Thesis Title Anti-P-glycoprotein Conjugated Nanoparticles for Targeting Drug Delivery in Cancer Treatment

Author Miss Pantiwa Iangcharoen

Degree Master of Science (Pharmaceutical Sciences)

Thesis Advisory Committee

Asst. Prof. Dr. Chadarat Ampasavate	Advisor
Assoc. Prof. Dr. Pornngarm Dejkriangkraikul	Co-advisor
Asst. Prof. Dr. Songyot Anuchapreeda	Co-advisor

ABSTRACT

The overexpressed P-glycoprotein (Pgp) of the multidrug resistance (MDR) cancer cells is a major obstacle limiting chemotherapeutic outcomes. Targeting therapeutics to specific sites could enhance efficacy of drugs while reducing the dose required along with unwanted side effects. In this work, the antibody of P-glycoprotein (anti-Pgp) was used to target nanoparticles to human multidrug resistance cervical carcinoma cell line; KB-V-1, Pgp high expressing cell line, compared to human drug sensitive cervical carcinoma cell line; KB-3-1, Pgp non expressing cell line. To obtain the optimal targeted drug delivery system by synthesis the anti-Pgp functionalized nanoparticles. The two different formulations of the anti-Pgp functionalized nanoparticles, were synthesized for recruiting the optimal targeted drug delivery system. The comparison of using anti-P-gp conjugated a poly (DL-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles conjugated with polyethylene glycol (PEG); NP1, and anti-Pgp conjugated a modified poloxamer on PLGA nanoparticles; NP2, has been investigated. The cellular uptake capacity of nanoparticles was

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

confirmed by fluorescence microscopy when coumarin-6 was used as a fluorescence probe in this study. The results showed that the anti-Pgp conjugated NP1 (1418 ± 90 nm) possessed larger particle size than the anti-Pgp conjugated NP2 (282 ± 28 nm), (p<0.001). For both systems, there was higher fluorescence intensity of the targeted nanoparticles in KB-V-1 cells when compared to KB-3-1 cells, thus the targeted nanoparticles might be internalized into KB-V-1 cells to a greater extent than into KB-3-1 cells, while there was no different fluorescence intensity between two different cell types for untargeted nanoparticles. Although the results exhibited the specificity of targeted delivery nanoparticles of both anti-Pgp conjugated NP1 and NP2. The NP2 showed greater characteristics and by far was better than the NP1. Nonetheless, the anti-Pgp conjugated NP2 were unable to store in powder form without altering the characteristics of nanoparticles. It obtained large size as 2636 ± 935 nm after freeze-drying. Thus the NP3 was developed, adapting from the NP2, using centrifugation filtration with Amicon devices to gain the proper characteristics and properties of nanoparticles as effective targeted delivery system. The anticipated anti-Pgp conjugated NP3 obtained small size as 150 ± 1 nm and retained size after freeze-drying process as 161 ± 3 nm. Moreover, the nanoparticle uptake study of freeze-dried of anti-Pgp conjugated NP3 showed its ability to retain the biological property as there was higher fluorescence intensity of freeze-dried of anti-Pgp conjugated NP3 in KB-V-1 cells when compared to KB-3-1 cells, similar to the non-freeze-dried ones, suggesting that the anti-Pgp conjugated NP3 are the promising drug delivery vehicle for overcoming the MDR induced by the overexpression of Pgp on cell membrane.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ อนุภาคนาโนสังยุคแอนติพีกลัยโคโปรตีนสำหรับการขนส่งยาสู่เป้าหมายในการรักษามะเร็ง

ผู้เขียน นางสาวพรรณทิวา เอี้ยงเจริญ

ปริญญา เภสัชศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เภสัชกรรม)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ. ดร. ชฎารัตน์ อัมพะเศวต อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
รศ. ดร. พรงาม เดชเกรียงไกรกุล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผศ. ดร. ทรงยศ อนุชปรีดา อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

การแสดงออกที่มากเกินของพี-กลัยโคโปรตีน (P-glycoprotein, Pgp) ของเซลล์มะเร็งดื้อยาเป็นอุปสรรคสำคัญที่จำกัดประสิทธิผลของยารักษามะเร็ง ระบบนำส่งยาสู่เป้าหมายเพื่อนำยาไปอยู่ในเนื้อเยื่อที่เฉพาะเจาะจงสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพยาในขณะที่ลดขนาดยาที่ใช้ในการรักษาพร้อมกับลดผลข้างเคียงที่ไม่ต้องการ ในการวิจัยนี้ใช้แอนติบอดีต่อพี-กลัยโคโปรตีน (anti-Pgp) เพื่อนำส่งอนุภาคขนาดนาโนเมตรไปสู่เป้าหมายที่เซลล์มะเร็งปากมดลูกของมนุษย์ที่ดื้อยาซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการแสดงออกของพี-กลัยโคโปรตีนที่สูงคือเซลล์ KB-V-1 เปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งปากมดลูกของมนุษย์ที่ไวต่อยาซึ่งเป็นเซลล์ที่มีไม่มีการแสดงออกของพี-กลัยโคโปรตีนคือ KB-3-1 และได้ทำการทดสอบคัดเลือกระบบการนำส่งยาสู่เป้าหมายด้วยการสังเคราะห์อนุภาคขนาดนาโนเมตรที่มีแอนติบอดีต่อพี-กลัยโคโปรตีน โดยการเปรียบเทียบระหว่างสองระบบ คือ อนุภาคขนาดนาโนเมตรที่ประกอบด้วย poly(DL-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) คอนจูเกตกับ polyethylene glycol (PEG) เป็นระบบแรกหรือ NP1 และระบบที่สองหรือ NP2 คืออนุภาคขนาดนาโนเมตรที่ประกอบด้วย PLGA กับ poloxamer ซึ่งได้ถูกปรับเปลี่ยนให้มีหมู่คาร์บอกซีลิคในโครงสร้างความสามารถในการนำอนุภาคเข้าสู่เซลล์เป้าหมายยืนยันด้วยภาพจากกล้องฟลูออเรสเซนซ์โดยใช้คูมารินเป็นสารเรืองแสง จากผลการทดลองแอนติบอดีต่อพี-กลัยโคโปรตีนต่อเชื่อมกับ NP1 (1418 ± 90 nm) มีขนาดอนุภาคใหญ่กว่า แอนติบอดีต่อพี-กลัยโคโปรตีนต่อเชื่อมกับ NP2 (282 ± 28 nm), (p<0.001) และสำหรับอนุภาคขนาดนาโนเมตรทั้งสองระบบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อบ่มเซลล์ด้วยอนุภาคขนาดนาโนเมตรที่มีการติดแอนติบอดีต่อพี-กลัยโคโปรตีนเพื่อเป็นตัวนำสู่เป้าหมายพบว่าความเข้มของการเรืองแสงในเซลล์ KB-V-1 มากกว่าเซลล์ KB-3-1 ในขณะที่เมื่อบ่มเซลล์ด้วยอนุภาคขนาดนาโนเมตรที่ไม่มีการติดตัวนำสู่เป้าหมายไม่พบความแตกต่างของความเข้มการเรืองแสงระหว่างเซลล์ทั้งสองชนิด แม้ว่าผลการทดลองดังกล่าวได้ยืนยันความเฉพาะเจาะจงของการนำส่งอนุภาคขนาดนาโนเมตรทั้งสองระบบที่ได้ต่อเชื่อมกับแอนติบอดีต่อพี-กลัยโคโปรตีนสู่เซลล์เป้าหมาย แต่โดยรวมแล้ว NP2 ดีกว่า NP1 ทั้งในแง่ความง่ายในการผลิตและคุณลักษณะของอนุภาค อย่างไรก็ตามคุณลักษณะอนุภาคของ NP2 ที่ต่อเชื่อมกับแอนติบอดีต่อพี-กลัยโคโปรตีน เปลี่ยนไปหลังจากผ่านกระบวนการทำให้แห้งเพื่อเก็บในรูปผง โดยอนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้นเป็น 2636 ± 935 nm ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนา NP3 ขึ้นจาก NP2 โดยใช้การปั่นกรองด้วย Amicon เพื่อให้ได้อนุภาคที่มีคุณลักษณะ และคุณสมบัติที่เหมาะสมเพื่อเป็นระบบนำส่งยาสู่เป้าหมายอย่างมีประสิทธิผล จากการพัฒนานี้ทำให้ได้ NP3 ที่ต่อเชื่อมกับแอนติบอดีต่อพี-กลัยโคโปรตีน ที่มีขนาดเล็กเพียง 150 ± 1 nm และคงขนาดหลังจากผ่านการทำให้แห้งได้เป็น 161 ± 3 nm นอกจากนั้น เมื่อศึกษาการเข้าสู่เซลล์ของอนุภาคแอนติบอดีต่อพี-กลัยโคโปรตีนที่ต่อเชื่อมกับ NP3 ที่ผ่านการทำให้แห้งพบว่าอนุภาคดังกล่าวสามารถคงคุณสมบัติทางชีวภาพไว้ได้จากผลการทดลองที่แสดงความเข้มของการเรืองแสงในเซลล์ KB-V-1 มากกว่าเซลล์ KB-3-1 คล้ายกันกับผลของ NP3 ที่ต่อเชื่อมกับแอนติบอดีต่อพี-กลัยโคโปรตีนที่ยังไม่ผ่านการทำให้แห้ง ดังนั้น NP3 ที่ต่อเชื่อมกับแอนติบอดีต่อพี-กลัยโคโปรตีนน่าจะเป็นระบบนำส่งยาที่เหมาะสมสำหรับการพัฒนาเพื่อใช้รักษามะเร็งดื้อยาที่มีการแสดงออกของพี-กลัยโคโปรตีนที่สูงขึ้นบนผิวเซลล์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved