Thesis Title Development of a Nanovesicular Formulation Entrapped with Plasmid DNA for an Efficient Gene Delivery System

Author Ms. Korakot Thathang

Degree Doctor of Philosophy (Pharmacy)

Thesis Advisory Committee
Assoc. Prof. Dr. Aranya Manosroi Chairperson
Prof. Dr. Jiradej Manosroi Member
Prof. Dr. Rolf G. Werner Member
Prof. Dr. Rolf Schubert Member

ABSTRACT

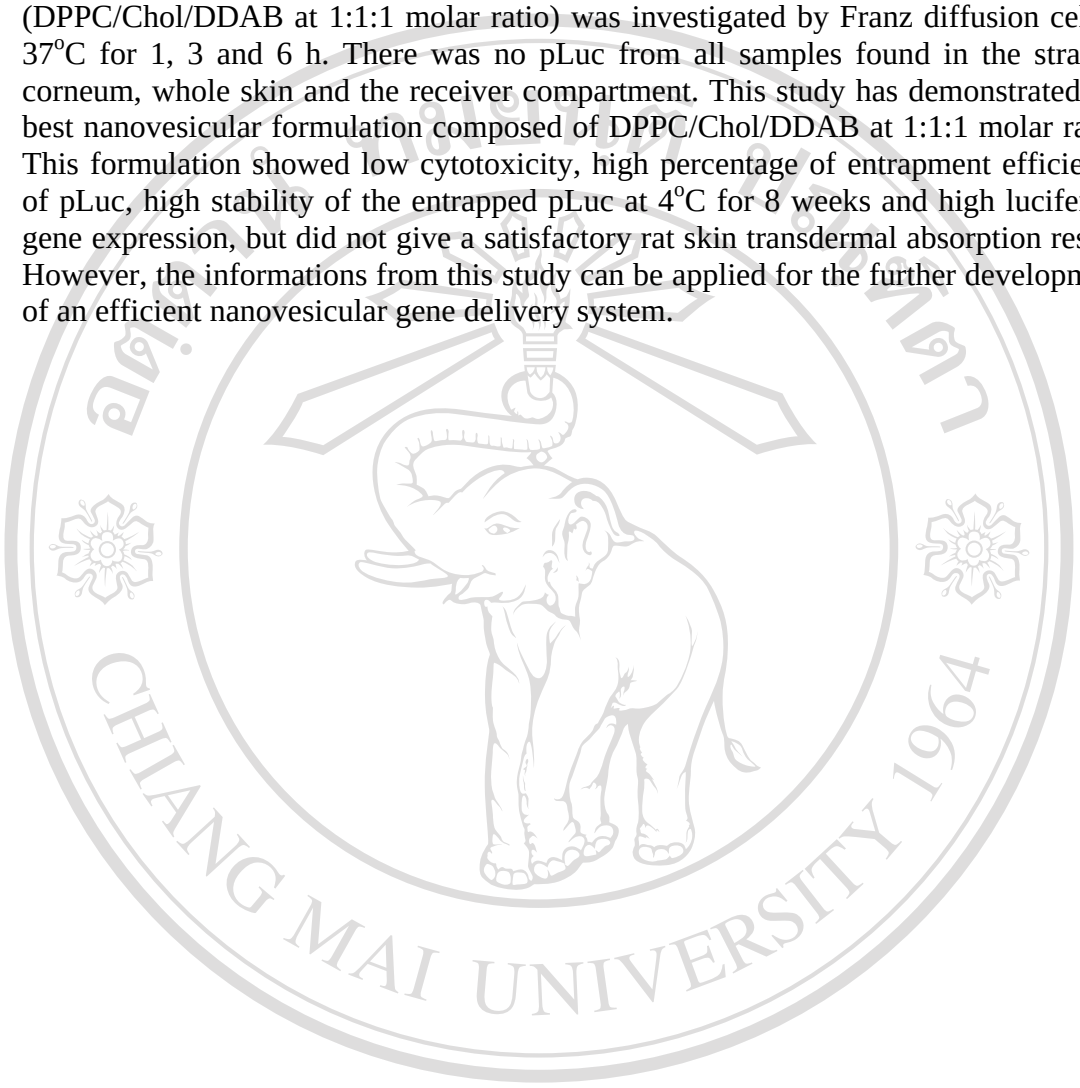
The objective of this study was to develop an optimum nanovesicular formulation entrapped with plasmid DNA for an efficient gene delivery system using luciferase plasmid (pLuc) as a model DNA. Neutral, cationic and anionic liposomes composed of DPPC (dipalmitoyl phosphaditylcholine), Chol (cholesterol) and/or DDAB (dimethyl dioctadecyl ammonium bromide) or SA (stearylamine) or DC-Chol (dimethylaminoethyl carbamoyl- cholesterol) or DP (dicetylphosphate), and niosomes composed of polyoxyethylene sorbitan monostearate (Tween61) or sorbitan monostearate (Span60), Chol and/or DDAB or SA or DC-Chol or DP were prepared by freeze dried empty liposomes (FDEL) method. The morphology and particle sizes of the nanovesicles characterized by transmission electron microscopy (TEM) and cryo-TEM were small unilamellar structures with the nanosize ranging of 50-130 nm. Cytotoxicity of the nanovesicular formulations and their compositions (lipids or surfactants) were investigated on mouse melanoma cell lines ($B_{16}F_{10}$) by the MTT assay. In all formulations, cell viability decreased as the concentrations increased. The IC_{50} values of SA, DP, Chol, Span60 and Tween61 were 0.200, 0.011, 0.036, 0.122 and 0.094 mM which were 5.71, 0.31, 1.03, 3.49 and 2.69 times less cytotoxic than doxorubicin, respectively, whereas IC_{50} values of DPPC, DDAB and DC-Chol can not be observed. When formed in nanovesicles, SA, DP, Chol, Span60 and Tween61 showed decrease cytotoxicity with the IC_{50} values ranging from 0 to 2.48 mM. The highest cytotoxicity reduction of 200 times was found in DP vesicles, while

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

cytotoxicity of DC-Chol vesicles was slightly increased. The cytoxicity of lipids and surfactants can be reduced by forming nanovesicles. Cationic liposomes and cationic Tween61 niosomes composed of SA or DC-Chol showed similar cytotoxicity with the IC_{50} values of about 2.50 mM which was about 70 times less cytotoxic than DOX, whereas cationic DDAB liposomes and niosomes showed no IC_{50} values at the studied concentration ranges. Neutral liposomes or niosomes and cationic DDAB liposomes or niosomes were less cytotoxic than other nanovesicular formulations which were selected to entrap pLuc. The entrapment of pLuc in the nanovesicular formulations was performed by reconstitution of the lyophilized dried vesicles with the plasmid solution. Cationic nanovesicles including cationic DPPC liposomes (DPPC/Chol/DDAB at 7:2:1 molar ratio), cationic Tween61 niosomes (Tween61/Chol/DDAB at 1:1:0.05 molar ratio) and cationic Span60 niosomes (Span60/Chol/DDAB at 1:1:0.05 molar ratio) gave the entrapment efficiency of 100% which were higher than the neutral vesicles (29.31, 3.65 and 29.75% for neutral DPPC liposome, neutral Tween61 and Span60 niosomes, respectively). The maximum loading of pLuc was 15.29, 22.70 and 18.92 µg/mg of the total lipids or surfactants of liposomes and Tween61 or Span60 niosomes, respectively. The morphology and particle sizes of the vesicles were in multilamellar structure and nanosize ranges (160-850 nm). Characteristics and physical stability of luciferase plasmid (pLuc) entrapped in cationic nanovesicles were investigated. Agarrose gel electrophoresis and gel documentation were validated and used to determine the entrapment efficiency of pLuc in cationic nanovesicles. At 8 weeks, the pLuc entrapped in cationic liposomes exhibited higher stability than pLuc in an aqueous solution and that entrapped in cationic Tween61 or Span60 niosomes, when stored at 4, 30 and 50^{o}C for 8 weeks. At 4^{o}C, the pLuc remaining in cationic liposomes was 2 and 3 times higher than in cationic Span60 and Tween61 niosomes, respectively. After 3 weeks, 50 and 2% of pLuc were remained in cationic liposomes at 30 and 50^{o}C respectively, whereas all pLuc in cationic Span 60 and Tween61 niosomes were degraded within 2 and 1 week, respectively. At 30 and 50^{o}C, pLuc in an aqueous solution or in nanovesicular formulations were not in a stable supercoil form. The stability of pLuc was enhanced by entrapping in cationic liposomes more than in niosomes. Also, higher temperature with an increase storage time can affect the stability of pLuc even entrapped in nanovesicles. Luciferase gene expression of pLuc-loaded in cationic liposomes (lipoplexes) in HeLa cell lines was evaluated from luciferase activity determined by a luminometer at 24 and 48 h incubation. Percentages of cell proliferation of the lipoplexes on HeLa cell line at 24 and 48 h incubation were evaluated by the WST-1 assay. When the amount of DPPC or cholesterol was increased, the higher amount of DDAB was needed to protect pLuc from the enzymatic degradation. The highest luciferase activity (1.5×10^{6} RLU) was observed in the Chol/DDAB (at 2:1 molar ratio)-lipoplex at the DDAB/pLuc weight ratio of 10:1 at 48 h which was about 10, 100, and 1000 times higher than the DDAB, DPPC/Chol/DDAB (at 1:2:1 molar ratio) and DPPC/Chol/DDAB (at 2:2:1 molar ratio)-lipoplexes, respectively. However, DPPC and Chol exceeded 33 and 50% mol, respectively demonstrated no gene expression. All cationic liposomal formulations and lipoplexes except the Chol/DDAB (at 2:1 molar ratio)-lipoplexes gave more than 50% of cell proliferation at 24 h. The Chol/DDAB (2:1 molar ratio)-lipoplex gave the lowest cell proliferation indicating the highest cytotoxicity. Lipoplexes without DPPC

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

were more cytotoxiciy than those with DPPC, whereas those with Chol were more cytotoxic than those without Chol. The transdermal absorption through rat skin of pLuc in an aqueous and that entrapped in the selected cationic liposomes (DPPC/Chol/DDAB at 1:1:1 molar ratio) was investigated by Franz diffusion cell at 37^{o}C for 1, 3 and 6 h. There was no pLuc from all samples found in the stratum corneum, whole skin and the receiver compartment. This study has demonstrated the best nanovesicular formulation composed of DPPC/Chol/DDAB at 1:1:1 molar ratio. This formulation showed low cytotoxicity, high percentage of entrapment efficiency of pLuc, high stability of the entrapped pLuc at 4^{o}C for 8 weeks and high luciferase gene expression, but did not give a satisfactory rat skin transdermal absorption result. However, the informations from this study can be applied for the further development of an efficient nanovesicular gene delivery system.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การพัฒนาตำรับถุงขนาดนาโนที่เก็บกักดีเอ็นเอพลาสมิดเพื่อเป็นระบบที่มีประสิทธิภาพในการนำส่งยีน
ผู้เขียน	นางสาว กรกช ทาตั้ง
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เภสัชศาสตร์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ. ดร. อรัญญา มโนสร้อย	ประธานกรรมการ
	ศ. ดร. จีรเดช มโนสร้อย	กรรมการ
	ศ. ดร. รอล์ฟ จี เวอร์เนอร์	กรรมการ
	ศ. ดร. รอล์ฟ ชูเบิร์ท	กรรมการ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาตำรับถุงขนาดนาโนที่เหมาะสมที่เก็บกักดีเอ็นเอพลาสมิดเพื่อเป็นระบบนำส่งยีนที่มีประสิทธิภาพ โดยใช้พลาสมิดลูซิเฟอเรส (pLuc) เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ได้เตรียมไลโปโซมและนีโอโซมทั้งชนิดไม่มีประจุ ประจุบวกและประจุลบ โดยไลโปโซมประกอบด้วย ดีพีพีซี (DPPC)/ คอเลสเตอรอล (Chol) และ/หรือ ดีดีเอบี (DDAB) หรือ สเตียริลลามีน (SA) หรือ ดีซีคลอเลสเตอรอล (DC-Chol) หรือ ไดซิติลฟอสเฟต (DP) ส่วนนีโอโซมประกอบด้วย ทวีน61 (Tween61) หรือสแปน60 (Span60)/ คลอเลสเตอรอล และ/หรือ DDAB หรือ SA หรือ DC-Chol หรือ DP โดยเตรียมด้วยวิธี Freeze Dried Empty Liposomes (FDEL) ได้ตรวจสอบลักษณะและขนาดอนุภาคของถุงขนาดนาโน โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) พบว่า เป็นอนุภาคขนาดเล็กที่มีผนังสองชั้นชุดเดียวที่มีขนาด 50-130 นาโนเมตร ได้ทดสอบความเป็นพิษของตำรับถุงขนาดนาโนและส่วนประกอบไขมันและสารลดแรงตึงผิวต่อเซลล์มะเร็งเมลาโนมาชนิด $B_{16}F_{10}$ โดยวิธี MTT พบว่าการรอดชีวิตของเซลล์ลดลงเมื่อความเข้มข้นของตำรับเพิ่มขึ้น โดยความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์มีชีวิตรอดลดลงครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) ของ SA, DP, Chol,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Span60 และ Tween61 มีค่า 0.200, 0.011, 0.036, 0.122 และ 0.094 มิลลิโมลาร์ (mM) ซึ่งมีความเป็นพิษน้อยกว่า doxorubicin (DOX) 5.71, 0.31, 1.03, 3.49 และ 2.69 เท่าตามลำดับ แต่ไม่สามารถหาค่า IC_{50} ของ DPPC, DDAB และ DC-Chol เมื่อเตรียม SA, DP, Chol, Span60 และ Tween61 ในรูปของถุงขนาดนาโน ความเป็นพิษต่อเซลล์ลดลงจนไม่สามารถหาค่า IC_{50} จนถึงมีค่าเท่ากับ 2.08 – 2.48 mM โดย ความเป็นพิษของ DP ลดลงสูงสุดถึง 200 เท่า ในขณะที่ความเป็นพิษของ DC-Chol ลดลงเล็กน้อย ไลโปโซมชนิดประจุบวกและ Tween61 นีโอโซม ชนิดประจุบวกที่ประกอบด้วย SA หรือ DC-Chol มีความเป็นพิษใกล้เคียงกัน โดยมีค่า IC_{50} ประมาณ 2.50 mM ซึ่งมีความเป็นพิษน้อยกว่า DOX ประมาณ 70 เท่า ในขณะที่ไลโปโซมและนีโอโซมชนิดประจุบวกที่ประกอบด้วย DDAB ไม่สามารถหาค่า IC_{50} ในช่วงความเข้มข้นศึกษา แสดงให้เห็นว่าการเตรียมอยู่ในรูปของถุงขนาดนาโนจะทำให้ความเป็นพิษของไขมันและสารลดแรงตึงผิวลดลงได้ ดังนั้นจึงได้คัดเลือกไลโปโซมหรือนีโอโซมชนิดไม่มีประจุและไลโปโซมหรือนีโอโซมชนิดประจุบวกที่ประกอบด้วย DDAB ซึ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่าตำรับอื่นๆ มาเก็บกัก pLuc ได้เก็บกัก pLuc ในตำรับถุงขนาดนาโนที่คัดเลือกมาโดยละลายสารละลายพลาสมิดในถุงขนาดนาโนที่ถูกทำให้แห้ง พบว่าประสิทธิภาพการเก็บกัก pLuc ในไลโปโซมชนิดประจุบวก (DPPC/Chol/DDAB ที่อัตราส่วนโมลาร์ 7:2:1), Tween61 นีโอโซมชนิดประจุบวก (Tween61/Chol/DDAB ที่อัตราส่วนโมลาร์ 1:1:0.05) และ Span60 นีโอโซมชนิดประจุบวก (Span60/Chol/DDAB ที่อัตราส่วนโมลาร์ 1:1:0.05) มีค่าร้อยละ 100 ซึ่งมากกว่าประสิทธิภาพการเก็บกัก pLuc ในถุงขนาดนาโนชนิดไม่มีประจุ ซึ่งมีค่าเท่ากับร้อยละ 29.31, 3.65 และ 29.75 ของ DPPC ไลโปโซมชนิดไม่มีประจุ, Tween61 นีโอโซมชนิดไม่มีประจุ และSpan60 นีโอโซมชนิดไม่มีประจุ ตามลำดับ โดยมีปริมาณสูงสุดของ pLuc ที่สามารถเก็บกักใน DPPC ไลโปโซมชนิดประจุบวก, Tween61 นีโอโซมชนิดประจุบวกและ Span60 นีโอโซมชนิดประจุบวกเท่ากับ 15.29, 22.70 และ18.92 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมรวมของไขมันหรือสารลดแรงตึงผิวตามลำดับ จากการตรวจสอบลักษณะของถุงขนาดนาโนพบว่าเป็นอนุภาคขนาดเล็กที่มีผนังสองชั้นหลายชุดที่มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วงระดับนาโน (160-850 นาโนเมตร) ในการศึกษาสมบัติและความคงตัวทางกายภาพของ pLuc ที่เก็บกักในถุงขนาดนาโนชนิดประจุบวกโดยใช้ agarose gel electrophoresis และ gel documentation พบว่า pLuc ที่เก็บกักใน DPPC ไลโปโซมชนิดประจุบวกมีความคงตัวมากกว่า pLuc ที่อยู่ในรูปของสารละลาย และมากกว่า pLuc ที่เก็บกักใน Tween61 นีโอโซมชนิดประจุบวกและ Span60 นีโอโซมชนิดประจุบวกเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ปริมาณ pLuc ที่เหลืออยู่ใน DPPC ไลโปโซมชนิดประจุบวกมีมากกว่า pLuc ใน Span60 นีโอโซมชนิดประจุบวกและ Tween61 นีโอโซมชนิดประจุบวก เป็น 2 และ 3 เท่าตามลำดับ เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

30 และ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ปริมาณของ pLuc ที่เหลืออยู่ใน DPPC ไลโปโซมชนิดประจุบวกมีค่าเท่ากับร้อยละ 50 และ 2 ตามลำดับ ในขณะที่ pLuc ที่เก็บกักใน Span60 นีโอโซมชนิดประจุบวกและ Tween61 นีโอโซมชนิดประจุบวกเสื่อมสภาพภายใน 2 และ 3 สัปดาห์ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า pLuc ทั้งที่อยู่ในรูปของสารละลายและที่เก็บกักในถุงขนาดนาโนชนิดประจุบวกไม่อยู่ในสภาพคงตัวแบบ supercoil เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30 และ 50 องศาเซลเซียส ดังนั้น pLuc ที่เก็บกัก ในไลโปโซมชนิดประจุบวกช่วยเพิ่มความคงตัวของ pLuc ได้มากกว่า pLuc ที่เก็บกักในนีโอโซมชนิดประจุบวก และการเก็บไว้ที่อุณหภูมิสูงเป็นระยะเวลานานจะมีผลต่อความคงตัวของ pLuc ด้วย แม้ว่าจะเก็บกัก pLuc ไว้ในถุงขนาดนาโนก็ตาม ได้ศึกษาการแสดงออก pLuc ที่เก็บกักในไลโปโซมชนิดประจุบวก (ไลโปเพลกซ์) ในเซลล์ไลน์ชนิด HeLa โดยตรวจวัดฤทธิ์ของยีนลูซิเฟอเรสด้วยเครื่อง luminometer และศึกษาเปอร์เซนต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของ HeLa เซลล์ของไลโปเพลกซ์โดยใช้วิธี WST-1 ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าเมื่อปริมาณของ DPPC หรือ Chol ที่อยู่ในไลโปเพลกซ์เพิ่มขึ้น ทำให้ต้องเพิ่มปริมาณของ DDAB เพื่อป้องกันการถูกย่อยสลายของ pLuc ด้วยเอนไซม์ ไลโปเพลกซ์ของตำรับถุงขนาดนาโนที่ประกอบด้วย Chol/DDAB (ในอัตราส่วนโมลาร์ 2:1) ที่มีอัตราส่วนโดยน้ำหนักของ DDAB ต่อ pLuc เท่ากับ 10:1 มีการแสดงออกของยีนลูซิเฟอเรสสูงที่สุด (1.5×10^6 RLU) ที่เวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งมากกว่าไลโปเพลกซ์ของตำรับที่ประกอบด้วย DDAB, DPPC/Chol/DDAB (ในอัตราส่วนโมลาร์ 1:2:1) และ DPPC/Chol/DDAB (ในอัตราส่วนโมลาร์ 2:2:1) ประมาณ 10, 100 และ 1,000 เท่าตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ตำรับที่มี DPPC และ Chol ในอัตราโมลส่วนมากกว่าร้อยละ 33 และ 50 ไม่มีการแสดงออกของยีน ทุกตำรับของไลโปโซมชนิดประจุบวกและไลโปเพลกซ์ของมันให้ผลการเจริญเติบโตของเซลล์มากกว่าร้อยละ 50 ที่เวลา 24 ชั่วโมง ยกเว้นไลโปเพลกซ์ของตำรับที่ประกอบด้วย Chol/DDAB (ในอัตราส่วนโมลาร์ 2:1) ที่มีการเจริญเติบโตของเซลล์ต่ำที่สุดซึ่งแสดงว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุด ไลโปเพลกซ์ของตำรับที่ไม่มี DPPC เป็นส่วนประกอบมีความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่าตำรับที่มี DPPC เป็นส่วนประกอบ ในทางกลับกันไลโปเพลกซ์ของตำรับที่มี Chol เป็นส่วนประกอบมีความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่าตำรับที่ไม่มี Chol เป็นส่วนประกอบ ไลโปเพลกซ์ของตำรับที่ประกอบด้วย DPPC/Chol/DDAB (ในอัตราส่วนโมลาร์ 1:1:1) ซึ่งพลาสมิดที่เก็บกักมีความคงตัว แม้ว่ามีการแสดงออกของยีนน้อยกว่าไลโปเพลกซ์ของตำรับที่ประกอบด้วย Chol/DDAB (ในอัตราส่วนโมลาร์ 2:1) ประมาณ 4 เท่า แต่มีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่าประมาณ 14 เท่า ในการศึกษาการซึมผ่านหนังหนูของ pLuc ที่อยู่ในสารละลายและตำรับ pLuc ที่เก็บกักในไลโปโซมชนิดประจุบวกที่คัดเลือกไว้ (ที่ประกอบด้วย DPPC/Chol/DDAB ในอัตราส่วนโมลาร์ 1:1:1) โดยใช้ Franz diffusion cell ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 3 และ 6 ชั่วโมง พบว่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไม่มีการตรวจพบ pLuc ทั้งในชั้นสตราตัม คอร์เนียม (SC), ชั้นหนังหนูและใน receiver compartment งานวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นว่า ตำรับถุงขนาดนาโนที่ดีที่สุด คือตำรับที่ประกอบด้วย DPPC/Chol/DDAB ในอัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 1:1:1 เนื่องจากมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ มีประสิทธิภาพในการเก็บกัก pLuc สูง พลาสมิดที่เก็บกักมีความคงตัวสูงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ และมีการแสดงออกของยีนลูซิเฟอเรสสูง แต่ตำรับดังกล่าวไม่ได้แสดงผลการดูดซึมผ่านหนังหนูที่เป็นที่น่าพอใจ อย่างไรก็ตาม สามารถนำข้อมูลจากผลงานวิจัยนี้ไปใช้ในการพัฒนาตำรับถุงขนาดนาโนที่มีประสิทธิภาพสำหรับการนำส่งยีนได้ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved