11	SN38	SN38-G	CPT(IS)
Precursor ion(m/z)	587.3	393.2	569.2	340.1
Production(m/z)	167	349.2	393.2	305.2
Collision energy(volts)	41	26	40	21
Entrance potential(volts)	126	100	126	109



รูปที่ 6 : EPI mass spectrum ของ plasma sample ในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่หลังได้รับ ยาไอริโนทีแคน 180 mg/m² เป็นเวลา 12 ชม. (A) SN-38, (B) CPT-11, (C) CPT และ (D) SN-38G.



รูปที่ 7. Chromatograms ของ blank pooled plasma (A) SN-38, (B) CPT-11, (C) CPT และ (D) SN-38G



รูปที่ 8. Chromatograms ของพลาสมาผสมกับ standard ได้ความเข้มข้นของ
(A) SN-38=1 ng/mL(B) CPT-11=10 ng/mL และ (C) CPT=10 ng/mL

Plasma sample preparation และ validation procedures

Precision and accuracy

การศึกษา precision และ accuracy ทำโดยใช้ standard ผสมใน buffer ความเข้มข้นของ CPT-11 เป็น 1, 100 และ 1000 ng/mL ความเข้มข้นของ SN-38 และ CPT เป็น 1, 100 และ 500 ng/mL (n=3) ในวันที่ตรวจวัด (intra-day assay) และระหว่างวันอีก 3 วัน (inter-day assay) ค่าความเที่ยงตรง (precision) คำนวณจากร้อยละของ coefficient of variation (%CV) คำนวณจาก $\%CV = [SD/Mean] \times 100$ ซึ่ง % CV ของ intra-day assay อยู่ช่วง 0.7-13.8% inter-day assay อยู่ช่วง 0.01-7.8% รายละเอียดดัง ตารางที่ 8 สำหรับ retention time ของ SN-38, CPT-11 และ CPT เป็น 2.7, 1.88 และ 2.6 นาทีตามลำดับ และเนื่องจากไม่มี standard ของ SN-38G ที่สามารถหาซื้อได้ จึงใช้วิเคราะห์โดยใช้ UHPLC-MS/MS mode full scan และ SIM โดยให้ parent เป็น SN-38G(569.2 m/z) และ lost product เป็น glucuronide (176 m/z) ได้ retention time เป็น 1.5 นาที ตามรูปที่ 9

ตารางที่ 8 : Precision และ accuracy ของ CPT-11 SN-38 และ CPT

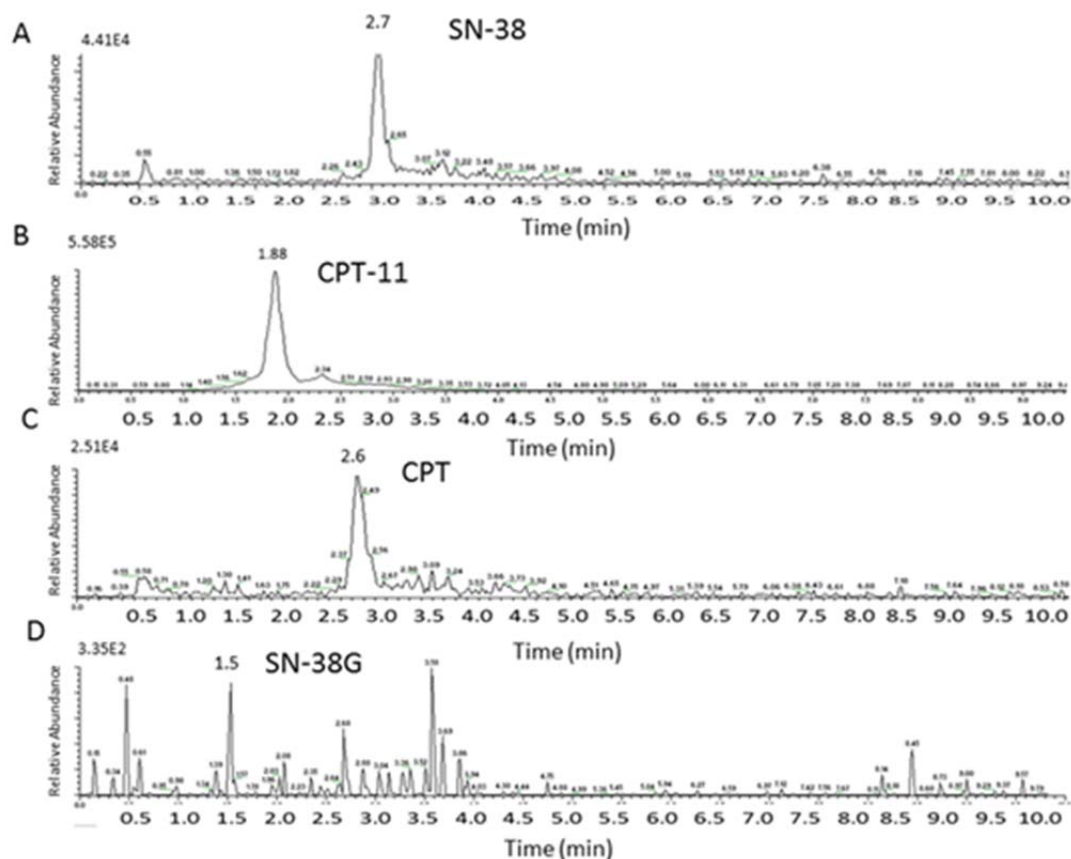
Intra-day (n=3)

Analyte	Nominal conc. (ng/ml)	Mean $\pm$ SD	CV (%)	Accuracy (%)
CPT-11	10	10.1 $\pm$ 1.4	13.8	101.0
	100	105.0 $\pm$ 9.5	9.0	105.0
	1000	1064.1 $\pm$ 104.3	9.8	106.4
SN38	1	1.1 $\pm$ 0.04	3.6	110.0
	100	100.6 $\pm$ 4.7	4.7	100.6
	500	490.8 $\pm$ 29.8	6.1	98.2
CPT	10	12.2 $\pm$ 0.1	1.1	81.9
	100	107.3 $\pm$ 0.7	0.7	107.3
	500	501.8 $\pm$ 48.9	9.6	100.4

Inter-day (three days)

Analyte	Nominal conc. (ng/ml)	Mean $\pm$ SD	CV (%)	Accuracy (%)
CPT-11	10	10.2 $\pm$ 0.8	7.8	102.0
	100	105 $\pm$ 0.01	0.01	105.0
	1000	1016.7 $\pm$ 46.9	4.2	106.1
SN38	1	1.1 $\pm$ 0.04	4.8	110.0
	100	98.7 $\pm$ 2.4	2.4	98.7
	500	488.4 $\pm$ 17.9	3.7	97.7
CPT	10	11.1 $\pm$ 0.3	2.7	111.0
	100	102.4 $\pm$ 3.5	3.4	102.0
	500	494.5 $\pm$ 7.0	1.4	98.8

Value are expressed as mean $\pm$ SD



รูปที่ 9. Chromatogram ของ plasma sample หลังจากผู้ป่วยได้รับยาไอริโนทีแคน 180 mg/m² 30 นาที (A) SN38, (B) CPT-11, (C) CPT(IS) และ (D) SN38-G

Recovery and matrix effects

การหาค่า recovery ของ CPT-11, SN-38 และ CPT จากตัวอย่างในพลาสมา ทำได้โดยเตรียมผสม standard ดังกล่าวในพลาสมาของอาสาสมัคร 5 คน (n=5) ในปริมาตร 500 μ L ให้ได้ความเข้มข้น ของ CPT-11 เป็น 1, 100 and 1000 ng/mL, SN-38 และ CPT เป็น 1, 100 และ 500 ng/mL จากนั้นทำการ ตกตะกอนโปรตีนด้วย 0.1% formic acid ใน methanol ปริมาณ 250 μ L นำไป vortex 10 วินาที จากนั้น นำไป centrifuge ที่ 15000 rpm นาน 15 นาที นำ supernatant มาสกัดด้วยวิธีต่างๆโดยใช้ Solid phase extraction เช่น HyperSep Retain PEP 5 mg/mL (Thermo Scientific, USA), Oasis® HLB 200 mg/6 mL (Waters, Ireland) และ Oasis® HLB 30 mg/mL (Waters, Ireland) ผลของ recovery ของ standard ทุกตัวที่ใช้ HyperSep Retain PEP อยู่ในช่วง 10-20% , Oasis® HLB 200 mg/6 mL อยู่ในช่วง 10- 30% และ Oasis® HLB 30 mg/ mL อยู่ในช่วง 66.1-97.5 % ดังนั้นจึงเลือกใช้ Oasis® HLB 30 mg/ mL เป็น solid phase extraction (SPE) หลังจากสกัดด้วย SPE แล้ว เติม 250 μ L methanol : 0.1 M ammonium acetate (40:60 v/v) จากนั้นฉีด 10 μ L ของสารละลายเข้า LC-MS พบว่า % recovery ของ CPT-11 อยู่ในช่วง 66.8-88.6%, SN-38 อยู่ในช่วง 66.1-74.2% และ CPT อยู่ในช่วง 70.5-97.5 % และมี % CV ของ recovery ของ standard ทุกตัว น้อยกว่า 13% รายละเอียดดัง ตารางที่ 9 และรูปที่ 10 เพื่อศึกษาผลของ matrix ทำโดยการผสม standard ในพลาสมาหลังจากที่

พลาสมาผ่าน SPE แล้วและทำตามขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างดังกล่าวข้างต้น และการวิจัยพบว่า plasma matrix ไม่มีผลต่อระดับ CPT-11, SN-38 และ CPT

ตารางที่ 9 : Recovery ของ CPT-11, SN-38 และ CPT ในพลาสมา (n=5)

Analyte	Nominal conc. (ng/mL)	Recovery (%)	CV (%)
CPT-11	10	71.5 ± 5.7	7.9
	100	66.8 ± 4.4	6.5
	1000	88.6 ± 1.6	1.8
SN-38	1	66.1 ± 8.4	12.7
	100	74.2 ± 2.4	3.2
	500	63.3 ± 5.2	8.2
CPT	10	70.5 ± 6.7	9.5
	100	97.5 ± 11.9	12.5
	500	81.1 ± 8.0	9.8

Value are expressed as mean ±SD

Limitation of quantitation(LOQ)

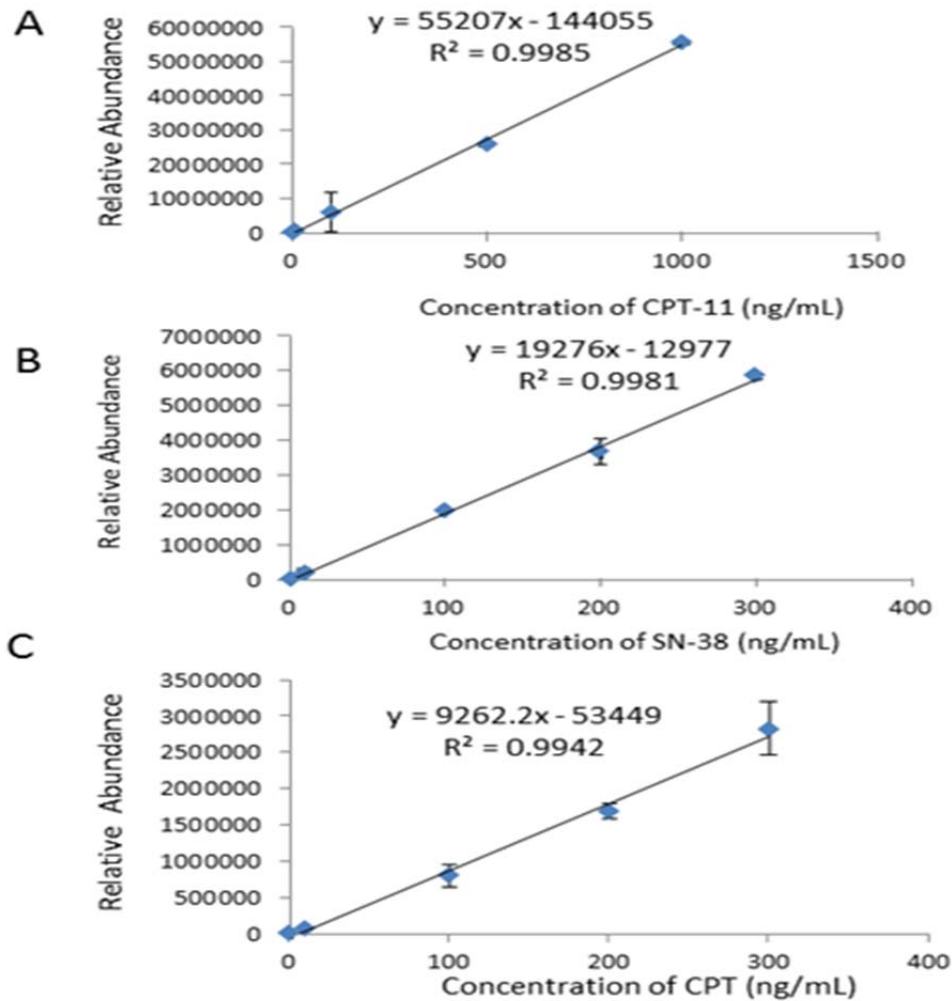
หาค่าต่ำสุดที่สามารถวัด standard ได้ โดยคิดจาก สัดส่วนของ detector response ของ standard/ detector response ของ noise อย่างน้อย= 3 ระดับต่ำสุดของ CPT-11ที่สามารถวัดได้เป็น 1.0 ng/mLระดับต่ำสุดของ SN-38 ที่สามารถวัดได้เป็น 0.1 ng/mLและระดับต่ำสุดของ CPT ที่สามารถวัดได้เป็น 1.0 ng/mL

Lower limit of quantitation (LLOQ)

ใช้ค่าความเข้มข้นของ standard ที่ต่ำสุดที่มีค่า accuracy±15% และ CV<15% จัดเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ calibration curves ที่สามารถวัดได้โดย UHPLC-MS/MS

Linearity

ศึกษาโดยใช้ standard ผสมในพลาสมา 500 µLซึ่งได้จากอาสาสมัครชาย 5 คน โดยให้ได้ความเข้มข้นของ CPT-11 เป็น 1, 10, 100, 500, 1000 ng/mL, SN-38 เป็น 1, 10, 100, 200 และ 300 ng/mL สำหรับ CPT ความเข้มข้นเป็น 1, 10, 100, 200, และ 300 ng/mL หลังจากนั้นทำการเตรียมตัวอย่างดังกล่าวไว้ในส่วนของการศึกษา recovery หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์เพื่อหาความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงโดยใช้ least square regression analysis ได้ผลดังรูป 10



รูปที่ 10: Calibration curves ของ (A) CPT-11, (B) SN-38 และ (C) CPT

แสดงค่าเป็น mean $\pm$ SD (n=5)

การพัฒนาการตรวจวัดระดับยาและเมตาโบไลต์ด้วย UHPLC MS/MS ในการศึกษาวิจัยนี้ สามารถวัด CPT-11, SN-38 และ SN-38G ได้ครอบคลุมระดับในพลาสมา และมีความถูกต้องและเที่ยงตรง อีกทั้งการเตรียมตัวอย่างที่ไม่ซับซ้อนและกระบวนการวิเคราะห์ ที่ใช้เวลาน้อย สามารถนำไปใช้ในการตรวจวัด CPT-11, SN-38 และ SN-38G ในผู้ป่วยได้

Genotyping study

พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ genetic polymorphism ของยีน UGT1A1 (UGT1A1*6) โดยสกัด DNA และพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ genetic polymorphism ของยีน UGT1A1 (UGT1A1*6) โดยใช้เทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ได้ผลดังนี้

Optimum PCR condition

Substance	Volume for 1 reaction (μL)
Distil water	17.5
Q solution	8
10X PCR buffer	4
10 μM primer F/R	2/2
2 mM dNTP	2
MgCl ₂	1
5 U/μL Tag	0.5
DNA*	3

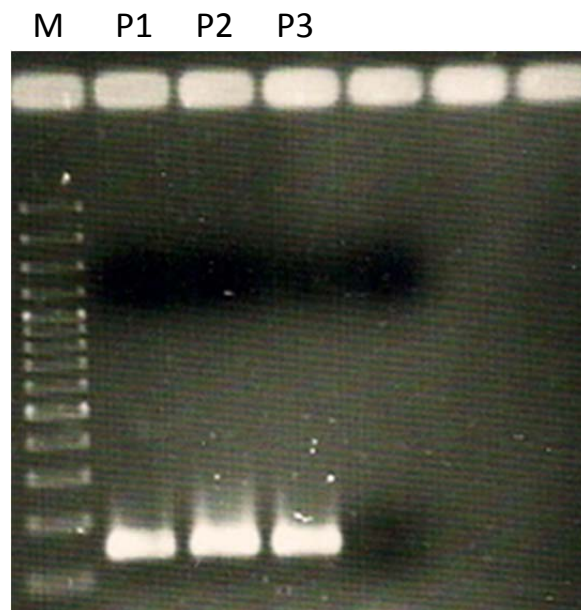
*Dilution ที่เหมาะสมของ DNA template คือ 1:20

Cycling condition

1. Preheat 95° C 5 min
2. 35 cycle ของ 95°C 15 sec
55°C 30 sec
72°C 10 sec

3. Hold 4° C

ได้ PCR product ขนาด 150 bp ดังรูปที่ 11

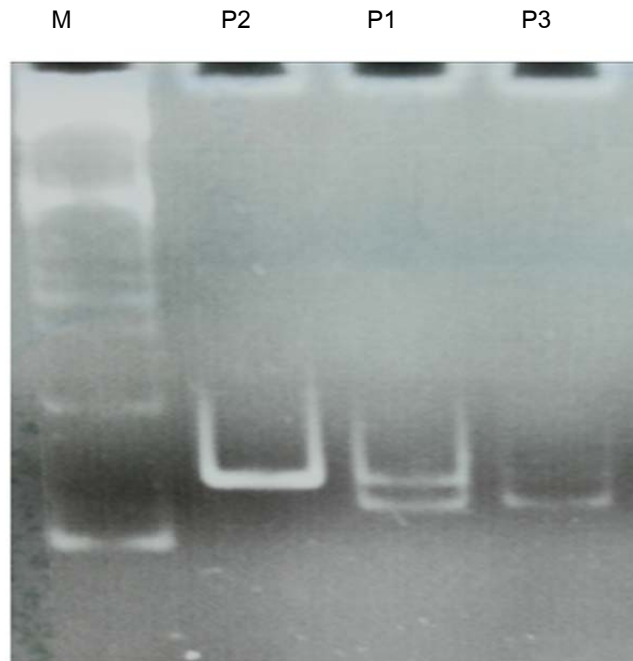


รูปที่ 11: PCR product ของ UGT1A1 โดย M= marker 100 bp ,P1=PCR product ของผู้ป่วยรายที่ 1, P2=PCR product ของผู้ป่วยรายที่ 2 และ P3=PCR product ของผู้ป่วยรายที่ 3

Optimum digestion condition

Substance	Volume for 1 reaction (μL)
Distil water	17
10x restriction enzyme buffer	2
Restriction enzyme(AvalI)	1
PCR product	10

Incubation time ที่เหมาะสมอยู่ที่ 5 hour จากนั้นแยกด้วย 8 % Acrylamide gel ได้ผล ดังรูปที่ 12



รูปที่ 12 : แสดงผลของ PCR product ของ UGT1A1 หลังจาก digestion โดยที่ M= 100 bp DNA marker, P1=PCR product ของผู้ป่วยรายที่ 1(140 bp+120 bp ;UGT1A1*6 heterozygote), P2=PCR product ของผู้ป่วยรายที่ 2(150 bp; wild type) และ P3=PCR product ของผู้ป่วยรายที่ 3 (120 bp;UGT1A1*6 homozygote)

2. พัฒนารูปแบบการตรวจวิเคราะห์ genetic polymorphism ของยีน ABCB1(ABCB1*2) โดยใช้ condition เหมือนการวิเคราะห์ UGT1A1*6 แต่ออกแบบ primer ใหม่ เพื่อให้ได้ product ขนาดไม่ใหญ่มาก ขนาดประมาณ 224 bp

Optimum PCR condition

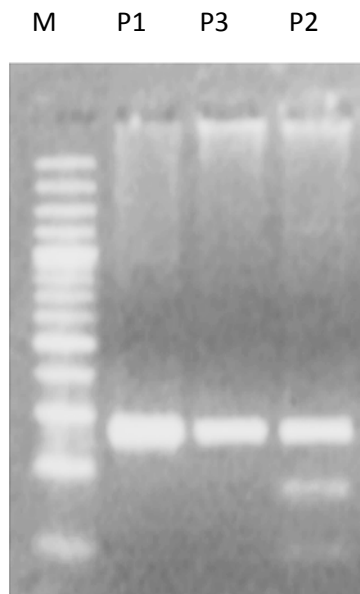
Substance	Volume for 1 reaction (μL)
Distil water	17.5
Q solution	8
10X PCR buffer	4
10 μM primer F/R	2/2
2 mM dNTP	2
25 μM MgCl ₂	1
5 U/μL Tag	0.5
DNA*	3

* Dilution ที่เหมาะสมของ DNA template คือ 1:20

Cycling condition

Substance	Volume for 1 reaction (μL)
Distil water	24.5
10x restriction enzyme buffer	5.0
Restriction enzyme(Ban I)	0.5
PCR product	20

๗ ได้ผลดังรูปที่ 14



รูปที่ 14 : แสดงขนาดของ PCR product ของ ABCB1 โดย M= 100 bp DNA marker, P1=PCR product ของผู้ป่วยรายที่ 1(wild type; ประมาณ 224 bp) , P2=PCR product ของผู้ป่วยรายที่ 2 (ABCB1*2 heterozygote; ประมาณ 224 bp และ 198 bp) และ P3=PCR product ของผู้ป่วยรายที่ 3(wild type; ประมาณ 224 bp)

ผลของการวิเคราะห์ยีนในผู้ป่วย ดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10. Genotypes ของ UGT1A1*6 และ ABCB1*2 ของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่จำนวน 3 ราย

Patient No.	UGT1A1*6	ABCB1*2
1	Heterozygote	Wild type
2	Wild type	Heterozygote
3	Homozygote	Wild type

ในช่วงระยะเวลาที่ขอทำวิจัยทั้งสิ้น 3 ปี มีผู้ป่วยเข้าร่วมโครงการวิจัยทั้งหมด 5 ราย แต่ได้ถอนตัวจากการวิจัย 2 ราย เนื่องจากผู้ป่วยเจ็บบริเวณที่คาเข็ม 1 ราย และอีก 1 รายมีตะคริวที่ขาหลังได้รับยา จึงไม่สะดวกให้เก็บตัวอย่างเลือด มีผู้ป่วยอีกหลายรายที่มีเข้ามาโรงพยาบาลแต่ไม่มีสิทธิเบิกค่ายาได้ จึงไม่สามารถเข้าร่วมโครงการวิจัยได้ เพราะคณะผู้วิจัยไม่ได้ของบประมาณสำหรับจ่ายค่ายาให้ผู้ป่วย ผู้ป่วยที่จะเข้าร่วมวิจัยได้จะเป็นเฉพาะรายที่จ่ายเองได้หรือเบิกค่ายาได้เท่านั้น อีกทั้งมีการเปลี่ยนแปลงนโยบายของโรงพยาบาลในการจ่ายยาโอริโนทีแคน ทำให้จำนวนผู้ป่วยที่เข้าร่วมโครงการทั้งสิ้นได้เพียง 3 ราย ค่า blood chemistry ของผู้ป่วยแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11: Blood chemistry ของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่จำนวน 3 ราย

Characteristics	Patient No.1			Patient No.2			Patient No.3		
	First	Second	Third	First	Second	Third	First	Second	Third
	visit	visit	visit	visit	visit	visit	visit	visit	visit
Hb (12-18 g/dL)	12.5	13.8	12.0	13.2	13.6	12.5	12.6	12.6	12.4
Hct (30-54%)	39	36	33	39	38.9	38.6	38	37.9	37.5
Neutrophil count (/mm ³)	4500	2500	1300	6500	5300	2300	7000	5500	4300
AST (15-37 U/L)	35	30	28	54	54	65	30	27	29
ALT (30-65 U/L)	30	45	56	32	32	39	40	56	48
ALP (50-136 U/L)	89	68	97	164	154	186	69	78	105

Hb = haemoglobin, HCT = haematocrit, AST = aspartate aminotransferase; ALT = alanine aminotransferase, ALP = alkaline phosphatase,

หลังผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่ระยะกระจายได้รับยาโอริโนทีแคนขนาด 180 mg/m² โดยหยดทางเส้นเลือดดำ (IV infusion) ภายใน 1.5 ชม. และเก็บตัวอย่างเลือดตามจุดเวลาต่างๆ จำนวน pharmacokinetic parameter ได้ตามตารางที่ 12 และ plasma profile ของ CPT-11, SN-38 และ SN-38G ตามรูปที่ 12-14

ผู้ป่วยรายที่ 1

ผู้ป่วยชายไทยอายุ 67 ปี น้ำหนัก 60 กิโลกรัม มี genotype เป็น UGT1A1*6 heterozygote และ wild type ของ ABCB1 มี AUC ของ CPT-11 เป็น 559.85 ng/mL.hr ระดับ CPT-11 ถึงระดับสูงสุดเป็น 405.5 ng/mL หลังได้รับยา 30 นาที ค่าครึ่งชีวิตของ CPT-11 เป็น 5.4 ชม. AUC ของ SN-38 (126.7 ng/mL) สูงกว่า ผู้ป่วยรายที่ 2 เล็กน้อย (115.5 ng/mL) ซึ่งเป็น wild type ของ UGT1A1 แต่ระดับ

สูงสุดของ SN-38 ต่ำกว่าผู้ป่วยรายที่ 2 (40.3 ng/mL) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอิทธิพลของ UGT1A1*6 heterozygote มีไม่มาก จากการศึกษาของ K. Araki และคณะอธิบายว่าผลของ UGT1A1*6 heterozygote จะเห็นชัดขึ้นเมื่อเกิดร่วมกับ UGT1A1*28 ส่งผลให้ระดับ SN-38 สูงขึ้น (30) ค่าคงที่ในการขจัด SN-38 ในผู้ป่วยรายนี้ต่ำส่งผลให้ค่าครึ่งชีวิตของ SN-38 ยาวถึง 81.3 ชม. และพบ grade 2 neutropenia และ grade 2 diarrhea ในผู้ป่วยรายนี้ในสัปดาห์ที่ 4 หลังได้รับยา

ผู้ป่วยรายที่ 2

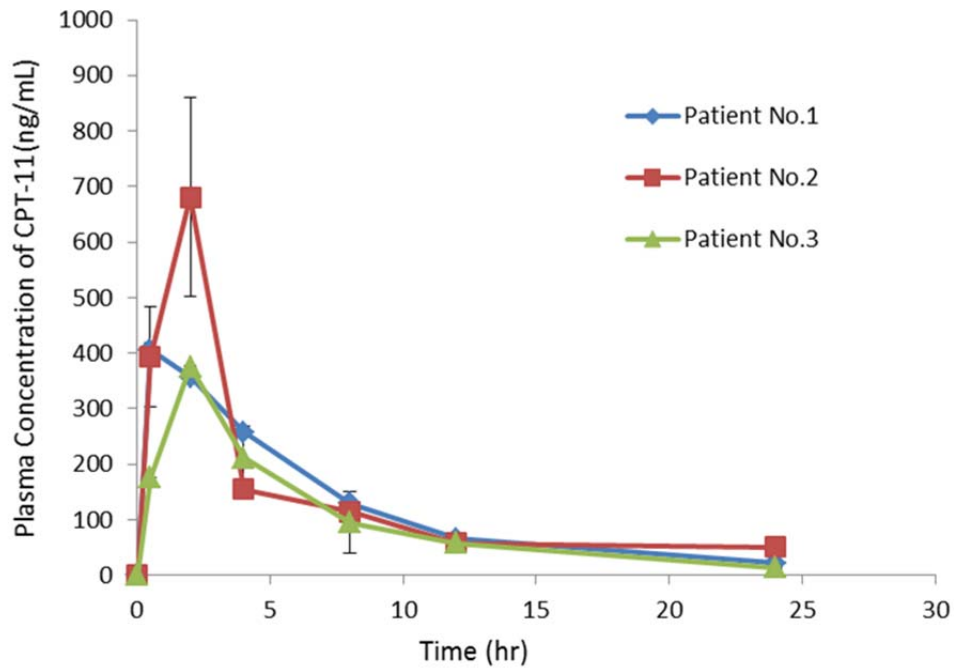
ผู้ป่วยชายไทยอายุ 72 ปี น้ำหนัก 55 กิโลกรัม มี genotype เป็น wild type ของ UGT1A1 และ ABCB1*2 heterozygote มี AUC ของ CPT-11 เป็น 1348.2 ng/mL.hr ระดับสูงสุดของ CPT-11 เป็น 680.14 ng/mL หลังได้รับยา 120 นาที ค่าครึ่งชีวิตของ CPT-11 เป็น 7.8 ชม. ระดับสูงสุดของ SN-38 เป็น 103.1 ng/mL ซึ่งต่ำกว่าผู้ป่วยรายที่ 3 ที่เป็น UGT1A1*6 homozygote ระดับของ CPT-11 ในผู้ป่วยรายนี้สูงอาจเกิดจาก ABCB1*2 heterozygote ในระบบทางเดินอาหารยอมให้ เกิด enterohepatic recirculation ได้มากขึ้น เมื่อระดับ CPT-11 มากก็ส่งผลให้มี SN-38 มากด้วย ซึ่งผลการวิจัยครั้งนี้แตกต่างจากงานวิจัยของ Ji-Youn และคณะที่แสดงว่า ABCB1*2 ทำให้ระดับของ SN-38 ลดลงเพราะมีการ efflux มากขึ้นจาก ABCB1*2 (25) นอกจากนี้การที่มีระดับ CPT-11 สูงในผู้ป่วยรายนี้อาจมีส่วนถูกกระทบจาก liver enzyme สูง ได้อีกด้วย (AST= 54-65 U/L, ALT=32-39 U/L and ALP=154-186 U/L) การประเมินผลข้างเคียงของยาพบผู้ป่วยเป็นตะคริวที่กล้ามเนื้อขาบ่อยมากช่วง 12 ชั่วโมงหลังได้รับยา และพบ grade 1 neutropenia และ grade 2 diarrhea ในผู้ป่วยรายนี้

ผู้ป่วยรายที่ 3

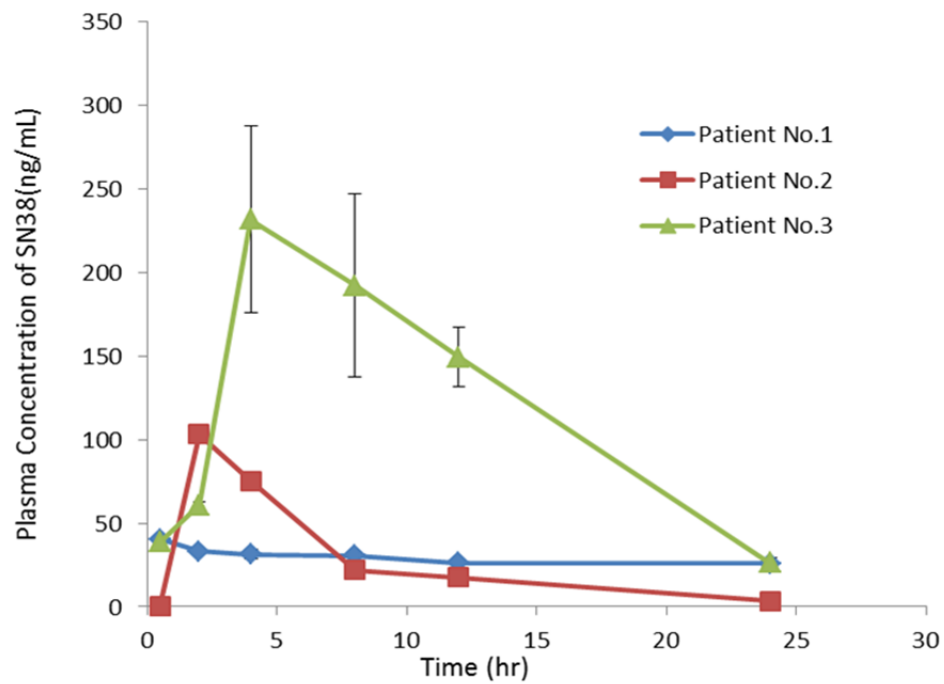
ผู้ป่วยชายไทยอายุ 65 ปี น้ำหนัก 65 กิโลกรัม มี genotype เป็น UGT1A1*6 homozygote และ wild type ของ ABCB1 ระดับ CPT-11 ถึงระดับสูงสุดเป็น 375.2 ng/mL หลังได้รับยา 120 นาที ค่าครึ่งชีวิต 7.8 ชม. มีระดับ SN-38 สูงสุดเป็น 231.8 ng/mL ซึ่งสูงกว่าผู้ป่วยรายที่ 2 ที่เป็น wild type ถึง 6 เท่า ซึ่งอาจเกิดจากอิทธิพลของ UGT1A1*6 homozygote ที่ทำให้การทำงานของ UGT1A1 ลดลง ทำให้การเปลี่ยนแปลง SN-38 ไปเป็น SN-38G ลดลงด้วยซึ่งผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับผลการวิจัยที่ได้ทำก่อนหน้านี้ เช่นของ Y.Ando, E.Rouits และ S.Hazama เป็นต้น (15-17) แม้ SN-38 ในเลือดสูงแต่ผู้ป่วยมีการขจัดออกของ SN-38 ได้เร็วซึ่งอาจผ่านทาง การ efflux ของ ABCB1 ทำให้ค่าครึ่งชีวิตของ SN-38 อยู่ที่ 3.5 ชม. ซึ่งสั้นกว่าผู้ป่วยรายที่ 2 ซึ่งมี ABCB1*2 heterozygote อย่างมาก ผู้ป่วยเป็นตะคริวที่กล้ามเนื้อขาบ่อยมากช่วง 12 ชั่วโมงหลังได้รับยาเช่นเดียวกับผู้ป่วยรายที่ 2 และพบ grade 1 neutropenia และ grade 2 diarrhea ในผู้ป่วยรายนี้

ตารางที่ 7: Pharmacokinetic parameters ของ CPT-11, SN-38 และ SN-38G ในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่

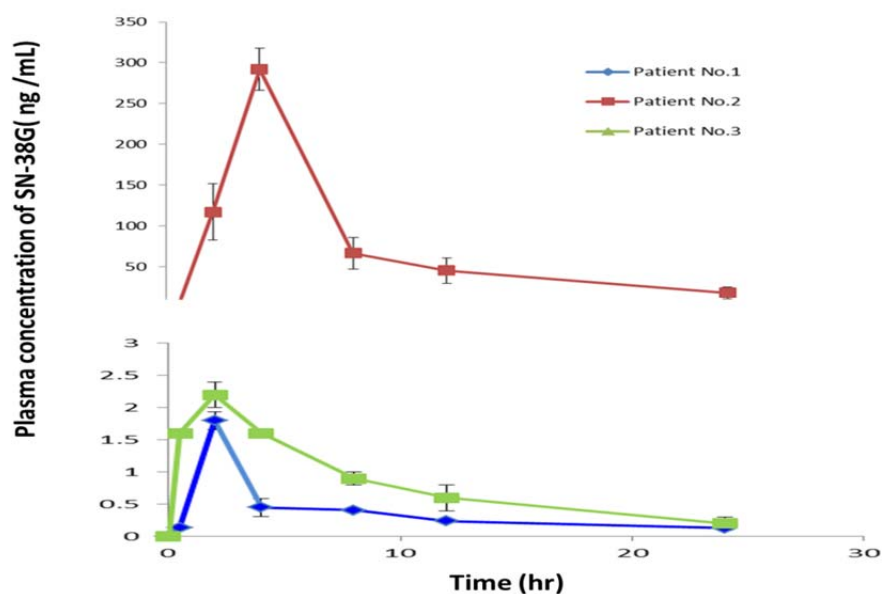
Pharmacokinetic parameters	CPT-11			SN38			SN38-G		
	Patient	Patient	Patient	Patient	Patient	Patient	Patient	Patient	Patient
	No.1	No.2	No.3	No.1	No.2	No.3	No.1	No.2	No.3
AUC (ng/mL.hr)	559.85	1348.2	439.6	126.7	115.5	481.1	1.85	311.1	3.5
Cmax (ng/mL)	405.5	680.14	375.2	40.3	103.1	231.8	1.8	25.6	2.2
Tmax (hr)	0.5	2.0	2.0	0.5	2.0	4.0	2.0	4.0	2.0
Ke (hr ⁻¹)	0.13	0.09	0.09	0.01	0.13	0.08	0.01	0.08	0.09
Half-life (hr)	5.4	7.8	7.8	81.3	5.4	8.22	103.8	8.5	7.4
Clearance (L/hr/kg)	5.4	2.4	6.3	-	-	-	-	-	-
Volume of distribution (L/kg)	41.8	27.4	71.1	-	-	-	-	-	-



รูปที่ 12. ระดับ CPT-11 ในเลือดของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่ หลังได้รับยาไอริโนทีแคนขนาด 180 mg/m^2 โดยการหยดเข้าเส้นเลือดดำภายใน 1.5 ชั่วโมง
(แสดงค่าเป็น mean $\pm$ SD)



รูปที่ 13. ระดับ SN-38 ในเลือดของผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ หลังได้รับยาไอริโนทีแคนขนาด 180 mg/m^2 โดยการหยดเข้าเส้นเลือดดำภายใน 1.5 ชั่วโมง
(แสดงค่าเป็น mean $\pm$ SD)



รูปที่ 14. ระดับ SN-38G ในเลือดของผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ หลังได้รับยาอิริโนทีแคนขนาด 180 mg/m^2 โดยการหยดเข้าเส้นเลือดดำภายใน 1.5 ชั่วโมง
(แสดงค่าเป็น mean $\pm$ SD)

สรุปผลการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้แม้จะได้ผู้ป่วยเข้าร่วมโครงการวิจัยไม่มากแต่คณะผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีการวัดระดับยาและเมตาโบไลต์ของยาโดยใช้เครื่อง UPLC MS/MS ซึ่งทันสมัยใช้เวลาน้อยในการวิจัย ตลอดจนพัฒนาวิธีเตรียมตัวอย่างเลือดให้ง่ายและใช้เวลาน้อย งานวิจัยนี้ได้นำเสนอการใช้วิธีการวัดระดับยาด้วยเครื่องดังกล่าวเป็นครั้งแรกในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่ที่ได้รับยาอิริโนทีแคน อย่างไรก็ตามเนื่องจากงานวิจัยครั้งนี้มีความจำกัดเรื่องจำนวนผู้ป่วยผลที่ได้อาจยังสรุปอะไรไม่ได้มาก ดังนั้นการศึกษาครั้งต่อไปควรหางบประมาณหรือขยายเวลาในการเก็บตัวอย่างเลือดจากคนไข้เพื่อให้ได้จำนวนผู้ป่วยที่มากขึ้น

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติจำนวน 1 ชิ้น คือ

Tankanitlert J, Yamanont P, Anunumcharoen S., Saichaemchan S., Pechatanan K, Morales NP
Sensitive UHPLC-MS/MS for Quantification of Irinotecan and Its Metabolites: An Application to
Advanced Colorectal Cancer Patient with Different UGT1A1*6 and ABCB1*2 Genotypes.

Chromatography B. 2015 status: submitted

เอกสารอ้างอิง

1. M. Ramesh, P. Ahlawat, N.R. Srinivas, Biomed Chromatogr, Irinotecan and its active metabolite, SN-38: review of bioanalytical methods and recent update from clinical pharmacology perspectives, *Biomed Chromatogr.* Jan;24(1) (2010) 104-23.
2. K. Hirose, C. Kozu, K. Yamashita et al, Correlation between plasma concentration ratios of SN-38 glucuronide and SN-38 and neutropenia induction in patients with colorectal cancer and wild-type UGT1A1 gene, *Oncol Lett.* 3(3) (2012) 694–698.
3. F. Ken-ichi, S. Alex, Pharmacogenetics of Irinotecan Disposition and Toxicity: A Review Current Clinical Pharmacology, 5 (2010) 209-217.
4. Z. Chen, D. Su, L. Ai, X. Jiang, C. Wu, Q. Xu, X. Wang, Z. Fan, UGT1A1 sequence variants associated with risk of adult hyperbilirubinemia: a quantitative analysis, *Gene.* Nov 15;552(1) (2014) 32-8.
5. J.P. Petersen, T.B. Henriksen, M.V. Hollegaard, P.K. Vandborg, D.M. Hougaard, O. Thorlacius-Ussing, F. Ebbesen, Extreme neonatal hyperbilirubinemia and a specific genotype: a population-based case-control study, *Pediatrics.* Sep;134(3)(2014) 510-5.
6. V. Kanestri, K. Mironov, A. Kravchenko, A. Pokrovskaya, O. Dribnohodova, E. Dunayeva, G. Tsiganova, M. Harbutly, M. Goliusova, V. Konnov, N. Kozirina, V. Shahgildyan, U. Kuimova, A. Popova, O. Efremova, D. Konnov, Clinical significance of the UGT1A1*28 allele detection in HIV-infected patients, *J Int AIDS Soc.* Nov 2;17(4 Suppl 3) (2014) 19579.
7. X. Cai, W. Cao, H. Ding, T. Liu et al, Analysis of UGT1A1*28 genotype and SN-38 pharmacokinetics for irinotecan-based chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer: results from a multicenter, retrospective study in Shanghai, *J Cancer Res Clin Oncol.* Sep139(9) (2013) 1579-89.
8. J.M. Xu, Y. Wang, F.J. Ge et al, Severe irinotecan-induced toxicity in a patient with UGT1A1*28 and UGT1A1*6 polymorphisms, *World J Gastroenterol.* Jun 28;19(24) (2013) 3899-903.
9. X. Liu, W. Xu, UGT1A1*28 polymorphisms: a potential pharmacological biomarker of irinotecan-based chemotherapies in colorectal cancer, *Pharmacogenomics.* Jun;15(9) (2014) 1171-4.
10. J. Tankanittlert, N.P. Morales, P. Fucharoen, S. Fucharoen, U. Chantharaksri, Association between promoter and coding region mutations of UDP-glucuronosyltransferase 1A1 and beta-thalassemia/Hb E with cholelithiasis, *Eur J Haematol.* Apr;80(4) (2008) 351-5.

11. Y. Saito, K. Maekawa, S. Ozawa, J. Sawada. Genetic polymorphisms and haplotypes of major drug metabolizing enzymes in East Asians and their comparison with other ethnic populations, *Curr Pharmacogenomics*. 5 (2007) 49-78.
12. L. Cheng, M. Li, J. Hu, W. Ren, L. Xie, Z.P. Sun, B.R. Liu, G.X. Xu, X.L. Dong, X.P. Qian, UGT1A1*6 polymorphisms are correlated with irinotecan-induced toxicity: a system review and meta-analysis in Asians, *Cancer Chemother Pharmacol*. Mar;73(3) (2014) 551-60.
13. K. Sai, Y. Saito, H. Sakamoto, K. Shirao, K. Kurose, M. Saeki, S. Ozawa, N. Kaniwa, S. Hirohashi, N. Saijo, J. Sawada, T. Yoshida Importance of UDP-glucuronosyltransferase 1A1*6 for irinotecan toxicities in Japanese cancer patients, *Cancer Lett*. 261(2008) 165–171.
14. H. Minami, K. Sai, M. Saeki, Y. Saito, S. Ozawa, K. Suzuki, N. Kaniwa, J. Sawada, T. Hamaguchi, N. Yamamoto, K. Shirao, Y. Yamada, H. Ohmatsu, K. Kubota, T. Yoshida, A. Ohtsu, N. Saijo. Irinotecan pharmacokinetics/pharmacodynamics and UGT1A genetic polymorphisms in Japanese: Roles of UGT1A1*6 and *28, *Pharmacogenet Genomics*. 17: (2007) 497–504.
15. S.R. Jada, R. Lim, C.I. Wong, X. Shu, S.C. Lee, Q. Zhou, B.C. Goh, B. Chowbay, Role of UGT1A1*6, UGT1A1*28 and ABCG2 c.421C[A polymorphisms in irinotecan-induced neutropenia in Asian cancer patients, *Cancer Sci*. 98 (2007) 1461–1467.
16. K. Sai, M. Saeki, Y. Saito, et al, UGT1A1 haplotypes associated with reduced glucuronidation and increased serum bilirubin in irinotecan-administered Japanese patients with cancer, *Clin.Pharmacol. Ther*. 75(6) (2004) 501–515.
17. A. Hamidovic, K. Hahn, J. Kolesar, Clinical significance of ABCB1 genotyping in oncology, *J Oncol Pharm Pract*. Mar;16(1) (2010) 39-44.
18. C. Marzolini, E. Paus, T. Buclin, R.B. Kim, Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance, *Clin Pharmacol Ther*. Jan;75(1) (2004) 13-33.
19. K. Sai, Y. Saito, K. Maekawa, S.R. Kim, N. Kaniwa, T. Nishimaki-Mogami, J. Sawada, K. Shirao, T. Hamaguchi, N. Yamamoto, H. Kunito, Y. Ohe, Y. Yamada, T. Tamura, T. Yoshida, Y. Matsumura, A. Ohtsu, N. Saijo, H. Minami, Additive effects of drug transporter genetic polymorphisms on irinotecan pharmacokinetics / pharmacodynamics in Japanese cancer patients, *Cancer Chemother Pharmacol*. May;66(1) (2010) 95-105.
20. E. Balcerczak, M. Panczyk, S. Piaskowski, G. Pasz-Walczak, A. Sałagacka, M. Mirowski, ABCB1/MDR1 gene polymorphisms as a prognostic factor in colorectal cancer, *Int J*

- Colorectal Dis. Oct;25(10) (2010) 1167-76.
21. K.E. Rhodes, W. Zhang, D. Yang, O.A. Press, M. Gordon, D. Vallböhmer, A.M. Schulteis, G. Lurje, R.D. Ladner, W. Fazzone, S. Iqbal S, H.J. Lenz, ABCB1, SLCO1B1 and UGT1A1 gene polymorphisms are associated with toxicity in metastatic colorectal cancer patients treated with first-line irinotecan, *Drug Metab Lett.* Jan;1(1): (2007) 23-30.
 22. A. Hamidovic, K. Hahn, J. Kolesar, Clinical significance of ABCB1 genotyping in oncology, *J Oncol Pharm Pract.* Mar;16(1) (2010) 39-44.
 23. J.M. Gow, L.M. Hodges, L.W. Chinn, D.L. Kroetz, Substrate-dependent effects of human ABCB1 coding polymorphisms , *J Pharmacol Exp Ther.* May;325(2) (2008) 435-42.
 24. Y. Fujiwara, H. Minami, An overview of the recent progress in irinotecan pharmacogenetics, *Pharmacogenomics.* Mar;11(3) (2010) 391-406.
 25. J.Y. Han, H.S. Lim, Y.K. Yoo, E.S. Shin, Y.H. Park, S.Y. Lee, J.E. Lee, D.H. Lee, H.T. Kim, J.S. Lee, Associations of ABCB1, ABCC2, and ABCG2 polymorphisms with irinotecan- pharmacokinetics and clinical outcome in patients with advanced non-small cell lung cancer, *Cancer.* Jul 1;110(1) (2007) 138-47.
 26. R.H. Mathijssen, S. Marsh, M.O. Karlsson, R. Xie, S.D. Baker, J. Verweij, A. Sparreboom, H.L. McLeod, Irinotecan pathway genotype analysis to predict pharmacokinetics, *Clin Cancer Res.* Aug 15;9(9)(2003) 3246-53.
 27. Z. Zhou, Y. Hua, J. Liu, D. Zuo, H. Wang, Q. Chen, L. Zheng, Z. Cai, Association of ABCB1/MDR1 polymorphisms in patients with glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head: Evidence for a meta-analysis, *Gene.* Sep 10;569 (1) (2015) 34-40.
 28. E. Rouits, V. Charasson, A. Pe'tain et al, Pharmacokinetic and pharmacogenetic determinants of the activity and toxicity of irinotecan in metastatic colorectal cancer patients, *British Journal of Cancer.* 99 (2008) 1239 – 1245.
 29. E. Marangon, B. Posocco, E. Mazzega, G. Toffoli, Development and validation of a high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of irinotecan and its main metabolites in human plasma and its application in a clinical pharmacokinetic study, *PLoS One.* Feb 17;10(2) (2015) e0118194.
 30. K.Araki , K.Fujita, Y.Ando , F.Nagashima , W.Yamamoto , H. Endo, T. Miya, K. Kodama, M. Narabayashi, Y. Sasaki, Pharmacogenetic impact of polymorphisms in the coding region of the UGT1A1 gene on SN-38 glucuronidation in Japanese patients with cancer, *Cancer Sci.* Nov;97(11)(2006) 1255-9.

ภาคผนวก

Sensitive UHPLC-MS/MS for Quantification of Irinotecan and Its Metabolites:
An Application to Advanced Colorectal Cancer Patient with different UGT1A1*6 and
ABCB1*2 Genotypes

Tankanitlert J¹, Yamanont P², Anannamcharoen S³, Saichaemchan S⁴, Pechatanan K⁴, Morales NP²

¹Department of Pharmacology, Phramongkutklao College of Medicine, Bangkok , Thailand

²Department of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

³ Department of Surgery, Phramongkutklao Hospital, Bangkok , Thailand

⁴Department of Medicine, Phramongkutklao Hospital, Bangkok , Thailand

Abstract

Irinotecan (7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidinocarbonyloxycamptothecin (CPT-11) is a widely used for advanced colorectal cancer. It is converted to 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) mediated by UGT1A1 to produce SN-38 glucuronide (SN-38G). Many studies had described a wide range of the drug efficacy and toxicity focusing on genetic variances especially UGT1A1*28, UGT1A1*6 and ABCB1*2 which closely related to irinotecan-induced toxicity. Even though the frequencies of UGT1A1*6 and ABCB1*2 were higher in Asian than Caucasian, but only few studies had revealed the effect of concurrence of UGT1A1*6 and ABCB1*2 on irinotecan in patient with advanced colorectal cancer. To understand the influence of these genetic variances on the drug and its major metabolites, an analytical method should be sensitive and effective. The purpose of this study were to validate method by using UHPLC-MS/MS to obtain sensitivity for the low level of CPT-11 and its metabolites and study the effect of UGT1A1*6 and ABCB1*2 on pharmacokinetics and toxicity of irinotecan in patients with advanced colorectal cancer. The Hypersil Gold column (1.9 μ m, 100 mm x 2.1 mm) was selected and 0.1 % formic acid in

water and 100% methanol was used as mobile phase. A positive ion mode and a selected reaction monitoring were used. The retention time were 1.88, 2.7, 1.5 and 2.6 min for CPT-11, SN-38, SN-38G, and CPT as internal standard, respectively. The limit of quantification (LOQ) were 0.1 ng/mL for SN-38 and 1 ng/mL for CPT-11 and CPT. The accuracy and coefficient of variation of all standards ranged from 81.97-110 % and 0.01-13.3 %, respectively. The calibration curves of all standards were linear ($R^2 > 0.994$) over the concentration ranges from 1-1000 ng/mL for CPT-11 and 1-300 ng/mL for SN-38 and CPT. This method was applied to three advanced colorectal cancer patients with different UGT1A1*6 and ABCB1*2 genotypes. After, 180 mg/m² of irinotecan (FOFLIRI) was administered by intravenous infusion within 1.5 hr, blood samples were collected for 24 hours. Plasma levels of CPT-11 and its metabolites were measured by UHPLC-MS/MS. Our results showed that the UGT1A1*6 homozygote seem to associate with the increase of SN-38 plasma level and ABCB1*2 heterozygote may associate with the increase of CPT-11 plasma level. This analytical method is a rapid and sensitive method for CPT-11 and its metabolites because of its uncomplicated sample preparation and high sensitivity. This method was first applied to determine CPT-11 and its metabolites in advanced colorectal cancer patients with different UGT1A1*6 and ABCB1*2 genotypes.

Introduction

Irinotecan (7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino] carbonyloxycamptothecin (CPT-11) is a topoisomerase I inhibitor widely used for advanced colorectal cancer patient. The drug is inactivated by cytochrome P450 to produce 7-ethyl-10-[4-N-(5-aminopentanoic acid)-1 piperidino] carbonyloxycamptothecin (APC) and 7-ethyl-10-(4-amino-1-piperidino) carbonyloxycamptothecin (NPC). CPT-11 is also activated to 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) which is approximately 100 times more potent than CPT-11. Then, SN-38 is conjugated with glucuronic acid mediated by UDP-glucuronosyltransferase 1A1(UGT1A1) to produce SN-38 glucuronide (SN-38G) (Figure 1). The side effect of irinotecan including neutropenia, diarrhea, anemia and bone marrow depression are usually observed. In addition, severe delay-diarrhea could be found because of its enterohepatic recirculation. Because the UGT1A1 is an isoform that has been implicated in irinotecan metabolism, therefore, many studies described the influence of the genetic variances of UGT1A1 especially the polymorphism in the promoter region of UGT1A1 gene known as UGT1A1*28 which closely linked to the side effects or toxicity of CPT-11 and SN-38 (1-6). Liu X et al. demonstrated that UGT1A1*28 heterozygote was also associated with irinotecan-induced toxicity(7). However the frequency of UGT1A1*28 was low in Asian and also in Thai population, while the frequency of UGT1A1*6 allele in Thai population (0.1) was significantly higher than Caucasians (0.013) (8-9). Previous studies showed the effect of UGT1A1*6 on the lower UGT activity and significant association with alteration of pharmacokinetics and toxicity of CPT-11 and SN-38 (10-15). Besides, SN-38 was metabolized via glucuronidation reaction, it was also eliminated by efflux transporter protein ,especially P-glycoprotein. The protein is encoded by the ATP binding cassette gene B1(ABCB1) which expressed in several organs such as small intestinal, liver, kidney and brain (16). There are several polymorphisms of ABCB1 gene including C3435T, C1236T and

G2677T/A (17-21). The frequency of G2677T polymorphism known as ABCB1*2 was higher in Asian (0.5) than those in European(0.3)(22). The association between ABCB1*2 and the increase of irinotecan toxicity was reported (23-26). However, there are only few studies showed the effect of concurrence of the two variances; UGT1A1*6 and ABCB1*2 on irinotecan. In addition, these studies had done in the different irinotecan-dosage regimens (27-28). To understand pharmacokinetics and pharmacodynamics of irinotecan in advanced colorectal cancer patient with different UGT1A1*6 and ABCB1*2, the analytical method should be sensitive. Several methods had been developed to quantify CPT-11 and its major metabolites in human plasma such as HPLC, LC MS/MS, but only few could quantify a very low concentration of SN-38 and SN-38G (29-30). Recently, Elena Marangen et al validated LC-MS/ MS method which the concentration ranges 10-10000 ng/mL for CPT-II, 1-500 ng/mL for SN-38 and 1-5000 ng/mL for SN-38G. However the run time was more than 10 min (31). In the year 2012, Xiaohong Chen et al. developed ultra high performance liquid chromatography mass spectrometry for quantification of CPT-11 and its metabolites which obtained sensitivity, specificity and faster run time but the sample preparation needed many steps and time consuming (32). The purpose of this study were to validate method for irinotecan and its metabolites in human plasma by using ultrahigh performance liquid chromatography mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) and to develop the sample preparation. This method was also applied for colorectal cancer patients with different UGT1A1*6 and ABCB1*2 genotypes.

Material and Methods

Standards and chemicals

Irinotecan (7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino] carbonyloxy camptothecin; CPT-11) purity > 99.5%, SN-38 (7-ethyl-10-hydroxycamptothecin) purity > 99.0% and camptothecin (internal standard) purity > 95% were purchased from Sigma-Aldrich company (St. Louis, MO). LC-MS grade methanol, acetonitrile, formic acid and other chemicals were commercially purchased. All the reagents used for PCR condition were dNTP (From Amersham Pharmacia Biotech, USA), 10 x buffer, Q solution, Taq polymerase (Qiagen, USA), primers for UGT 1A1 (Introgen, USA), primers for UGT ABCB1 (Introgen, USA). For the restriction fragment length polymorphism, the restriction enzymes were *Ban I*; concentration 10000 units/mL (New England Biolabs, USA) and *Ava II*; concentration 5000 units/mL (New England Biolabs, USA).

Preparation of stock solution and standard

Stock solutions of CPT-11, SN-38 and CPT were prepared in 10% DMSO at a concentration of 1000 µg/mL. A stock solution was further diluted with methanol to obtain the different working solution ranging from 100-1000 ng/mL.

Sample preparation

The plasma samples were prepared by collection of a pooled venous blood from five normal volunteers. Plasma was separated by centrifugation at 1700 g for 15 min at 4° C, and then put into the pooled plasma. The standard CPT-11, SN-38 and CPT were added to the pooled plasma. An aliquot of 500 µL of spiked plasma is placed into an Eppendorf centrifuge tube. After vortexed for 10 sec, all samples were incubated at room temperature for 30 min. Then, 250 µL of 0.1% formic acid in methanol was added in order to precipitate protein. The mixture is mixed by vortex mixer for 30 sec and subsequently centrifuged at 15,000 rpm for

15 min. Then the supernatant was extracted by solid phase extraction and 10 μ L of solution was injected into a LC-MS system.

Method validation

Linearity was evaluated by using spiked calibration curve standard. The calibration curve was constructed by using 5 standard points ranging of 1, 10, 100, 500, and 1000 ng/mL for CPT-11: 1, 10, 100, 200 and 300 ng/mL for SN-38 and 1, 10, 100, 200 and 300 ng/mL for CPT. The sample preparation was mentioned above. The linearity of the instrument for calibration curves were determined by linear regression analysis and correlation(r).

The precision and accuracy were determined by three times repeat analysis within one day (intra-day assay) and day to day analysed over period of three days (inter-day assay) with the samples at concentration of 10, 100 and 1000 ng/mL for CPT-11: 1, 100 and 500 ng/mL for SN-38 and 10, 100 and 500 ng/mL for CPT. The percentage of coefficient of variation (%CV) was then calculated which equal $[SD/Mean] \times 100$.

The recovery process used for determines the recovery of standard CPT-11, SN-38 and CPT in plasma of normal subject was compared with the commercially available CPT-11, SN-38 and CPT standards in methanol. The CPT-11, SN-38 and CPT were determined triplicately at the concentrations of 1, 100 and 1000 ng/mL for CPT, 1, 100 and 500 ng/mL for SN-38 and 10, 100 and 500 ng/mL for CPT. The procedures of collection and extraction were the same as the sample preparation. Matrix effect was evaluated by adding the standards into the plasma sample after SPE.

UHPLC-MS/MS conditions

Chromatographic separation was carried out on UHPLC-MS/MS (TSQ Quantum Access MAX, Thermo Scientific, USA). The analytes were separated using Hypersil Gold column (2.1 mm $\times$ 100 mm, particle size 1.9 μ m, Thermo Scientific) at 40°C in a temperature-controlled column compartment (TCC-3000SD, Thermo Scientific). A mobile phase consisting of 0.1% formic acid in water (mobile phase A) and 100% methanol (mobile phase B)

was operated by binary pump (HPG-3400RS, Thermo Scientific) at a flow rate of 0.4 mL/min. The linear gradient of mobile phase was mentioned as following:

step 1: the initial condition of 65 % mobile phase A and 35 % mobile phase B for 1 min

step 2: 65 % to 25% mobile phase A and 35 % to 75% mobile phase B for 2.5 min

step 3: 25 % to 65% mobile phase A and 75 % to 35% mobile phase B for 1.5 min

The total run time and injection volume were 3 min and 10 μ L, respectively.

The analysis of samples was performed on a triple quadrupole mass spectrometer equipped with a heated-electrospray ionization (HESI-II) probe. The source-dependent parameters were as follows: spray voltage (3500 V); sheath gas pressure (40 psi); auxiliary gas pressure (11 arbitrary units); skimmer offset (0 V), ion transfer tube temperature (350°C), vaporizer temperature (400°C); high purity argon (>99.98%) which was used as the collision gas (1.5 mTorr). The mass spectrometer operated in positive selected reaction monitoring (SRM) mode. The Xcalibur 2.1 (Thermo Scientific) was used for instrument control, data acquisition, and processing.

Genotyping Study

Patients with advanced colorectal cancer (n=3) were enrolled in genotyping study. The study protocol was approved by the ethics committee of Phramongkutklao Hospital and all subjects gave their written informed consent before participating.

Analysis of extracted DNA samples

DNA was extracted from leukocytes using the Genomic DNA mini kit. The quantity of DNA was determined by spectrofluorometer. Concentration of genomic DNA (dilution 1:100) was calculated after measuring the OD at 260 and 280 nm. It was observed that the concentration of DNA varied between 1-3 mg/mL. Quality of extracted DNA was determined by agarose gel electrophoresis.

PCR procedure for UGT1A1*6 and ABCB1*2

The 10 ng of genomic DNA was subjected to amplification by polymerase chain reaction (PCR) using 2 μ M of forward primers (5'AGATACTGTTGATCCCAGTG3') and reverse primers (5'CTTCAAGGTGTAAAATGGTC 3') for UGT1A1. For ABCB1 gene, the primers used for the PCRs were forward primers (5'TGCAGGCTATAGGTTCCAGG3') and reverse primers (5'TTTAGTTTGACTCACCTTCCC3'). The PCR was performed in 10 μ L volume containing 2 μ M of each primers, 0.1 μ L 10X buffer (Qiagen), 100 mM dNTP (Qiagen), 2.6 μ L ddH₂O and 0.1 U *Taq* polymerase (Applied Biosystems). After preheat with 95°C for five minutes, the PCR was conducted for 40 cycles each of 15 sec at 95°C, 30 sec at 55°C and 10 sec at 72°C. The PCR products from the 5' untranslated region to the 3' untranslated region covering the whole region were 150 bp and 224 bp for UGT1A1*6 and ABCB1*2, respectively.

Polyacrylamide gel preparation

The Gibo/BRL V16 vertical gel apparatus (Life Technologies; Gibo-BRL products, MD, USA) was used. The 19x19.5 cm front glass plate and the 16x19.5 cm back plate were set up with the 1.5 mm thick Teflon spacers and 20 well-comb. Twenty five mL of 8% polyacrylamide was prepared by mixing of 6 mL of acrylamide stock (50%), 7.5 mL of 5xTBE, and 22.9 mL of H₂O. Polymerization was initiated with 105 mL of ammonium persulfate and 25 μ L of TEMED. This solution was poured into space of the gel apparatus, inserted the comb and waited for 30 min for gel polymerization.

Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

The 12 μ L of PCR product digested with the enzyme was mixed with 3 μ L of loading dye and loaded onto a 8% non-denaturing polyacrylamide gel. The electrophoresis was performed at constant 240 volts for 1.5 hr. The gel was stained with Syber Safe® and then scanned with gel documentation system.

Application of method

Three patients with advanced colorectal cancer were participated the study after giving their written informed consent. All subjects underwent a physical examination, hematological and biochemical screening prior the study. A catheter was inserted into a forearm vein of the subjects for blood samplings and flushing of normal saline to prevent blood clotting. A first cycle of irinotecan (180 mg/m^2) was administered intravenously infusion within 1.5 hr following by 400 mg of 5-fluorouracil and 200 mg of leucovorin (FOLFIRI). Venous blood samples (3 mL) were collected in EDTA tubes before and at 0.5, 2, 4, 8, 12 and 24 hr after drug administration. The plasma was separated by centrifugation at 1700 g for 10 minutes at 4°C . The plasma was stored into a tube with tight cap and frozen at -80°C until analysis.

Pharmacokinetic determination

The plasma concentration of CPT-11, SN-38 and SN-38G were carried out by a standard non-compartmental method. The maximum plasma level (C_{max}) and time required to reach the peak (T_{max}) were directly obtained from the plasma profile. The area under the plasma concentration-time curve from time 0 to infinity ($AUC_{0-\infty}$) was determined by the trapezoidal rule until the last concentration measured and extrapolated to infinity. The terminal slope was obtained by linear regression of the terminal log plasma concentration data against time. The elimination rate constant (K_e) was calculated by using terminal slope multiplied by 2.303. The elimination half-life ($t_{1/2}$) of CPT-11, SN-38 and SN-38G were determined by the standard formula, $t_{1/2}$ equal to $0.693/K_e$. The apparent clearance (Cl) was calculated by equation: Cl equal to $\text{Dose}/AUC_{0-\infty}/\text{BW}$ where BW equal to body weight. The apparent volume of distribution (V_d) was calculated by equation: V_d equal to Cl/K_e . For SN-38G, we do not have standard to determine the concentration, we therefore calculated SN-38G concentration with SN-38 concentration.

Results and discussion

Mass spectrometry

In this study, we used 0.1% formic acid in water and 100% methanol as mobile phase to produce the highest separation and detector response at the flow rate of 0.4 mL/min. ESI resource in positive ion mode was used because the drug and its metabolites have several functional groups. The mass spectrometer for SRM setting was shown in Table 1. Because there was no commercially available standard of SN-38G, plasma sample of the patient was used to confirm using full scan and SIM mode to analyze parent (SN-38G) and lost product (glucuronide). The EPS mass spectrum of CPT-11, SN-38, SN-38G and CPT in plasma sample collected from the patient was represented in Figure 2.

Plasma sample preparation and validation procedures

Separation and specificity

Pooled plasma was spiked with the standard was compared with blank plasma. There was no significant interference from the endogenous substances at the same retention time (Figure 3 and 4). The retention time were 1.88 min for CPT-11, 2.7 min for SN-38, 2.6 for CPT and 1.5 min for SN-38G (Figure 5).

Precision

The precision for intra-day assay and inter-day assay of CPT-11, SN38 and SN-38G are summarized in Table 2. The standard CPT-11, SN38 and SN-38G were in an acceptable precision due to the low CV. The CV of intra-day assay was within 0.7-13.8%. and 0.01-7.8% for inter-day assay .

Limitation of quantitation (LOQ)

The lowest level of standard at ratio of detector response of standard/ detector response of noise at least 3 was classified as LOQ. The limit of quantitation (LOQ) in the plasma assay was established at 1 ng/mL of CPT-11 with CV 10-15%, 0.1 ng/mL of SN-38 with CV 13-19% and 1 ng/mL of CPT with CV 3-10 %.

Recovery

For sample preparation, many different SPE cartridges were evaluated, including HyperSep Retain PEP 5 mg/mL (Thermo Scientific, USA), Oasis® HLB 200 mg/6 mL (Waters, Ireland) and Oasis® HLB 30 mg/1 mL (Waters, Ireland). After SPE, the dried sample under nitrogen flow with 40 °C, was reconstituted with methanol and 0.1 M ammonium acetate (40:60 v/v). The recovery of all standards in dried and not dried samples was not different (10-40%). Furthermore, our results showed that the solution sample added with 250 µL of methanol and 0.1 M ammonium acetate (40:60 v/v), could produce the sharp peak and higher detector response. Recovery ranged from 10-20% , 10- 30% and 66-97 % for HyperSep Retain PEP, Oasis® HLB 200 mg/6 mL and Oasis® HLB 30 mg/ mL, respectively. We therefore selected the Oasis® HLB 30 mg/ mL for this study.

The efficiency of the procedure as the percentage of recovery was presented in Table 3. The recovery of CPT-11, SN-38 and SN-38G in plasma of healthy subjects (n=5) at 10 100 and 1000 ng/mL of CPT-11: 1, 100 and 500 ng/mL of SN-38 and 10 , 100 and 500 ng/mL of CPT ranged from 66.8-88.6%, 66.1-74.2% and 70.5-97.5 %, respectively. The CV of recovery of CPT-11, SN-38 and SN-38G were less than 13% . The plasma matrix had low effect on the quantification of CPT-11 and SN-38 (data was not shown).

Calibration curve

Lower limit of quantitation (LLOQ)

The lower limit of quantitation or sensitivity used to determine the lowest concentration of calibration curves, with acceptable precision ($CV \leq 15\%$) and accuracy ($\pm 15\%$), can be detected by UHPLC MS/MS.

The linearity of the method was evaluated over each curve with the range 1-1000 ng/mL for CPT-11, 1-300 ng/mL for SN-38 and CPT. The calibration curves of all standards were linear; $R^2 > 0.994$ (Figure 6). In this method, only 10 µL of injection volumes was used to produce the sharper peaks.

From this method, the result showed that the assay procedure was sensitivity, precision, specific, reproducible and acceptable recovery. Therefore, this analytical method was suitable for determining CPT-11, SN-38 and SN-38G concentrations in plasma.

Genotype study

The PCR product of UGT1A1 was 150 bp. After the digestion by *Ava II*, the wild type of UGT1A1 (GG) was found with one band(150 bp), UGT1A1*6 heterozygote (GA) was found with two band(140 bp and 120 bp) and UGT1A1*6 homozygous of variance (AA) was found with one band(120 bp). The PCR product of ABCB1 was 224 bp. After the digestion by *Ban I*, GG homozygote (wild type) with 224 bp, GT heterozygote with two bands of 224 bp and 198 bp and TT homozygous of variance with 198 bp were found. Genotype study was done in three patients with advanced colorectal cancer. The different UGT1A1*6 and ABCB1*2 genotypes in the patients were shown in Table.4.

Application

Three advanced colorectal cancer patient were enrolled to the study. The blood chemistry of the patients were listed in Table 5. After 180 mg/m² of irinotecan administration, the plasma profile of CPT-11, SN-38 and SN-38G were shown in Figure 7-9. The peak of SN-38G was followed those of SN-38 in all patients. The pharmacokinetic parameters were presented in Table 6.

Patient No 1

A 67-year-old man who weighs 68 kg was enrolled in this study. His genotype was UGT1A1*6 heterozygote and wild type ABCB1. The AUC, maximum concentration and half-life of CPT-11 were 559.85 ng/mL.hr, 405.5 ng/mL and 5.4 hr, respectively. The AUC of SN-38 (126.7 ng/mL) was higher than that of patient No 2 who had wild type of UGT1A1 (115.5 ng/mL). While the C_{max} of SN-38 in this patient (40.3 ng/mL) was lower than that in patient No 2 (103.1 ng/mL). Previous study demonstrated that the UGT1A1*6 heterozygote alone could not produce a strong association with the increase of SN-38 but when its

concurrence with UGT1A1*28, alteration of irinotecan disposition was observed (33). The patient No.1 had the lowest elimination rate constant of SN-38 and SN-38G resulting in long half-life of both metabolites. Grade 2 neutropenia and diarrhea were observed in this patient.

Patient No.2

A 72-year-old man who weighs 53 kg was enrolled in this study. His genotype was wild type of UGT1A1 and ABCB1*2 heterozygote. The AUC, maximum concentration and half-life of CPT-11 were 1348.2 ng/mL.hr, 680.14 ng/mL and 7.8 hr, respectively. The high AUC of CPT-11 in this patient may cause from lower efflux activity of ABCB1*2 heterozygote in gastrointestinal tract. This high CPT-11 concentration in this patient may lead to high level of SN-38 and SN-38G. The result of this study was in contrast with the results of Ji-Youn et al which demonstrated that ABCB1*2 trended to influence on lower SN-38 and SN-38G because of its higher efflux activity in patients with non-small cell lung cancer (23). However, in their study the lower AUC of CPT-11 was observed, while our result showed high AUC of CPT-11. In addition, the raise up of liver enzyme observed in this patient (AST= 54-65 U/L, ALT=32-39 U/L and ALP=154-186 U/L), could affect CPT-11 metabolism. Grade 1 neutropenia and grade 2 diarrhea were found in this patient.

Patient No.3

A 65-year-old man who weighs 63 kg was enrolled in this study. His genotype was UGT1A1*6 homozygote and wild type of ABCB1. The AUC, maximum concentration and half-life of CPT-11 were 439.6 ng/mL.hr, 375.2 ng/mL and 7.8 hr, respectively. The high AUC of SN-38 (481.1 ng/mL.hr) but low AUC of SN-38G (3.5 ng/mL.hr) were observed in this patient. This result could be explained by lower activity of UGT1A1*6 homozygote. However, high elimination rate constant (K_e) determined shorter half-life of SN-38 in this patient. Grade 1 neutropenia and grade 2 diarrhea were observed in this patient.

This method was successfully applied to the advanced colorectal cancer patients with different UGT1A1*6 and ABCB1*2 genotype. However, our data had limitation of sample size. The larger sample size should be further studied.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Thailand Research Fund (RSA5580033) and Phramongkutklao College of Medicine, Bangkok, Thailand

References

1. D.J. Crona, J. Ramirez, W. Qiao, A.J. de Graan, M.J. Ratain, R.H. van Schaik, R.H. Mathijssen, G.L. Rosner, F. Innocenti, Clinical validity of new genetic biomarkers of irinotecan neutropenia: an independent replication study, *Pharmacogenomics J.* 14 (2015) [Epub ahead of print]
2. Q. Xu, Y.Y. Ding, L.X. Song, J.F. Xu, Correlation of UGT1A1 and ERCC1 gene polymorphisms with the outcome of combined irinotecan plus cisplatin treatment in recurrent ovarian cancer. *Genet Mol Res.* Jun 29;14(2) (2015) 7241-7.
3. X. Liu, W. Xu, UGT1A1*28 polymorphisms: a potential pharmacological biomarker of irinotecan-based chemotherapies in colorectal cancer, *Pharmacogenomics.* Jun;15(9) (2014) 1171-4.
4. X. Cai, W. Cao, H. Ding, T. Liu, X. Zhou, M. Wang, M. Zhong, Z. Zhao, Q. Xu, L. Wang, Analysis of UGT1A1*28 genotype and SN-38 pharmacokinetics for irinotecan-based chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer: results from a multicenter, retrospective study in Shanghai, *J Cancer Res Clin Oncol.* Sep;139(9) (2013) 1579-89.
5. J.M. Xu, Y. Wang, F.J. Ge, L. Lin, Z.Y. Liu, M.R. Sharma, Severe irinotecan-induced toxicity in a patient with UGT1A1*28 and UGT1A1*6 polymorphisms, *World J Gastroenterol.* Jun 28;19(24) (2013) 3899-903.

6. M.M. Dias, R.A. McKinnon, M.J. Sorich, Impact of the UGT1A1*28 allele on response to irinotecan: a systematic review and meta-analysis, *Pharmacogenomics*. Jun;13(8) (2012) 889-99.
7. X. Liu, D. Cheng, Q. Kuang, G. Liu, W. Xu, Association between UGT1A1*28 polymorphisms and clinical outcomes of irinotecan-based chemotherapies in colorectal cancer: a meta-analysis in Caucasians, *PLOS One*. 8(3) (2013) e58489.
8. J. Tankaniltert, N.P. Morales, P. Fucharoen, S. Fucharoen, U. Chantharaksri, Association between promoter and coding region mutations of UDP-glucuronosyltransferase 1A1 and beta-thalassemia/Hb E with cholelithiasis, *Eur J Haematol*. Apr;80(4) (2008) 351-5.
9. L.K. Teh, H. Hashim, Z.A. Zakaria, M.Z. Salleh, Polymorphisms of UGT1A1*6, UGT1A1*27 & UGT1A1*28 in three major ethnic groups from Malaysia, *Indian J Med Res*. Aug;136(2) (2012) 249-59.
10. R.Tsunedomi, S. Hazama, Y. Fujita, A novel system for predicting the toxicity of irinotecan based on statistical pattern recognition with UGT1A genotypes, *Int J Oncol*. Oct;45(4) (2014) 1381-90.
11. Y. Wang, L. Shen, N. Xu, J.W. Wang, S.C. Jiao, Z.Y. Liu, J.M. Xu, UGT1A1 predicts outcome in colorectal cancer treated with irinotecan and fluorouracil, *World J Gastroenterol*. Dec 7;18(45) (2012) 6635-44.
12. K. Sai, Y. Saito, H. Sakamoto, K. Shirao, K. Kurose, M. Saeki, S. Ozawa, N. Kaniwa, S. Hirohashi, N. Saijo, J. Sawada, T. Yoshida, Importance of UDP-glucuronosyltransferase 1A1*6 for irinotecan toxicities in Japanese cancer patients, *Cancer Lett*. Mar 18;261(2) (2008) 165-71.
13. L. Cheng, M. Li, J. Hu, W. Ren, L. Xie, Z.P. Sun, B.R. Liu, G.X. Xu, X.L. Dong, X.P. Qian, UGT1A1*6 polymorphisms are correlated with irinotecan-induced toxicity: a system review and meta-analysis in Asians, *Cancer Chemother Pharmacol*. Mar;73(3) (2014) 551-60.

14. H. Minami, K. Sai, M. Saeki, Y. Saito, S. Ozawa, K. Suzuki, N. Kaniwa, J. Sawada, T. Hamaguchi, N. Yamamoto, K. Shirao, Y. Yamada, H. Ohmatsu, K. Kubota, T. Yoshida, A. Ohtsu, N. Saijo. Irinotecan pharmacokinetics/pharmacodynamics and UGT1A genetic polymorphisms in Japanese: Roles of UGT1A1*6 and *28, *Pharmacogenet Genomics*. 17 (2007) 497–504.
15. S. Hazama, H. Mishima, R. Tsunedomi, Y. Okuyama, T. Kato, K. Takahashi, H. Nozawa, H. Ando, M. Kobayashi, H. Takemoto, N. Nagata, S. Kanekiyo, Y. Inoue, Y. Hamamoto, Y. Fujita, Y. Hinoda, N. Okayama, K. Oba, J. Sakamoto, M. Oka, UGT1A1*6, 1A7*3, and 1A9*22 genotypes predict severe neutropenia in FOLFIRI-treated metastatic colorectal cancer in two prospective studies in Japan, *Cancer Sci*. Dec;104(12) (2013) 1662-9.
16. C. Marzolini, E. Paus, T. Buclin, R.B. Kim, Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance, *Clin Pharmacol Ther*. Jan;75(1) (2004) 13-33.
17. L. Cortejoso, L.A. López-Fernández. Pharmacogenetic markers of toxicity for chemotherapy in colorectal cancer patients. *Pharmacogenomics*. Jul;13(10) (2012) 1173-91.
18. E. Balcerczak, M. Panczyk, S. Piaskowsk, G. Pasz-Walczak, A. Sałagacka, M. Mirowski, ABCB1/MDR1 gene polymorphisms as a prognostic factor in colorectal cancer, *Int J Colorectal Dis*. Oct;25(10) (2010) 1167-76.
19. K.E. Rhodes, W. Zhang, D. Yang, O.A. Press, M. Gordon, D. Vallböhmer, A.M. Schultheis, G. Lurje, R.D. Ladner, W. Fazzone, S. Iqbal S, H.J. Lenz, ABCB1, SLCO1B1 and UGT1A1 gene polymorphisms are associated with toxicity in metastatic colorectal cancer patients treated with first-line irinotecan, *Drug Metab Lett*. Jan;1(1): (2007) 23-30.
20. A. Hamidovic, K. Hahn, J. Kolesar, Clinical significance of ABCB1 genotyping in oncology, *J Oncol Pharm Pract*. Mar; 16(1) (2010) 39-44.

21. J.M. Gow, L.M. Hodges, L.W. Chinn, D.L. Kroetz, Substrate-dependent effects of human ABCB1 coding polymorphisms , *J Pharmacol Exp Ther.* May;325(2) (2008) 435-42.
22. Y. Fujiwara, H. Minami, An overview of the recent progress in irinotecan pharmacogenetics, *Pharmacogenomics.* Mar;11(3) (2010) 391-406.
23. J.Y. Han, H.S. Lim, Y.K. Yoo, E.S. Shin, Y.H. Park, S.Y. Lee, J.E. Lee, D.H. Lee, H.T. Kim, J.S. Lee, Associations of ABCB1, ABCC2, and ABCG2 polymorphisms with irinotecan-pharmacokinetics and clinical outcome in patients with advanced non-small cell lung cancer, *Cancer.* Jul 1;110(1) (2007) 138-47.
24. L. Cortejoso, M.I. García, P. García-Alfonso, E. González-Haba, F. Escolar, M. Sanjurjo, L.A.López-Fernández. Differential toxicity biomarkers for irinotecan- and oxaliplatin-containing chemotherapy in colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* Jun;71(6) (2013) 1463-72.
25. K. Sai, Y. Saito, K. Maekawa, S.R. Kim, N. Kaniwa, T. Nishimaki-Mogami, J. Sawada, K. Shirao, T. Hamaguchi, N. Yamamoto, H. Kunito, Y. Ohe, Y. Yamada, T. Tamura, T. Yoshida, Y. Matsumura, A. Ohtsu, N. Saijo, H. Minami, Additive effects of drug transporter genetic polymorphisms on irinotecan pharmacokinetics / pharmacodynamics in Japanese cancer patients, *Cancer Chemother Pharmacol.* May;66(1) (2010) 95-105.
26. E. Rouits, V. Charasson, A. Pe'tain, M. Boisdron-Celle, J.P. Delord, M. Fonck, A. Laurand, A.L. Poirier, A. Morel, E. Chatelut, J. Robert, E. Gamelin, Pharmacokinetic and pharmacogenetic determinants of the activity and toxicity of irinotecan in metastatic colorectal cancer patients, *British Journal of Cancer.* 99 (2008) 1239 – 1245.
27. S. Marsh, J.H. Hoskins, Irinotecan pharmacogenomics, *Pharmacogenomics.* Jul;11(7) (2010)1003-10.
28. C. Lucía, L.F.A. Luis, Pharmacogenetic Markers of Toxicity for Chemotherapy in Colorectal Cancer Patients, *Pharmacogenomics.* 13(10) (2012)1173-1191.

29. W. Zhang, G.E. Dutschman, X. Li, M. Ye, Y.C. Cheng, Quantitation of Irinotecan and its two major metabolites using a liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometric, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* Oct 1;877(27) (2009) 3038-44.
30. F. D'Esposito, B.N. Tattam, I. Ramzan, M. Murray, A liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry (LC-MS/MS) assay for the determination of irinotecan (CPT-11) and its two major metabolites in human liver microsomal incubations and human plasma samples, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* Nov 15;875(2) (2008) 522-30.
31. E. Marangon, B. Posocco, E. Mazzega, G. Toffoli, Development and validation of a high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of irinotecan and its main metabolites in human plasma and its application in a clinical pharmacokinetic study, *PLoS One.* Feb 17;10(2) (2015) e0118194.
32. X. Chen, C.J. Peer, R. Alfaro, T. Tian, S.D. Spencer, W.D. Figg, J Quantification of irinotecan, SN-38, and SN-38G in human and porcine plasma by ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application to hepatic chemoembolization, *Pharm Biomed Anal.* Mar 25;62 (2012) 140-8.
33. K. Araki, K. Fujita, Y. Ando, F. Nagashima, W. Yamamoto, H. Endo, T. Miya, K. Kodama, M. Narabayashi, Y. Sasaki, Pharmacogenetic impact of polymorphisms in the coding region of the UGT1A1 gene on SN-38 glucuronidation in Japanese patients with cancer, *Cancer Sci.* Nov;97(11) (2006) 1255-9.

Table 1: Mass spectrometer for SRM setting

SRM setting	CPT-11	SN38	SN38-G	CPT(IS)
Precursor ion(m/z)	587.3	393.2	569.2	340.1
Production(m/z)	167	349.2	393.2	305.2
Collision energy(volts)	41	26	40	21
Entrance potential(volts)	126	100	126	109

Table 2. Precision and accuracy of CPT-11, SN-38 and CPT.

Intraday (n=3)

Analyte	Nominal conc. (ng/ml)	Mean $\pm$ SD	CV (%)	Accuracy (%)
CPT-11	10	10.1 $\pm$ 1.4	13.8	101.0
	100	105.0 $\pm$ 9.5	9.0	105.0
	1000	1064.1 $\pm$ 104.3	9.8	106.4
SN38	1	1.1 $\pm$ 0.04	3.6	110.0
	100	100.6 $\pm$ 4.7	4.7	100.6
	500	490.8 $\pm$ 29.8	6.1	98.2
CPT	10	12.2 $\pm$ 0.1	1.1	81.9
	100	107.3 $\pm$ 0.7	0.7	107.3
	500	501.8 $\pm$ 48.9	9.6	100.4

Interday (three days)

Analyte	Nominal conc. (ng/ml)	Mean $\pm$ SD	CV (%)	Accuracy (%)
CPT-11	10	10.2 $\pm$ 0.8	7.8	102.0
	100	105 $\pm$ 0.01	0.01	105.0
	1000	1016.7 $\pm$ 46.9	4.2	106.1
SN38	1	1.1 $\pm$ 0.04	4.8	110.0
	100	98.7 $\pm$ 2.4	2.4	98.7
	500	488.4 $\pm$ 17.9	3.7	97.7
CPT	10	11.1 $\pm$ 0.3	2.7	111.0
	100	102.4 $\pm$ 3.5	3.4	102.0

500 494.5 ± 7.0 1.4 98.8

Value are expressed as mean ± SD

Table 3. Recovery of CPT-11, SN-38 and CPT in plasma samples (n=5)

Analyte	Nominal conc. (ng/ml)	Recovery (%)	CV (%)
CPT-11	10	71.5 ± 5.7	7.9
	100	66.8 ± 4.4	6.5
	1000	88.6 ± 1.6	1.8
SN-38	1	66.1 ± 8.4	12.7
	100	74.2 ± 2.4	3.2
	500	63.3 ± 5.2	8.2
CPT	10	70.5 ± 6.7	9.5
	100	97.5 ± 11.9	12.5
	500	81.1 ± 8.0	9.8

Value are expressed as mean ±SD

Table 4. Difference genotypes of UGT1A1*6 and ABCB1*2 in three patients with advanced colorectal cancer

Patient No.	UGT1A1*6	ABCB1*2
1	Heterozygote	Wild type
2	Wild type	Heterozygote

3	Homozygote	Wild type
---	------------	-----------

Table 5: Blood chemistry of patients with colorectal cancer

Characteristics	Patient No.1			Patient No.2			Patient No.3		
	First visit	Second visit	Third visit	First visit	Second visit	Third visit	First visit	Second visit	Third visit
Hb (12-18 g/dL)	12.5	13.8	12.0	13.2	13.6	12.5	12.6	12.6	12.4
Hct (30-54%)	39	36	33	39	38.9	38.6	38	37.9	37.5
Neutrophil count (/mm ³)	4500	2500	1300	6500	5300	2300	7000	5500	4300
AST (15-37 U/L)	35	30	28	54	54	65	30	27	29
ALT (30-65 U/L)	30	45	56	32	32	39	40	56	48
ALP (50-136 U/L)	89	68	97	164	154	186	69	78	105

Hb = haemoglobin, HCT = haematocrit, AST = aspartate aminotransferase; ALT = alanine aminotransferase, ALP = alkaline phosphatase,

Table 6. Pharmacokinetic parameters of CPT-11, SN-38 and SN-38G in patients with colorectal cancer after 180 mg/m² IV infusion of irinotecan.

Pharmacokinetic parameters	CPT-11			SN38			SN38-G		
	Patient No.1	Patient No.2	Patient No.3	Patient No.1	Patient No.2	Patient No.3	Patient No.1	Patient No.2	Patient No.3
AUC (ng/mL.hr)	559.85	1348.2	439.6	126.7	115.5	481.1	1.85	311.1	3.5
Cmax (ng/mL)	405.5	680.14	375.2	40.3	103.1	231.8	1.8	25.6	2.2
Tmax (hr)	0.5	2.0	2.0	0.5	2.0	4.0	2.0	4.0	2.0
Ke (hr ⁻¹)	0.13	0.09	0.09	0.01	0.13	0.08	0.01	0.08	0.09
Half-life (hr)	5.4	7.8	7.8	81.3	5.4	8.22	103.8	8.5	7.4
Clearance (L/hr/kg)	5.4	2.4	6.3	-	-	-	-	-	-
Volume of distribution	41.8	27.4	71.1	-	-	-	-	-	-

(L/kg)

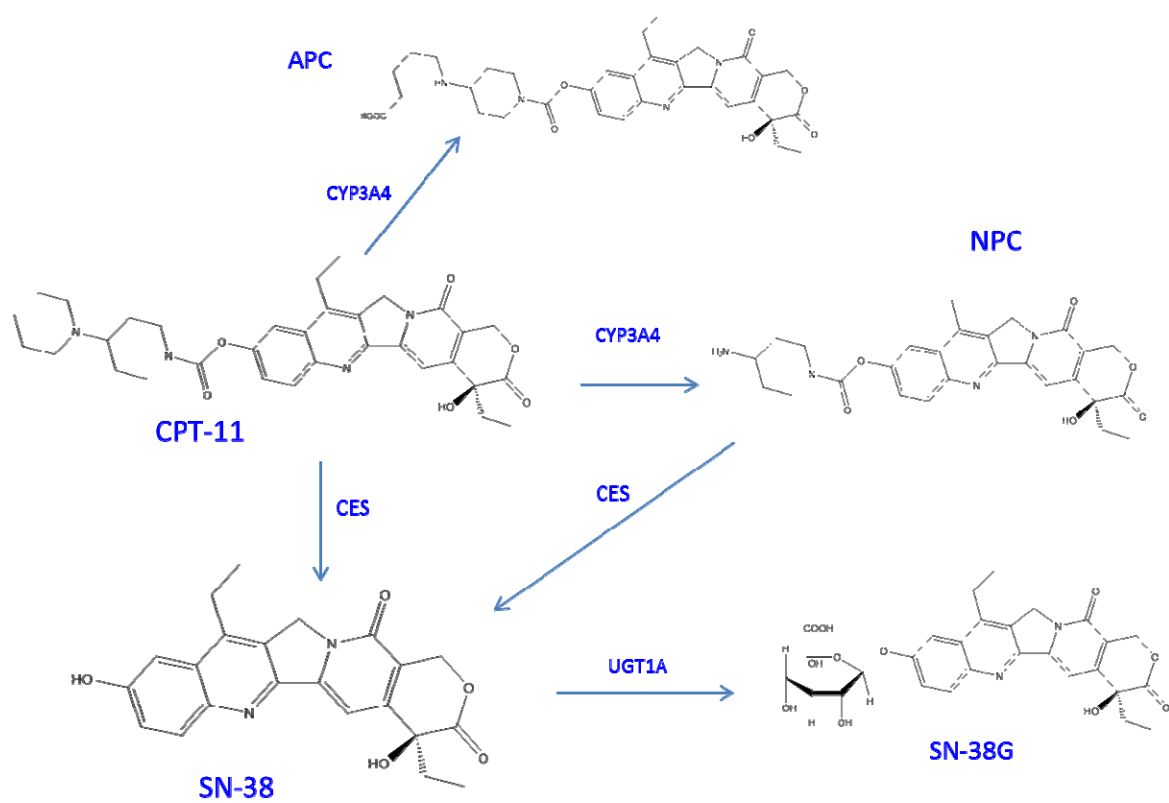


Figure 1: Metabolic pathway of irinotecan

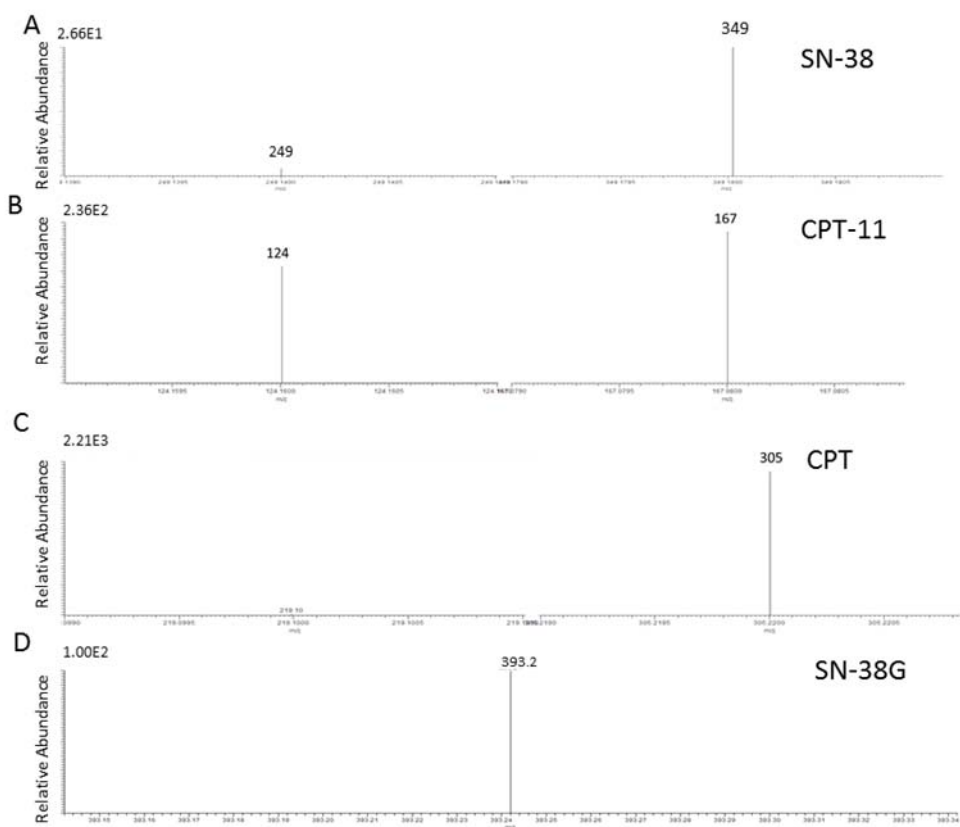


Figure 2: EPI mass spectrum of the plasma sample of advanced colorectal cancer patient
 Collected at 12.00 hr after infusion of 180 mg/m^2 of CPT-11 (A) SN-38, (B) CPT-11,
 (C) CPT and (D) SN-38G.

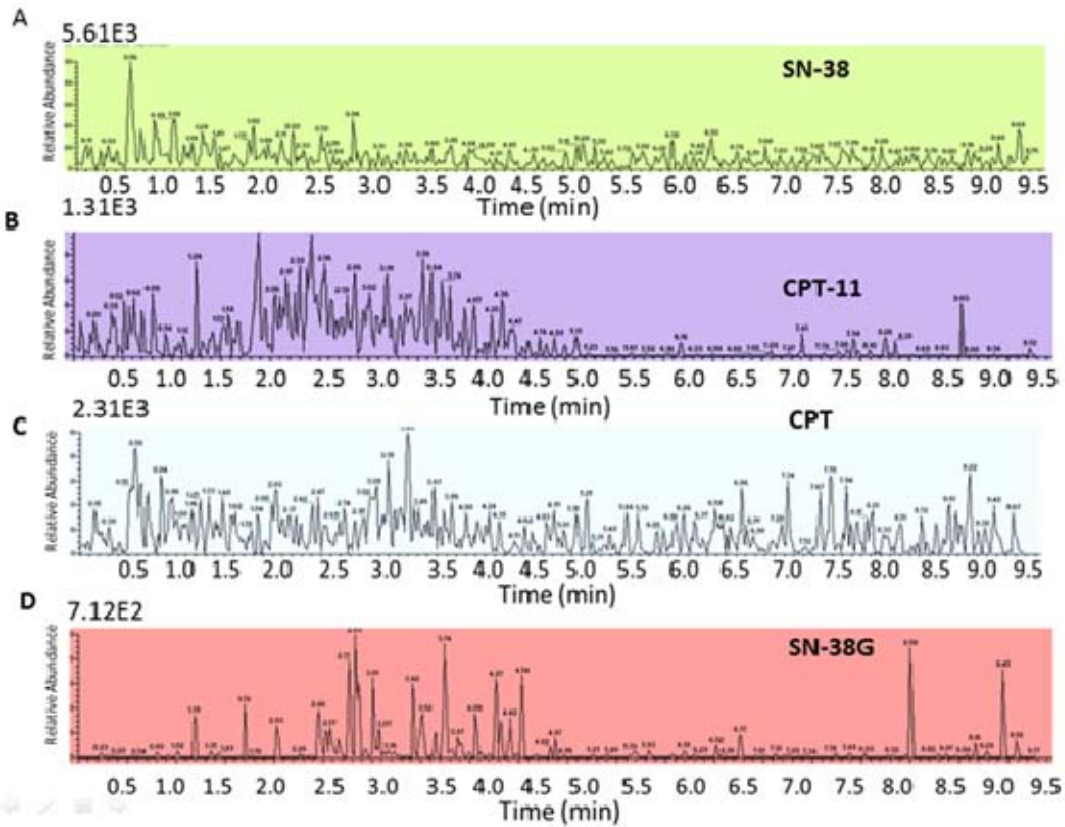


Figure 3. Chromatograms of blank pooled plasma (A) SN-38, (B) CPT-11, (C) CPT and (D) SN-38G

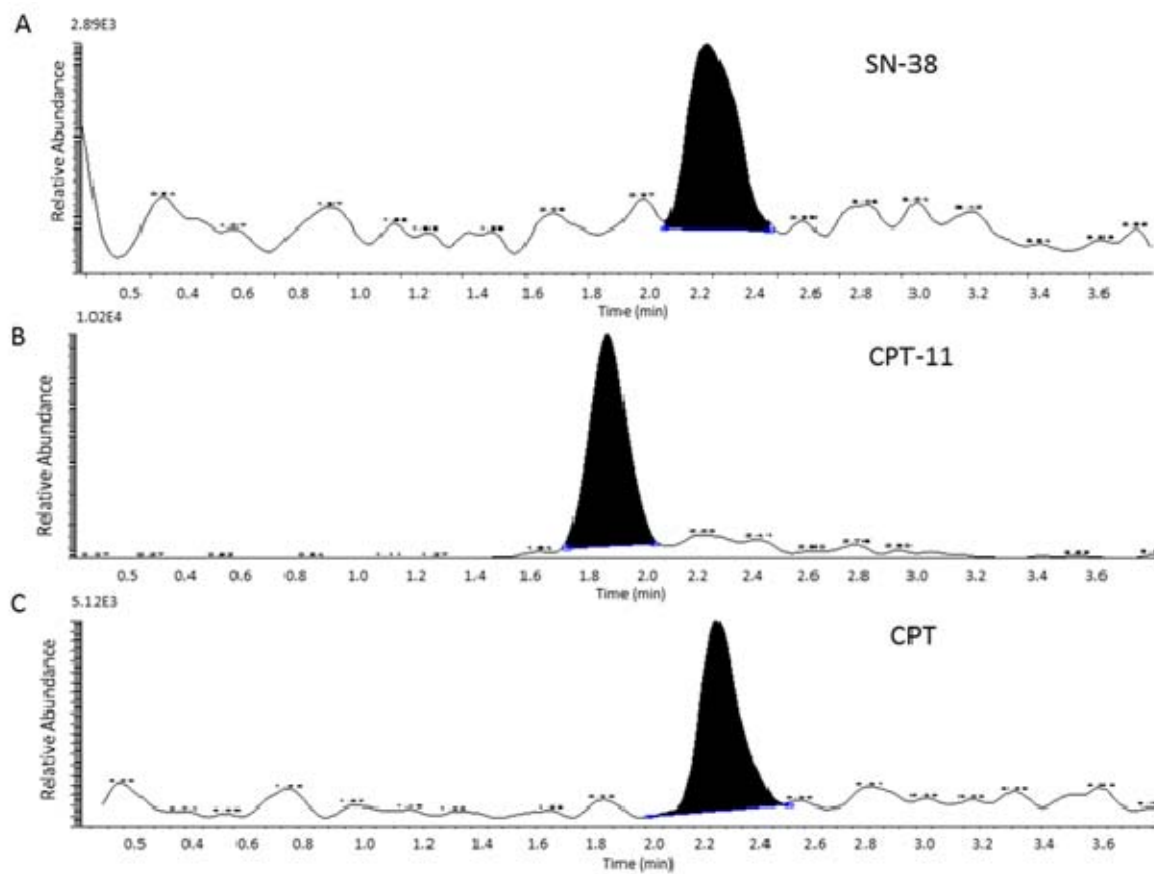


Figure 4. Chromatograms of plasma spiked with LLOQ of (A) 1 ng/mL of SN-38, (B) 10 ng/mL of CPT-11, (C) 10 ng/mL of CPT.

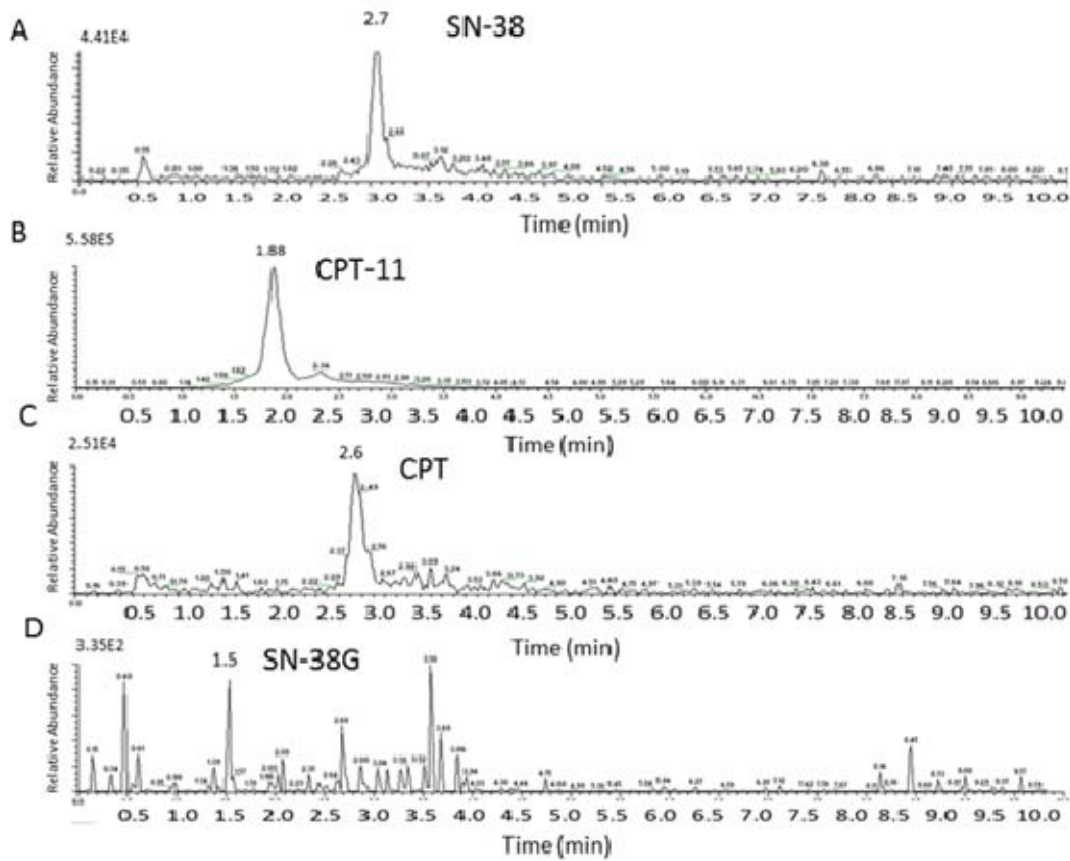


Figure 5. Chromatogram of plasma sample from a patient No 3 at 30 min after 180 mg/m² i.v.infusion of irinotecan (A) SN38, (B) CPT-11, (C) CPT(IS) and (D) SN38-G

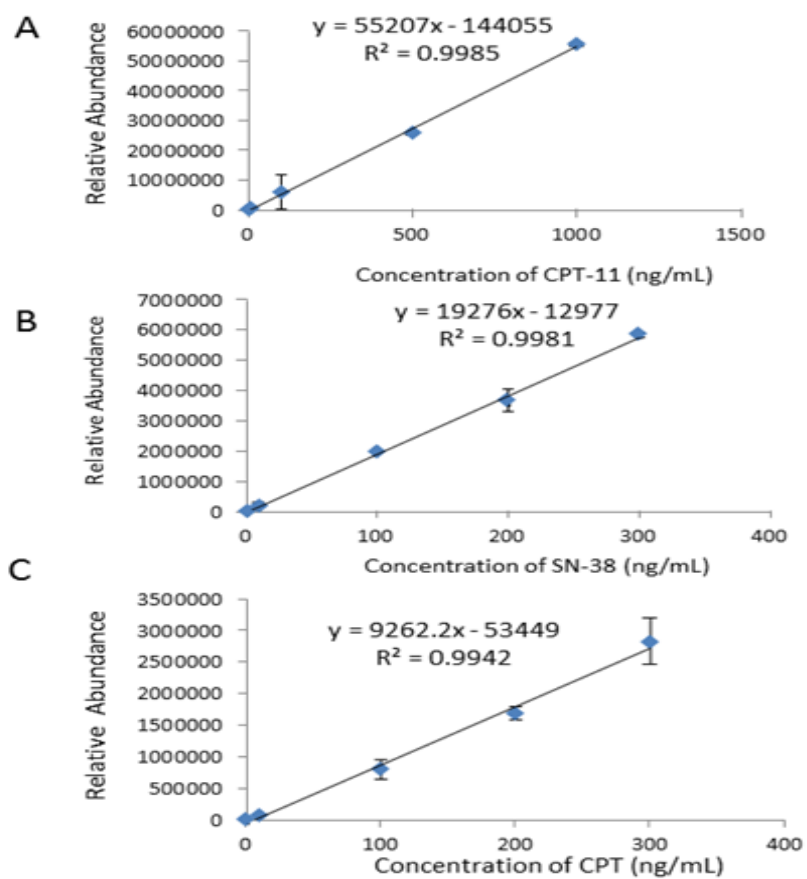


Figure 6. The calibration curves of (A) CPT-11, (B) SN-38 and (C) CPT.

Value are expressed as mean $\pm$ SD (n=5)

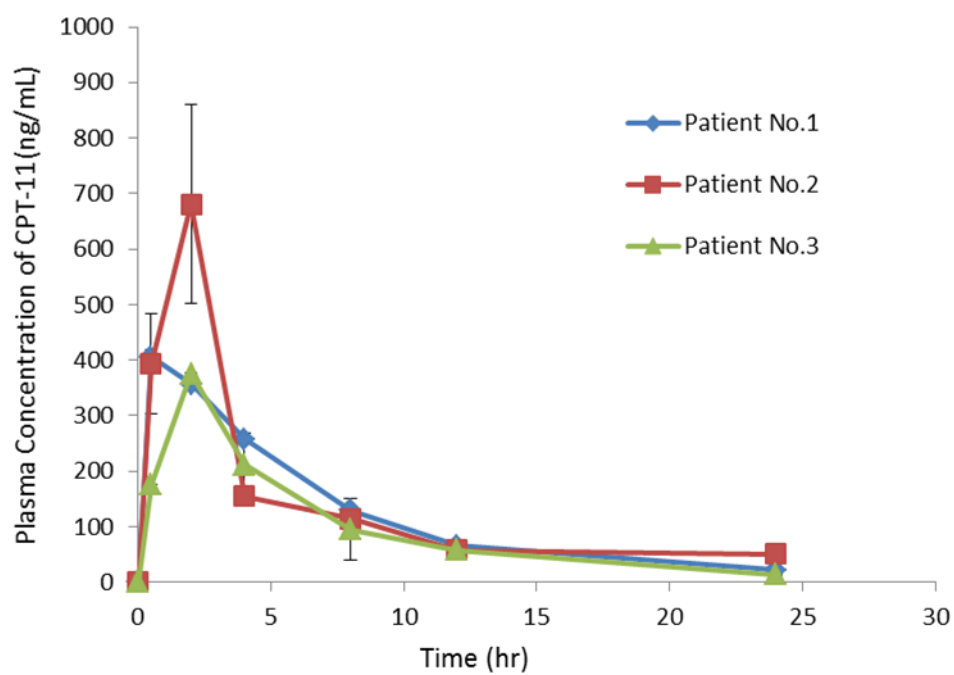


Figure 7. Plasma profiles of CPT-11 in patients with advanced colorectal cancer after 180 mg/m² i.v. infusion of irinotecan. Value are expressed as mean $\pm$ SD

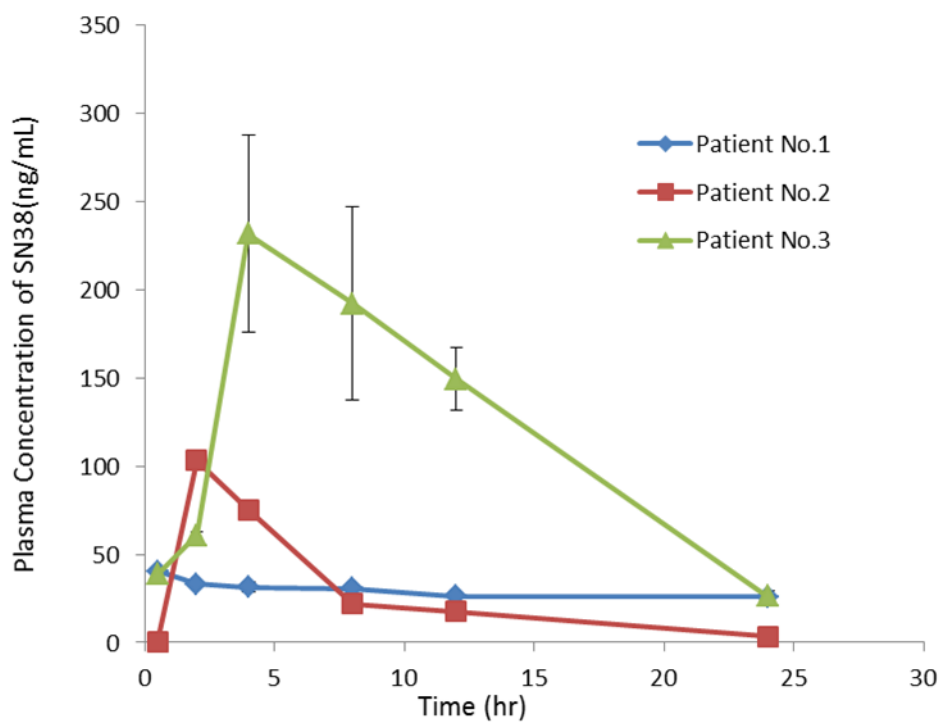


Figure 8. Plasma profiles of SN-38 in patients with advanced colorectal cancer after 180 mg/m² i.v. infusion of irinotecan. Value are expressed as mean $\pm$ SD

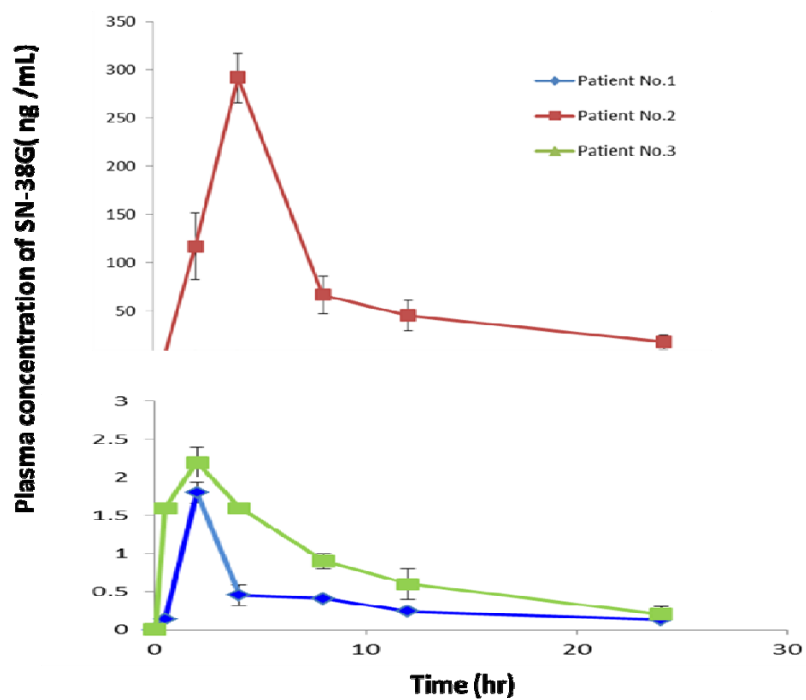


Figure 9. Plasma profiles of SN-38G in patients with advanced colorectal cancer after 180 mg/m² i.v. infusion of irinotecan. Value are expressed as mean $\pm$ SD