

ฤทธิ์ในการต้านมะเร็งและการตั้งตำรับไมโครอิมัลชันเพื่อนำส่งผ่านผิวหนังของ
เทโมโซโลไมด์เฮกซิลเอสเทอร์



นางสาวพนัสยา ศุภสารสาทร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-14-2267-9

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ANTICANCER ACTIVITY AND MICROEMULSION
FORMULATION FOR TRANSDERMAL DELIVERY OF
TEMOZOLOMIDE HEXYL ESTER**

Miss Panassaya Suppasansatorn



ศูนย์วิทยทรัพยากร

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Pharmaceutical Technology

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2005

ISBN 974-14-2267-9

Copyright of Chulalongkorn University

Thesis Title ANTICANCER ACTIVITY AND MICROEMULSION
FORMULATION FOR TRANSDERMAL DELIVERY OF
TEMOZOLOMIDE HEXYL ESTER
By Miss Panassaya Suppasansatorn
Field of study Pharmaceutical Technology
Thesis Advisor Associate Professor Ubonthip Nimmannit, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn
University in Partial Fulfillments of the Requirements for Doctor's Degree

.....*Pornpen Pramyothin*.....Dean of the Faculty of
Pharmaceutical Sciences
(Associate Professor Pornpen Pramyothin, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....*Papavadee Klongpityapong*..... Chairman
(Associate Professor Papavadee Klongpityapong)

.....*Ubonthip Nimmannit*..... Thesis Advisor
(Associate Professor Ubonthip Nimmannit, Ph.D.)

.....*Parkpoom Tengamnuay*..... Member
(Associate Professor Parkpoom Tengamnuay, Ph.D.)

.....*Warangkana Warisnoicharoen*..... Member
(Assistant Professor Warangkana Warisnoicharoen, Ph.D.)

.....*Pornchai Rojsitthisak*..... Member
(Pornchai Rojsitthisak, Ph.D.)

.....*Pongsakornpat Arunothayanun*..... Member
(Pongsakornpat Arunothayanun, Ph.D.)

พนัสยา ศุภสารสารพร: ฤทธิ์ในการต้านมะเร็งและการตั้งตำรับไมโครอิมัลชันเพื่อนำส่งผ่านผิวหนังของเทโมโซโลไมด์เฮกซิลเอสเทอร์. (ANTICANCER ACTIVITY AND MICROEMULSION FORMULATION FOR TRANSDERMAL DELIVERY OF TEMOZOLOMIDE HEXYL ESTER) อ. ที่ปรึกษา: รศ. ดร. อุบลทิพย์ นิยมมานิตย์, 129 หน้า, ISBN 974-14-2267-9

จากผลการศึกษาประสิทธิภาพการต้านมะเร็งของยาเทโมโซโลไมด์ (Temozolomide, TMZ) ระดับคลินิกในเฟสสองและสาม พบว่าเมื่อให้ยาเทโมโซโลไมด์ในรูปแบบยาเม็ดแคปซูลรับประทานจะมีฤทธิ์ในการรักษาโรคมะเร็งที่ผิวหนังได้เทียบเท่ากับ คาคาร์บาซีน (Dacarbazine) ซึ่งเป็นยารักษามะเร็งผิวหนังที่ได้รับการยอมรับ แต่อย่างไรก็ตามในการรักษาความผิดปกติของโรคทางผิวหนังจะให้ผลดีเมื่อให้ยาโดยตรงทางผิวหนัง จากผลการศึกษาก่อนหน้านี้แนะนำว่าอนุพันธ์เทโมโซโลไมด์เฮกซิลเอสเทอร์ (Temozolomide hexyl ester, TMZ-HE) สามารถซึมผ่านผิวหนังได้ดี จากค่าสัมประสิทธิ์การซึมผ่าน (Permeability co-efficiency, K_p) และอัตราการซึมผ่าน (Flux, J_{ss}) นอกจากนี้ยังพบอีกว่าในระหว่างทดลองการซึมผ่านโดยใช้ผิวหนังหนูและผิวหนังมนุษย์ เทโมโซโลไมด์เฮกซิลเอสเทอร์ถูกไฮโดรไลซ์โดยเอสเทอร์เรสเอ็นไซม์ (esterase enzyme) ในผิวหนังได้เป็น เทโมโซโลไมด์เอซิด (Temozolomide acid) ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง การศึกษานี้จึงได้ทดสอบฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งของเทโมโซโลไมด์เฮกซิลเอสเทอร์เปรียบเทียบกับยาเทโมโซโลไมด์ต้นแบบและเทโมโซโลไมด์เอซิด และพบว่าเทโมโซโลไมด์เฮกซิลเอสเทอร์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (IC_{50}) ได้เทียบเท่ากับยาต้นแบบ และเทโมโซโลไมด์เอซิด และยังสามารถยับยั้งขนาดของก้อนมะเร็งที่ผิวหนังหนูซึ่งเกิดจากการปลูกเซลล์มะเร็งผิวหนังมนุษย์ ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับหนูกุ่มควบคุมที่ไม่ได้ทายา สุดท้ายจึงทดลองพัฒนาสูตรตำรับยาที่ใช้ทางผิวหนัง (Topical formulation) ของเทโมโซโลไมด์เฮกซิลเอสเทอร์ โดยใช้ระบบไมโครอิมัลชัน (Microemulsion) ซึ่งประกอบด้วย วิตามินอี ทีพีจีเอส (Vit E TPGS) เป็นสารลดแรงตึงผิว (Surfactant), โอลิสิกแอซิด (Oleic acid, OA) และไอโซโพรพิลไมริสเทต (Isopropyl myristate, IPM) เป็นส่วนของน้ำมัน และในบางตำรับจะใช้ ไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ (Isopropyl alcohol) เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม (Co-surfactant) จากนั้นจึงทดสอบการซึมผ่านของเทโมโซโลไมด์เฮกซิลเอสเทอร์จากตำรับไมโครอิมัลชันดังกล่าวผ่านซิลิโคนเมมเบรนและผิวหนังหนูชนิดไม่มีขน ซึ่งพบว่าตำรับไมโครอิมัลชันสามารถเพิ่ม ค่าสัมประสิทธิ์การซึมผ่าน (K_p) และอัตราการซึมผ่าน (J_{ss}) ของเทโมโซโลไมด์เฮกซิลเอสเทอร์ได้ถึง 7 เท่า เมื่อเทียบกับตำรับควบคุมที่ใช้ไขมัน (OA, IPM) เป็นตัวทำละลายยา

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีเภสัชกรรม.....

ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา..... 2548.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

##4676974533: MAJOR PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY

KEYWORD: TEMOZOLOMIDE/ CYTOTOXICITY/MICROEMULSION

PANASSAYA SUPPASANSATORN: ANTICANCER ACTIVITY AND MICROEMULSION FORMULATION FOR TRANSDERMAL DELIVERY OF TEMOZOLOMIDE HEXYL ESTER. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. UBONTHIP NIMMANNIT, Ph.D. 129 pp. ISBN 974-14-2267-9

Temozolomide (TMZ) has been shown to possess excellent activity against malignant melanoma (skin cancer) in phase II and III clinical trials equal to alternative skin cancer drug, dacarbazine *via* oral administration. However, for the treatment of skin disorders, delivery of this agent directly to the skin would be advantageous. The previous studies suggest that temozolomide hexyl ester (TMZ-HE) derivative demonstrated the promising permeability by means of permeability coefficient (K_p) and flux values (J_{ss}). This derivative was also completely hydrolysed by esterase enzymes within the skin, and generated biological active TMZA during the permeation test on viable rat and human skin. In this study, the cytotoxicity test of TMZ-HE was thus carried out comparing with TMZA and TMZ. TMZ-HE demonstrated an equal cytotoxicity against the cancer cell lines (IC_{50}) as TMZ and TMZA and significantly inhibited tumour growth in hairless mice inoculated with human melanoma comparing to untreated group as a control ($P < 0.05$). Finally, topical formulation development of TMZ-HE was also studied. Microemulsion (ME) systems containing Vitamin E-TPGS (VE-TPGS) as a surfactant, oleic acid (OA) or isopropyl myristate (IPM) as an oil phase and isopropyl alcohol (IPA) as co-surfactant where appropriate were prepared. The permeation studies were performed on silicone membrane and hairless mouse skin. K_p and J_{ss} values of TMZ-HE from ME preparations were significantly higher than neat OA and IPM as control formulation (up to 7-fold).

Field of study..Pharmaceutical Technology...

Student's signature

Panassaya Suppasatorn

Academic year.....2005.....

Advisor's signature

Ubonthip Nimmannit

ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to thank my advisor, Associate Professor Dr. Ubonthip Nimmannit, for her encouragement and patience. I am also extremely grateful for her whole-hearted suggestions throughout my project.

This is my great pleasure to thank my associated supervisors, Dr Yongfeng Wang and Dr. Barbara Conway, for their great support and advice throughout my project.

I have my sincere thanks to Mel Gamble and Brian Burford for their kindly supply of rat skin throughout my transdermal experiment.

I am grateful to Guocheng Wang and Weidong Wang for their work on *in vitro* and *in vivo* bioactivity test.

I would like to thank thesis committee Associate Professor Papavadee Klongpityapong, Associate Professor Parkpoom Tengamnuay, Ph.D., Assistant Professor Warangkana Warisnoicharoen, Ph.D., Pornchai Rojsitthisak Ph.D., and Pongsakornpat Arunothayanun, Ph.D. for their suggestions to amend this thesis.

I intend to thank my parents and family for being concerned during my studies, particularly my mother for her love and making me confident and strong when I encountered any problems.

Lastly, I would like to thank The Government Pharmaceutical Organization (GPO) for financial support throughout my study course.

CONTENTS

		Page
ABSTRACT (THAI)		iv
ABSTRACT (ENGLISH)		v
ACKNOWLEDGEMENTS		vi
CONTENTS		vii
LIST OF TABLES		ix
LIST OF FIGURES		xi
LIST OF ABBREVIATIONS		xiv
CHAPTER		
I	INTRODUCTION	1
II	LITERATURE REVIEW	4
	1. TEMOZOLOMIDE AS A NEW ANTI-CANCER AGENT	4
	2. TRANSDERMAL DELIVERY OF DRUG	13
	3. SKIN DELIVERY POTENCY OF TMZ-HE	33
	4. INTRODUCTION TO MICROEMULSION	35
III	MATERIALS AND METHODS	53
	MATERIALS	53
	METHOD	56
IV	RESULTS AND DISCUSSION	74
	1 SYNTHESIS OF TMZ-HE	74
	2. <i>IN VITRO</i> AND <i>IN VIVO</i> BIOACTIVITY TEST	75

	Page
3. DELIVERY OF TMZ-HE FROM VE TPGS	
MICROEMULSION SYSTEMS	79
V CONCLUSION.....	100
REFERENCES	102
APPENDICES	116
APPENDIX I	117
APPENDIX II	121
VITA	129



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Tables	Page
Table 1. The main functions of the skin	15
Table 2. Composition of human stratum corneum	23
Table 3. The permeability data of TMZ esters	35
Table 4. Pharmaceutical advantages of microemulsions.....	38
Table 5. Overview of cutaneous drug delivery with microemulsions <i>in vitro</i>	51
Table 6. Overview of cutaneous drug delivery with microemulsion <i>in vivo</i>	52
Table 7. <i>In vitro</i> cytotoxicity of TMZ-A and TMZ-HE and TMZ in comparison with dacarbazine and carmustine against cancer cells	75
Table 8. <i>In vivo</i> inhibition activity of TMZ-HE against MV3 melanoma in mice (20 mg/mouse/day)	78
Table 9. Composition of the microemulsions (w/w,%)	87
Table 10. The solubility of TMZ-HE in OA and IPM	88
Table 11. <i>In vitro</i> TMZ-HE flux data through silicone membrane from ME 1, ME 2 and ME 3	89
Table 12. <i>In vitro</i> TMZ-HE flux data through silicone membrane from ME 4 and ME 5.....	90
Table 13. <i>In vitro</i> TMZ-HE flux data through silicone membrane from ME 3 and ME 4.....	92
Table 14. <i>In vitro</i> permeability data of TMZ-HE through hairless mice skin	95

Tables	Page
Table 15 The amount of drugs retained in SC and permeated through skin over 24 h	99
Table 16. Cumulative amount of TMZ-HE permeated from ME 1 through silicone membrane	122
Table 17. Cumulative amount of TMZ-HE permeated from ME 2 through silicone membrane	123
Table 18. Cumulative amount of TMZ-HE permeated from ME 3 through silicone membrane	124
Table 19. Cumulative amount of TMZ-HE permeated from ME 4 through silicone membrane	125
Table 20. Cumulative amount of TMZ-HE permeated from ME 5 through silicone membrane	126
Table 21. Cumulative amount of TMZ-HE permeated from ME 3 through hairless mice skin	127
Table 22. Cumulative amount of TMZ-HE permeated from neat OA through hairless mice skin	127
Table 23. Cumulative amount of TMZ-HE permeated from ME 5 through hairless mice skin	128
Table 24. Cumulative amount of TMZ-HE permeated from neat IPM through hairless mice skin	128

LIST OF FIGURES

Figures	Page
Figure 1. Scheme of decomposition mechanism of TMZ in aqueous solution	10
Figure 2. Scheme of the original synthetic route of TMZ	11
Figure 3. Scheme of the synthesis of TMZA from TMZ free drug	12
Figure 4. Synthetic scheme of TMZ-HE derivative	13
Figure 5. Three-dimensional view of the skin structure	16
Figure 6. Cells of the epidermis	18
Figure 7. The sublayers of epidermis	19
Figure 8. A multilayer skin model showing the sequence of transdermal permeation of drugs for systemic delivery	24
Figure 9. The possible pathways of molecules transport through the skin across the intact stratum corneum (2) or via the hair follicles (3) and sweat gland (1)	26
Figure 10. The possible routes for drug transport through the stratum corneum (transcellular or intercellular)	29
Figure 11. The percutaneous absorption process of drug from solution and some factors which influence the process	31
Figure 12. Typical profile for percutaneous drug absorption	32
Figure 13. Basic dynamic microemulsion structure	40
Figure 14. A hypothetical pseudo-ternary phase diagram of an oil/surfactant/water system with emphasis on microemulsion and emulsion phase	42

Figures	Page
Figure 15. Schematic illustration of association structure formed in surfactant and packing of surfactant molecules in different association structure	45
Figure 16. Changes in tumor volumes of the TMZ-HE treatment group vs the control group	61
Figure 17. A Typical chromatogram of TMZ-HE (2.82) and anthracene as internal standard (4.90).....	66
Figure 18. A typical chromatogram of TMZA (5.15) and mitozolomide as internal standard (16.12).....	67
Figure 19. A typical calibration curve for HPLC detection of TMZ-HE product	68
Figure 20. A typical calibration curve for HPLC detection of TMZA	69
Figure 21. Schematic illustration of a diffusion cell	72
Figure 22. Pseudo-ternary phase diagram of (A) ME system <i>a</i> consisting of vitamin E-TPGS, water and oleic acid; (B) ME system <i>b</i> consisting vitamin E-TPGS, water and isopropyl myristate; and (C) ME system <i>c</i> consisting vitamin E-TPGS and isopropyl alcohol	83
Figure 23. Chemical structures of OA, IPM and VE TPGS	84
Figure 24. FFEM image of ME 3	85
Figure 25. FFEM image of ME 5	86
Figure 26. The permeation profiles of TMZ-HE from ME1, ME 2, ME 3, and control aqueous solution	89

Figures	Page
Figure 27. The permeation profiles of TMZ-HE from ME 4, ME 5 and control solution	91
Figure 28. The permeation profiles of TMZ-HE from ME 3, ME 4, and control solution	93
Figure 29. The overall permeation profiles of TMZ-HE from ME 1 to ME 5 and control solution	94
Figure 30. The permeation profiles of total drugs permeated from ME 3, ME 5 neat OA and IPM through hairless mice skin	97
Figure 31. <i>In vitro</i> retained amount of drugs in SC from ME 3, ME 5 and control oil (IPM, OA)	98

LIST OF ABBREVIATIONS

AcOH	acetic acid
AIC	5-aminoimidazole-4-carboxamide
AOT	sodium bis-2-ethylhexylsulphosuccinate
ATase	DNA-alkyltransferase
CTAB	hexadecyltrimethyl ammonium bromide
cpp	critical packing parameter
CDCl ₃	chloroform
DDAB	didodecylammonium bromide
DMAP	4-dimethylaminopyridine
DMF	dimethylformamide
DMSO	dimethylsulfoxide
FFEM	freeze-fracture electron microscopy
g	gram
h	hour
HPLC	high-performance liquid chromatography
H ₂ SO ₄ (conc)	concentrated sulfuric acid
IPA	isopropyl alcohol
IPM	isopropyl myristate
IR	infrared
IS	internal standard
J_{ss}	steady state flux
K_p	permeability coefficient
ME	microemulsions
MeCN	acetonitrile

MeOH	methanol
mg	milligram
min	minute
mL	milliliter
mm	millimeter
μg	microgram
μl	microliter
MTIC	5(3-methyl-1-triazeno) imidazole-4-carboxamide
NaNO_2	sodium nitrile
nmol	nanomole
NMR	nuclear magnetic resonance
OA	oleic acid
PADPRP	poly(ADP-ribose)
PG	propylene glycol
SANS	small angle neutron scattering
SAXS	small-angle X-ray scattering
SC	stratum corneum
TEM	transmission electron microscopy
TMZ	temozolomide
TMZA	temozolomide acid
TMZ-HE	temozolomide hexyl ester
UV	ultra violet
VE TPGS	vitamin E TPGS (d-alpha-tocopheryl polyethylene glycol-1000 succinate)