Thesis Title	Development of a Nanovesucular Formulation Entrapped with Tyrosinase DNA Plasmid for Topical Vitiligo Gene Therapy	
Author	Ms. Narinthorn Khositsuntiwong	
Degree	Doctor of Philosophy (Pharmacy)	
Thesis Advisory Committee	Prof. Dr. Jiradej Manosroi	Advisor
	Prof. Dr. Aranya Manosroi	Co-advisor
	Prof. Dr. Rolf G. Werner	Co-advisor
	Prof. Dr. Friedrich Götz	Co-advisor

ABSTRACT

This study aimed to develop a cationic nanovesicular formulation entrapped with tyrosinase DNA plasmid for topical vitiligo gene therapy using luciferase plasmid (pLuc) as a model gene. The liposomes (DPPC/cholesterol/DDAB at 1:1:1 molar ratio) and niosomes (Tween61/cholesterol/DDAB at 1:1:0.5 molar ratio) were prepared by freeze-dried emptying liposomes (FDELs) method. The elastic nanovesicles were prepared by hydrating the lipid or surfactant film by 25% of ethanol instead of distilled water. The pLuc loaded elastic cationic nanovesicles exhibited higher plasmid stability than that plasmid loaded non-elastic cationic nanovesicles kept at 4±2 and 25±2^{o}C for 8 weeks. The deformability indices of the pLuc loaded elastic liposomes and niosomes were 16.64±2.92 and 20.72±0.82, whereas the non-elastic nanovesicles gave 9.35±0.09 and 10.08±0.12, respectively. Transdermal absorptions through stratum corneum (SC) stripping rat skin or with iontophoresis of pLuc loaded nanovesicles by vertical Franz diffusion cells were investigated at 37^{o}C for 6 hours. Without the SC stripping technique or iontophoresis, pLuc from the free and pLuc loaded non-elastic cationic liposomes or niosomes was not found in all parts of the skin. The pLuc from pLuc loaded non-elastic cationic nanovesicles with SC stripping and iontophoresis and the pLuc loaded elastic cationic nanovesicles could be observed in viable epidermis and dermis (VED) and also in the

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

receiving solution. The pLuc loaded elastic cationic niosomes and the pLuc loaded non-elastic cationic niosomes with iontophoresis demonstrated the high delivery of the plasmid with the fluxes of 2.84±0.04 and 9.60±1.31 μg/cm^2/h, respectively in VED and 1.96±0.21 and 8.82±0.28 μg/cm^2/h, respectively in receiving solution. Thus, the non-elastic (NE) and elastic (E) cationic niosomes were selected for further investigations. The pMEL34, a human tyrosinase plasmid was loaded in the selected NE and E formulations at 100-600 μg/16 mg of the niosomal contents. The maximum loading amount of 150 μg/16 mg of the niosomal contents was observed. At 8 weeks, the remaining plasmid in the pMEL34 loaded E kept at 4±2 and 25±2^{o}C were 49.75 and 38.57%, respectively, whereas at 45±2^{o}C, all plasmid were degraded. For transdermal absorption through rat skin, the fluxes of pMEL34 loaded NE and E in VED were 0.017±0.01 and 0.022±0.00 μg/cm^2/h, respectively, whereas in the receiving solution, only pMEL34 loaded E was observed. The pMEL34 loaded E showed the highest tyrosinase gene expression with higher tyrosinase activity than the free and the plasmid loaded NE of about 4 times. For pAH7/Tyr (P), a human tyrosinase plasmid, the maximum loading amount in the NE and E was 130 and 100 μg/16 mg of the niosomal contents, respectively. The PE demonstrated higher plasmid stability than the PNE at all temperatures. The PE exhibited high tyrosinase enzyme activity of 1.66 and 1.50 folds in non-tyrosinase producing (M5) cells and 6.81 and 4.37 folds in tyrosinase producing ($B_{16}F_{10}$) cells of the P and PNE, respectively. The E formulation was selected for further studies. The P and *trans*-activating transcriptional (Tat, T) peptide of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) at the T/P ratios of 0.125:1, 0.25:1 and 0.5:1 w/w were loaded in E to obtain TPE. The PE at P/E ratio of 1:160 w/w and TPE at T/P/E ratio of 0.125:1:160, 0.25:1:160 and 0.5:1:160 w/w/w demonstrated 100% entrapment efficiency. By using sulforhodamine B (SRB) assay, TP (0.125:1, 0.25:1 and 0.5:1), PE (1:160) and TPE (0.125:1:160, 0.25:1:160 and 0.5:1:160) complexes showed slight or no cytotoxic effect. The cells transfected with TPE (0.5:1:160) exhibited high enhancement of tyrosinase enzyme activity of 11.82, 7.67, 5.07 and 6.29 folds of control, P (4 ng/μl), PE (1:160) and TP (0.5:1) and melanin production of 13.03, 8.46, 5.36 and 6.58 folds of control, P (4 ng/μl), PE (1:160) and TP (0.5:1), respectively. The transdermal absorption study of TPE (0.5:1:160) complexes comparing with the P (0.05 μg/μl),

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

TP (0.5:1) and PE (1:160) was performed. The highest cumulative amounts and fluxes of the plasmid in the VED were observed from TPE complexes of 0.31±0.04 μg/cm^2 and 1.86±0.24 μg/cm^2/h, respectively. Only plasmid from PE and TPE complexes could be found in the receiving solution with the cumulative amounts and fluxes at 6 h of 0.07±0.01 μg/cm^2 and 0.40±0.08 μg/cm^2/h for PE, and 0.10±0.01 μg/cm^2 and 0.60±0.06 μg/cm^2/h for TPE complexes, respectively. The elastic cationic niosomes demonstrated an increase in thermal stability of the plasmid. At 8 weeks of storage, the remaining plasmid of P, PE and TPE kept at 4±2^{o}C and 25±2^{o}C were 35.00±0.53, 40.35±1.41 and 44.71±0.72%; and 23.20±0.87, 29.69±0.29 and 31.91±0.17%, respectively. At 45±2^{o}C, the remaining plasmid was observed only from PE and TPE complexes (29.50±0.16 and 28.32±0.36%, respectively), whereas P was almost degraded at 6 weeks. The vesicular size and the zeta potential values of PE and TPE complexes were slightly increased but still within the range of stable dispersion (out of ±30 mV). Thirty micrograms of plasmid in P (0.05 μg/μl), TP (0.5:1), PE (1:160) and TPE (0.5:1:160) were incorporated into 100 mg of the Carbopol 980 gel. All gel formulations demonstrated the Non-Newtonian, pseudoplastic behavior. For transdermal absorption study, the highest cumulative amount and flux of the plasmid in VED at 6 h was observed from the TPE gel of 4.29±0.40 μg/cm^2 and 25.73±2.40 μg/cm^2/h, respectively. Only plasmid from PE and TPE gel was found in the receiver solution with the highest cumulative amount and flux in the TPE gel of 1.02±0.05 μg/cm^2 and 6.13±0.28 μg/cm^2/h, respectively. The primary irritation index (PII) values demonstrated no skin irritation effect of the P, TP, PE and TPE in both forms of solution and gel formulations. The PE and TPE gel exhibited thermal stability of the plasmid. At the first and second month, the percentages remaining of the plasmid from PE and TPE gel kept at all temperatures were 51.52-77.65% and 51.25-74.81%, respectively, whereas most of the plasmid in P gel kept at 45±2^{o}C for 2 months was degraded. At the third month, the plasmid was still observed from all gel formulations kept at 4±2 and 25±2^{o}C of about 12.34-38.31% and 8.63-36.10%, respectively, whereas at 45±2^{o}C, all plasmid were degraded. The results of this study indicated the potential application of TPE complexes for further investigation as an efficient transdermal gene delivery system for vitiligo gene therapy.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การพัฒนาตำรับถุงขนาดนาโนที่เก็บกักพลาสมิดดีเอ็นเอไทโรซิเนสเพื่อใช้ทางผิวหนังสำหรับรักษาโรคด่างขาวด้วยยีนบำบัด

ผู้เขียน นางสาวนรินทร โฆษิตสันติวงศ์

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เภสัชศาสตร์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ศ. ดร. จีรเดช มโนสร้อย	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ศ. ดร. อรัญญา มโนสร้อย	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ศ. ดร. รอล์ฟ จี แวร์เนอร์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ศ. ดร. ฟริดริช เกอท์ซ	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาตำรับถุงขนาดนาโนที่มีประจุบวกซึ่งเก็บกักพลาสมิดดีเอ็นเอไทโรซิเนสสำหรับใช้รักษาโรคด่างขาวด้วยยีนบำบัด โดยใช้ลูซิเฟอเรสพลาสมิด (pLuc) เป็นยีนต้นแบบ ในขั้นตอนการพัฒนาและคัดเลือกสูตรตำรับ ได้เตรียมไลโปโซม ซึ่งประกอบด้วยดีพีพีซี (DPPC)/ โคเลสเตอรอล (cholesterol)/ ดีดีเอบี (DDAB) ที่อัตราส่วนโดยโมล 1:1:1 และนีโอโซม ที่ประกอบด้วยทวีน 61 (Tween61)/ โคเลสเตอรอล (cholesterol)/ ดีดีเอบี (DDAB) ที่อัตราส่วนโดยโมล 1:1:0.5 โดยวิธี freeze-dried emptying liposomes (FDELs) ในการเตรียมไลโปโซมและนีโอโซมประจุบวกที่มีความยืดหยุ่น จะละลายฟิล์มของไขมันหรือสารลดแรงตึงผิวด้วย 25% เอธานอลแทนการใช้น้ำกลั่น pLuc ที่เก็บกักในถุงขนาดนาโนที่มีความยืดหยุ่นมีความคงตัวสูงกว่า pLuc ที่เก็บกักในถุงขนาดนาโนที่ไม่มีความยืดหยุ่นซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ 4±2, 25±2 และ 45±2 องศาเซลเซียส นาน 8 สัปดาห์ ไลโปโซมและนีโอโซมที่มีความยืดหยุ่นที่เก็บกัก pLuc มีค่าความยืดหยุ่นเท่ากับ 16.64±2.92 และ 20.72±0.82 ตามลำดับ ไลโปโซมและนีโอโซมที่ไม่มีความยืดหยุ่นมีค่าดังกล่าวเท่ากับ 9.35±0.09 และ 10.08±0.12 ตามลำดับ จากการศึกษาประสิทธิภาพในการซึม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผ่านผิวหนังของลูซิเฟอเรสพลาสมิดที่เก็บกักในถุงขนาดนาโนด้วย vertical Franz diffusion cells ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง พบว่า เมื่อไม่ใช้เทคนิคการกำจัดผิวชั้นสตราตัมคอร์เนียม หรือเทคนิคไอออนโตโฟเรซิส pLuc ทั้งที่ไม่ได้เก็บกักและที่เก็บกักในถุงขนาดนาโนที่ไม่มีความยืดหยุ่นไม่สามารถซึมผ่านผิวหนังได้ มีเพียง pLuc ที่เก็บกักในไลโปโซมและนีโอโซมประจุบวกที่มีความยืดหยุ่น และที่ไม่มีความยืดหยุ่นร่วมกับการกำจัดผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียม หรือเทคนิคไอออนโตโฟเรซิสเท่านั้นที่สามารถผ่านเข้าสู่ผิวหนังชั้นอีพิเดอร์มิสและเดอร์มิส และชั้นรีซีพเวอร์ได้ โดย pLuc ที่เก็บกักในนีโอโซมประจุบวกที่มีความยืดหยุ่น และที่ไม่มีความยืดหยุ่นร่วมกับการใช้ไอออนโตโฟเรซิสสามารถผ่านเข้าสู่ผิวหนังได้มากโดยมีค่าฟลักซ์เท่ากับ 2.84±0.04 และ 9.60±1.31 ไมโครกรัม/ตารางเซนติเมตร/ชั่วโมงตามลำดับ ในผิวหนังชั้นอีพิเดอร์มิสและเดอร์มิส และ 1.96±0.21 และ 8.82±0.28 ไมโครกรัม/ตารางเซนติเมตร/ชั่วโมง ตามลำดับ ในชั้นรีซีพเวอร์ ดังนั้นจึงคัดเลือกนีโอโซมประจุบวกทั้งที่ไม่ยืดหยุ่น (NE) และที่มีความยืดหยุ่น (E) ไปทำการศึกษาต่อ โดยนำไทโรซิเนสดีเอ็นเอพลาสมิด (pMEL34) มาเก็บกักใน NE และ E ในอัตราส่วน 100-600 ไมโครกรัม/ 16 มิลลิกรัมของปริมาณนีโอโซม ซึ่งปริมาณ pMEL34 ที่สามารถเก็บกักได้สูงสุดเท่ากับ 150 ไมโครกรัม/16 มิลลิกรัมของปริมาณนีโอโซม เมื่อศึกษาความคงตัวของ pMEL34 ที่เวลา 8 สัปดาห์ พบว่า pMEL34 ที่เก็บกักใน E ซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ 4±2 และ 25±2 องศาเซลเซียส มีปริมาณคงเหลือเท่ากับ 49.75 และ 38.57% ตามลำดับ ในขณะที่ pMEL34 อุณหภูมิ 45±2 องศาเซลเซียสนั้นสลายตัวไปทั้งหมด สำหรับการศึกษาการซึมผ่านผิวหนัง พบว่า ค่าฟลักซ์ในผิวหนังชั้นอีพิเดอร์มิสและเดอร์มิสของ pMEL34 ที่เก็บกักใน NE และ E มีค่าเท่ากับ 0.017±0.01 และ 0.022±0.00 ไมโครกรัม/ตารางเซนติเมตร/ชั่วโมง ตามลำดับ สำหรับชั้นรีซีพเวอร์ มีเพียง pMEL34 ที่เก็บกักใน E เท่านั้นที่สามารถพบได้ในชั้นดังกล่าว เซลล์ $B_{16}F_{10}$ ที่ได้รับ pMEL34 ที่เก็บกักใน E มีประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงกว่าเซลล์ที่ได้รับ pMEL34 ที่ไม่ได้เก็บกัก และที่เก็บกักใน NE ประมาณ 4 เท่า สำหรับไทโรซิเนสพลาสมิดซึ่งมีไทโรซิเนสยีนของมนุษย์ (pAH7/Tyr, P) ที่เก็บกักใน NE และ E นั้น มีปริมาณ P ที่สามารถเก็บกักได้สูงสุดเท่ากับ 130 และ 100 ไมโครกรัม/ 16 มิลลิกรัมของปริมาณนีโอโซม ตามลำดับ จากการศึกษาความคงตัวของพลาสมิด พบว่า PE มีความคงตัวสูงกว่า PNE ในทุกอุณหภูมิ นอกจากนี้ PE ยังมีประสิทธิภาพสูงในการเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส คิดเป็น 1.66 และ 1.50 เท่า ในเซลล์ที่ไม่สร้างไท

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โรซิเนส (M5) และ 6.81 และ 4.37 เท่า ในเซลล์ที่สร้างไทโรซิเนส ($B_{16}F_{10}$) เมื่อเปรียบเทียบกับ P และPNE ตามลำดับ จากผลการทดลองข้างต้น ได้คัดเลือก E เพื่อไปพัฒนาในขั้นตอนต่อไป โดย P และแทท (Tat, T) เปปไทด์ ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนักของ T/P 0.125:1, 0.25:1 และ 0.5:1 ได้ถูกนำไปเก็บกักใน E เพื่อเตรียมเป็น TPEโดย PE ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนักของ P/E เท่ากับ 1:160 และ TPE ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนักของ T/P/E กับ 0.125:1:160, 0.25:1:160 และ 0.5:1:160 มีประสิทธิภาพในการเก็บกัก P ได้ 100% ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี SRB assay พบว่า TP (0.125:1, 0.25:1 และ 0.5:1), PE (1:160) และ TPE (0.125:1:160, 0.25:1:160 และ 0.5:1:160) complexes นั้นไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ สำหรับเซลล์ที่ได้รับ TPE (0.5:1:160) มีประสิทธิภาพในการเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้สูงที่สุด คิดเป็น 11.82, 7.67, 5.07 และ 6.29 เท่าของกลุ่มควบคุม และเซลล์ที่ได้รับ P (4 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) TP (0.5:1) และ PE (1:160) ตามลำดับ และมีการสร้างเมลานินคิดเป็น 13.03, 8.46, 5.36 และ 6.58 เท่าของกลุ่มควบคุม และเซลล์ที่ได้รับ P (4 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) TP (0.5:1) และ PE (1:160) ตามลำดับ จากการศึกษาการซึมผ่านหนังหนูของ TPE (0.5:1:160) เปรียบเทียบกับ P (0.05 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร) TP (0.5:1) และ PE (1:160) พบว่า TPE มีปริมาณและค่าฟลักซ์ของพลาสมิดในผิวหนังชั้นอีพิเดอร์มิสและเดอร์มิสสูงที่สุด เท่ากับ 0.31±0.04 ไมโครกรัม/ตารางเซนติเมตร และ 1.86±0.24 ไมโครกรัม/ตารางเซนติเมตร/ชั่วโมง ตามลำดับ และมีเพียง PE และ TPE เท่านั้นที่สามารถผ่านเข้าสู่ชั้นรีซีพเวอร์โดยมีปริมาณและค่าฟลักซ์ของพลาสมิดที่เวลา 6 ชั่วโมง เท่ากับ 0.01±0.01 ไมโครกรัม/ตารางเซนติเมตร และ 0.40±0.08 ไมโครกรัม/ตารางเซนติเมตร/ชั่วโมง สำหรับ PE และ 0.10±0.01 ไมโครกรัม/ตารางเซนติเมตร และ 0.60±0.06 ไมโครกรัม/ตารางเซนติเมตร/ชั่วโมง สำหรับ TPE ตามลำดับ ทั้งนี้ E สามารถเพิ่มความคงตัวต่ออุณหภูมิของ P ได้ โดยที่เวลา 8 สัปดาห์ ปริมาณ P ที่คงเหลือสำหรับ P ที่ไม่ได้เก็บกัก (0.05 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร) PE (1:160) และ TPE (0.5:1:160) ซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ 4±2 และ 25±2 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 35.00±0.53, 40.35±1.41 และ 44.71±0.72%; และ 23.20±0.87, 29.69±0.29 และ 31.91±0.17% ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 45±2 องศาเซลเซียส มีเพียง PE และ TPE ที่ยังคงเหลืออยู่ 29.50±0.16 และ 28.32±0.36% ตามลำดับ ในขณะที่ P นั้นสลายตัวไปทั้งหมดที่เวลา 6 สัปดาห์ นอกจากนี้ขนาดอนุภาคและค่าศักย์ซีต้าของ PE และ TPE นั้นมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ยังคงอยู่ในช่วงที่มีความคงตัวคืออยู่นอกช่วง ±30 มิลลิโวลต์ จากนั้นนำ P (0.05

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไมโครกรัม/ไมโครลิตร) TP (0.5:1) PE (1:160) และ TPE (0.5:1:160) ซึ่งมีปริมาณ P เท่ากับ 30 ไมโครกรัมมาเตรียมเป็นตำรับเจล 100 มิลลิกรัม โดยใช้คาร์โบพอล (Carbopol) 980 เป็นสารก่อเจล ซึ่งทุกตำรับมีสมบัติการไหลแบบนอน-นิวโตเนียน ชนิดซูโดพลาสติก ผลการศึกษาการซึมผ่านหนังหนูของตำรับเจล พบว่า เจล TPE มีปริมาณ P และค่าฟลักซ์ในผิวหนังชั้นอีพิเดอร์มิสและเดอร์มิสที่เวลา 6 ชั่วโมงสูงที่สุด เท่ากับ 4.29±0.40 ไมโครกรัม/ตารางเซนติเมตร และ 25.73±2.40 ไมโครกรัม/ตารางเซนติเมตร/ชั่วโมง ตามลำดับ รองลงมาคือ เจล PE สำหรับปริมาณและค่าฟลักซ์ของ P จากตำรับเจล P และเจล TP มีค่าใกล้เคียงกัน และมีเพียง P จากตำรับเจล PE และเจล TPE เท่านั้นที่สามารถผ่านเข้าสู่ชั้นรีซีพเวอร์ โดยเจล TPE มีปริมาณและค่า ฟลักซ์ของ P สูงที่สุด เท่ากับ 1.02±0.05 ไมโครกรัม/ตารางเซนติเมตร และ 6.13±0.28 ไมโครกรัม/ตารางเซนติเมตร/ชั่วโมง ตามลำดับ จากการทดสอบความระคายเคืองต่อผิวหนังกระต่าย พบว่า P, TP, PE และ TPE ทั้งในรูปแบบสารละลายและตำรับเจลไม่ก่อให้เกิดความระคายเคืองต่อผิวหนัง ตำรับเจล PE และเจล TPE สามารถเพิ่มความคงตัวต่ออุณหภูมิของพลาสมิดได้ โดยที่เวลา 1 และ 2 เดือน พบว่า มีปริมาณพลาสมิดที่คงเหลือจากตำรับเจล PE และเจล TPE ในทุกอุณหภูมิประมาณ 51.52-77.65% และ 51.25-74.81% ตามลำดับ ในขณะที่พลาสมิดในตำรับเจล P ที่อุณหภูมิ 45±2 องศาเซลเซียส นั้นสลายตัวไปทั้งหมดที่เวลา 2 เดือน ในเดือนที่ 3 สามารถพบพลาสมิดที่คงเหลือได้ในทุกตำรับที่อุณหภูมิ 4±2 และ 25±2 องศาเซลเซียส ประมาณ 12.34-38.31% และ 8.63-36.10% ตามลำดับ และที่อุณหภูมิ 45±2 องศาเซลเซียสนั้น พบว่า พลาสมิดในทุกตำรับสลายตัวไปทั้งหมด ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นแนวโน้มในการประยุกต์ TPE เป็นระบบนำส่งยีนที่มีประสิทธิภาพสูง สำหรับการประยุกต์เพื่อการรักษาโรคด่างขาวด้วยยีนบำบัดต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved