

## การเปรียบเทียบฤทธิ์ความเป็นพิษของ Paclitaxel และ Irinotecan กับยาเคมีบำบัดอ้างอิงต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี

นิษณา นามวัฒนา<sup>1,5</sup>, บรรจบ ศรีภาน<sup>2,5</sup>, วัชรินทร์ โลยลомн<sup>1,5</sup>, วัชรพงศ์ พุทธิสวัสดิ์<sup>3,5</sup>, วิจิตรา หัศนียกุล<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup>ภาควิชาชีวเคมี, <sup>2</sup>พยาธิวิทยา, <sup>3</sup>ศัลยศาสตร์, <sup>4</sup>เภสัชวิทยา, <sup>5</sup>ศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี คณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

## Comparison of *in Vitro* Cytotoxicity of Generic Paclitaxel and Irinotecan Formulations with their Reference Formulations on Seven Human Intrahepatic Cholangiocarcinoma Cell Lines

Nisana Namwat<sup>1,5</sup>, Banchoob Sripa<sup>2,5</sup>, Watcharin Loilome<sup>1,5</sup>, Vajarabhongsa Bhudisawadi<sup>3,5</sup>, Wichittra Tassaneeyakul<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, <sup>2</sup>Pathology, <sup>3</sup>Surgery, <sup>4</sup>Pharmacology, <sup>5</sup>The Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002

**หลักการและเหตุผล:** ในปัจจุบันการรักษาโดยยาเคมีบำบัดได้นำมาทดลองใช้ในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ถึงแม้ว่ามีรายงานก่อนหน้านี้ว่า paclitaxel และ irinotecan มีฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี แต่หากนำมาใช้รักษาผู้ป่วยจะพบว่าค่าใช้จ่ายของตัวรับยาอ้างอิงทั้งสองชนิดมีราคาแพงมาก ในปัจจุบันตัวรับยาสามัญทั้งสองชนิดดังกล่าวมีขายในประเทศไทยด้วยราคาที่ถูกกว่าตัวรับยาอ้างอิงอย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการศึกษาการออกฤทธิ์ของยาสามัญทั้งสองชนิดที่ผลิตขึ้นใหม่

**วัตถุประสงค์:** เพื่อทดสอบและเปรียบเทียบฤทธิ์ความเป็นพิษของ paclitaxel และ Irinotecan ในรูปตัวรับยาสามัญกับตัวรับยาอ้างอิงแบบต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 7 ชนิด

**รูปแบบการศึกษา:** ศึกษาในหลอดทดลอง

**สถานศึกษา:** ห้องเพาะเลี้ยงเซลล์ B7 คณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น

**วิธีการศึกษา:** ตรวจวัดค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 7 ชนิด ของยาเคมีบำบัดด้วยวิธี sulforhodamine B (SRB) assay โดยรายงานเป็นค่าความเข้มข้นของยา ( $\mu M$ ) ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ 50% ( $IC_{50}$ ) เทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ยา เปรียบเทียบฤทธิ์ความเป็นพิษของ paclitaxel และ irinotecan ที่เป็นตัวรับ

**Background:** Several chemotherapies have now been introduced for the treatment of cholangiocarcinoma (CCA). Although it has previously been reported that two new chemotherapeutic agents, paclitaxel and irinotecan, showed strong cytotoxic effect to human CCA cell lines the treatment cost currently using reference formulations of these two drugs are very expensive. To date, the generic drugs for both paclitaxel and irinotecan are now commercially available in Thailand with relatively low price compared to reference formulations. However, the study demonstrating the efficacy of the innovator and generic formulation of these two agents has never been reported.

**Objective:** To determine and compare the cytotoxic activity of generic paclitaxel and irinotecan formulations with the reference formulations on seven human intrahepatic CCA cell lines.

**Design:** *In vitro* study

**Setting:** Faculty of Medicine, Khon Kaen University

**Material and Method:** Cytotoxic activity of chemotherapeutic agent on CCA cell lines was determined by sulforhodamine B (SRB) assay. The  $IC_{50}$  value expressed as the concentration of drug that caused a 50% growth inhibition comparing with no drug treated control. The

ยาทดสอบกับตัวรับอ้างอิงต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีด้วยวิธีการทางสถิติ Student's unpaired *t*-test

**ผลการศึกษา:** Paclitaxel มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีทั้ง 7 ชนิดที่สูงมากโดยมีค่า  $IC_{50}$  อยู่ระหว่าง 0.001-1.40  $\mu\text{M}$  ขณะที่ irinotecan มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีต่ำกว่า และมีช่วงของค่า  $IC_{50}$  อยู่ระหว่าง 0.02 to 69  $\mu\text{M}$  เซลล์เพาะเลี้ยง KKU-M055 ตอบสนองต่อยา paclitaxel ได้ดีที่สุด เซลล์เพาะเลี้ยง KKU-OCA17 ตอบสนองต่อยา irinotecan ได้ดีกว่าเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดอื่นๆ ขณะที่ KKU-M156 ตอบสนองต่อยาทั้งสองชนิดได้ต่ำที่สุด เมื่อเปรียบเทียบค่า  $IC_{50}$  ของ paclitaxel ที่เป็นตัวรับยาสามัญที่ทำการทดสอบ (Intaxel<sup>®</sup>; Dabur, India) กับตัวรับยาอ้างอิง (Taxol<sup>®</sup>; Bristol-Myers Squibb, USA) พบว่าตัวรับยาทั้งสองมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) ในทำนองเดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบความเป็นพิษต่อเซลล์ของ irinotecan ที่เป็นตัวรับยาทดสอบ (Irinotel<sup>®</sup>; Dabur, India) กับตัวรับยาอ้างอิง (Campto<sup>®</sup>; Aventis Pharma, UK) พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นกัน

**สรุปผล:** Paclitaxel มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีทั้ง 6 ชนิดที่สูงกว่า irinotecan ยกเว้น KKU-OCA17 ทั้งแบบที่เป็นตัวรับยาสามัญและยาอ้างอิง ยาทั้งสองชนิดมีฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์ได้แตกต่างกันในเซลล์เพาะเลี้ยงที่มี histological type ต่างกัน และตัวรับทดสอบของยาทั้งสองชนิดไม่มีความแตกต่างในฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับตัวรับอ้างอิง ดังนั้นจึงสรุปได้ว่ายา paclitaxel และ irinotecan ทั้งสองตัวรับน่าจะใช้เป็นตัวเลือกในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีได้

cytotoxic activity of the generic formulation was compared to the reference formulation using Student's unpaired *t*-test.

**Results:** Paclitaxel exhibited strong potency towards most CCA cell lines with  $IC_{50}$  values ranging from 0.001-1.40  $\mu\text{M}$  whereas irinotecan showed  $IC_{50}$  values ranging varied from 0.02 to 69  $\mu\text{M}$ . KKU-M055 was the most sensitive cell line to paclitaxel and KKU-OCA17 showed the highest sensitivity to irinotecan whereas KKU-M156 was the least sensitive cell line to both drugs.  $IC_{50}$  values of the generic product (Intaxel<sup>®</sup>, Dabur, India) and reference product (Taxol<sup>®</sup>, Bristol-Myers Squibb, USA) formulations were not significantly different ( $P > 0.05$ ). Similary, the cytotoxicity of the generic formulation of irinotecan (Irinotel<sup>®</sup>, Dabur, India) was not statistically significant different from the reference formulation (Campto<sup>®</sup>, Aventis Pharma, UK).

**Conclusion:** The cytotoxic activity of paclitaxel towards six CCA cell lines was more potent than irinotecan except for KKU-OCA17. No different in the  $IC_{50}$  values of the generic and reference formulations of paclitaxel and irinotecan against seven CCA lines suggest that the *in vitro* efficacy of generic and reference formulations of these two drugs are very similar.

**Keywords:** Cytotoxic activity, paclitaxel, irinotecan, cholangiocarcinoma, generic formulation

## Introduction

Cholangiocarcinoma (CCA) is a bile duct tumor that is increasing worldwide in incidence and mortality<sup>1,2</sup>. Evidence from clinical studies have demonstrated that response of this cancer to conventional chemotherapy is relatively poor<sup>3,4</sup>. Nevertheless 5-FU is a standard chemotherapy for CCA patients, only partial response to this drug is reported<sup>5</sup>. Our recent *in vitro* study has shown that cytotoxicities of paclitaxel and irinotecan towards five human intrahepatic CCA cell lines isolated from Thai patients are very potent<sup>6</sup>. In addition, clinical study suggest that combined regimen of paclitaxel and irinotecan can prolong stabilization of disease for more than 6 months

in advanced cancer patients<sup>7</sup>. This evidence suggests that paclitaxel and irinotecan may be useful for treatment of CCA patients. Both reference and generic formations of paclitaxel and irinotecan are now commercially available in Thailand. Although reference and generic formulations are pharmaceutically equivalent, there is no data available for either *in vitro* or *in vivo* to ensure that the efficacy of these formulations is similar. These data are necessary for physicians and pharmacists when prescribing or selecting the chemotherapy for their patients especially when cost-effectiveness is a great concern.

## Objective

To compare the cytotoxic activity of the generic paclitaxel and irinotecan formulations to those of reference formulations on 7 different histological types of CCA cell lines.

## Materials and Methods

### Chemicals

Generic formulations of paclitaxel (Intaxel<sup>®</sup>, batch no. 5AH03, mfg date 01/2005, exp. date 12/2006) and irinotecan (Irinotel<sup>®</sup>, batch no. 5JL02, mfg date 04/2005, exp. date 03/2007) were from Dabur, Pharma Ltd., India. The reference formulation of paclitaxel (Taxol<sup>®</sup>) was from Bristol-Myers Squibb Company, USA (batch no. 5E07393, mfg date 18-05-05, exp date: 31-05-07) and the reference formulation of irinotecan (Campto<sup>®</sup>) was from Aventis Pharma, UK (Batch no. D4C271, mfg date 10/09/2004, exp date: 10/09/2007).

Ham's F12, penicillin, streptomycin and trypsin-EDTA were purchased from Invitrogen Co., California, USA, fetal bovine serum from Seromed, Germany, and sulforhodamine B (SRB) from Sigma Chemical Co., USA. Tissue culture plates were obtained from Nunc, Denmark. All other chemicals were analytical grade.

### Human CCA cell lines

Seven human intrahepatic CCA cell lines, namely, KKU-100 (poorly differentiated adenocarcinoma), KKU-M055 and KKU-M156 (moderately differentiated adenocarcinoma), KKU-M139 (squamous carcinoma), KKU-M213 (adenosquamous), KKU-M214 (moderately to poorly differentiated adenocarcinoma) and KKU-OCA17 (well differentiated adenocarcinoma) were used in this study. All cell lines were established in our Institute from CCA patients residing in northeastern Thailand. Cells were cultured in Ham's F12 supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 100 U/ml of penicillin and 100 mg/ml of streptomycin at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>. The presence of mycoplasma contamination was periodically examined. These cell lines have been maintained in the laboratory for more than 6 years.

### Cytotoxicity activity assay

Sulforhodamine B (SRB) assay was used to determine growth inhibition as described previously<sup>8</sup> with some minor modifications. In brief, CCA cell lines (4 x 10<sup>4</sup>

cells/ml) at exponential growth phase were trypsinized with 0.25% (v/v) trypsin and seeded in triplicate in 96-well flat-bottom microtiter plates and incubated for 24 h at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Then 100 µl aliquot of medium containing drug (from 0.0003 µg/ml to 300 µg/ml) or no drug as control was added to the 96-well plates and incubated at 37 °C for 72 h. The culture medium was subsequently removed and 200 µl aliquot of 10% (w/v) ice-cold TCA was added to each culture well. The plates were then incubated at 4 °C for 60 min. TCA-treated cells were stained for 30 min with 0.4% (w/v) SRB in 1% (v/v) acetic acid for 30 min, and subsequently washed five times with 1% (v/v) acetic acid to remove unbound stain. The plates were left to dry and the protein-bound stain was solubilized with 200 µl of 10 mM Tris base (pH 10.5) for 60 min. Absorbance was measured at 540 nm using a microplate reader (Tecan Austria GmbH, Austria). The concentration of drug required to inhibit cell proliferation by 50% (IC<sub>50</sub>) was determined by plotting the percentage of cell growth inhibition versus the drug concentration<sup>9</sup>.

### Statistical analysis

Tests were performed in 3 independent experiments. Data are expressed as mean % growth inhibition +SD. IC<sub>50</sub> value represented the concentration of drugs that inhibited 50% cell growth. Comparison of IC<sub>50</sub> values of generic formulation with reference formulation was analyzed using Student's unpaired *t*-test.

## Results

The cytotoxicity activities of the generic formulations of paclitaxel and irinotecan and their respective reference formulations, Taxol<sup>®</sup> and Campto<sup>®</sup> against the 7 CCA cell lines were shown in Table 1. There was not statistically significant difference in the IC<sub>50</sub> values observed for generic and reference formulations of both paclitaxel and irinotecan. Moreover, results obtained from 7 CCA cell lines with different histological type clearly showed that all cell lines were sensitive to paclitaxel with IC<sub>50</sub> values ranging from 0.001-1.40 µM. Among these cell lines, KKU-M055 and KKU-M214 showed very high sensitivity to paclitaxel with IC<sub>50</sub> value less than 0.01 µM whereas KKU-M156 was the least sensitive (IC<sub>50</sub> values of 0.6 and 1.4 µM). In the case of irinotecan, the IC<sub>50</sub> values observed for the 7 CCA cell lines were in the range

**Table 1** Cytotoxic activities of Test formulations and Reference formulations on CCA cell lines. Data represents as mean  $IC_{50} \pm SD$  of at least three experiments.

CCA Cell line	Histological type	Mean $IC_{50}$ ( $\mu M$ ) of paclitaxel		Mean $IC_{50}$ ( $\mu M$ ) of irinotecan	
		Intaxel <sup>®</sup>	Taxol <sup>®</sup>	Irinotel <sup>®</sup>	Campto <sup>®</sup>
KKU-M055	Moderately differentiated	0.001 $\pm$ 0.000	0.003 $\pm$ 0.002	1.7 $\pm$ 0.6	1.6 $\pm$ 0.4
KKU-M214	Moderately differentiated	0.003 $\pm$ 0.000	0.006 $\pm$ 0.003	32 $\pm$ 28	36 $\pm$ 0
KKU-M139	Squamous	0.037 $\pm$ 0.009	0.025 $\pm$ 0.003	14 $\pm$ 2	14 $\pm$ 2
KKU-100	Poorly differentiated	0.074 $\pm$ 0.07	0.10 $\pm$ 0.07	4.8 $\pm$ 3.1	4.9 $\pm$ 4.1
KKU-M213	Adenosquamous	0.12 $\pm$ 0.05	0.234 $\pm$ 0.225	2.8 $\pm$ 0.4	3.2 $\pm$ 2.8
KKU-OCA17	Well differentiated	0.57 $\pm$ 0.14	0.64 $\pm$ 0.15	0.02 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.00
KKU-M156	Moderately differentiated	0.64 $\pm$ 0.44	1.4 $\pm$ 0.6	69 $\pm$ 18	69 $\pm$ 9

Data represents mean  $\pm$  SD of at least three experiments.

of 0.02-69  $\mu M$ . KKU-OCA17 was the most sensitive cell line ( $IC_{50}$  values of 0.02 and 0.018  $\mu M$ ) to irinotecan whereas KKU-M156 was the least sensitive cell line ( $IC_{50}$  values of 69  $\mu M$ ).

## Discussion

The *in vitro* cytotoxic effect of two new chemotherapeutic drugs including paclitaxel and irinotecan towards the seven human intrahepatic CCA cell lines was demonstrated in the present study. Potent cytotoxic activities of paclitaxel and irinotecan observed in those CCA cell lines suggest that these drugs are useful for treatment of cholangiocarcinoma. Our results clearly demonstrated that the CCA cell lines responded well to paclitaxel, an alkaloid derivative, which acts as a mitotic spindle poison and functions to inhibit cell division at G2/M phase of cell cycle. Lower sensitivity towards irinotecan (a DNA topoisomerase I inhibitor) was observed in these CCA cell lines except for KKU-OCA17. It was also noted that KKU-M156 was the least sensitive cell line towards both chemotherapeutic drugs. It has been previously reported that different degrees of sensitivity towards chemotherapeutic agents among various types of CCA cell line were not associated with the histological type of CCA<sup>6</sup>. The results from the present study also clearly revealed that generic formulations and reference formulations of paclitaxel and irinotecan exhibited similar *in vitro* efficacy on all seven human intrahepatic CCA cell lines.

In conclusions, these *in vitro* evidences clearly indicate that CCA cell lines are sensitive to both paclitaxel

and irinotecan. In addition, the generic formulations (Intaxel<sup>®</sup> and Irinotel<sup>®</sup>) have an efficacy on CCA cell lines as similar to their respective reference formulations, Taxol<sup>®</sup> and Campto<sup>®</sup>.

## References

1. Vatanasapt V, Sriamporn S, Vatanasapt P. Cancer control in Thailand. Jpn J Clin Oncol 2002;32 (Suppl):S82-91.
2. Shaib Y, El-Serag HB. The epidemiology of cholangiocarcinoma. Semin Liver Dis 2004;24:115-25.
3. Todoroki T. Chemotherapy for bile duct carcinoma in the light of adjuvant chemotherapy to surgery. Hepatogastroenterology 2000;47:644-9.
4. Thongprasert S. The role of chemotherapy in cholangiocarcinoma. Ann Oncol 2005;16 (Suppl) 2:ii93-6.
5. Falkson G, MacIntyre JM, Moertel CG. Eastern Cooperative Oncology Group experience with chemotherapy for inoperable gallbladder and bile duct cancer. Cancer 1984;54:965-9.
6. Tepsiri N, Chaturat L, Sripa B, Namwat W, Wongkham S, Bhudhisawasdi V, et al. Drug sensitivity and drug resistance profiles of human intrahepatic cholangiocarcinoma cell lines. World J Gastroenterol 2005;11:2748-53.
7. Murren JR, Peccerillo K, DiStasio SA, Li X, Leffert JJ, Pizzorno G, et al. Dose escalation and pharmacokinetic study of irinotecan in combination with paclitaxel in patients with advanced cancer. Cancer Chemother Pharmacol 2000;46:43-50.

8. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 1990;82: 1107-12.
9. Mizutani Y, Nakanishi H, Yoshida O, Fukushima M, Bonavida B, Miki T. Potentiation of the sensitivity of renal cell carcinoma cells to TRAIL-mediated apoptosis by subtoxic concentrations of 5-fluorouracil. *Eur J Cancer* 2002;38: 167-76.

