

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



E42142

DEVELOPMENT OF A HIGH EFFICIENCY CALCITONIN
ORAL DELIVERY SYSTEM USING
VIRAL LIGAND AND CPP

WARANGKANA LOHCHAROENKAL

DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN PHARMACY

THE GRADUATE SCHOOL
CHIANG MAI UNIVERSITY
NOVEMBER 2011

600256294

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



**DEVELOPMENT OF A HIGH EFFICIENCY CALCITONIN
ORAL DELIVERY SYSTEM USING
VIRAL LIGAND AND CPP**



WARANGKANA LOHCHAROENKAL

**A THESIS SUBMITTED TO THE GRADUATE SCHOOL IN
PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN PHARMACY**

**THE GRADUATE SCHOOL
CHIANG MAI UNIVERSITY**

NOVEMBER 2011

**DEVELOPMENT OF A HIGH EFFICIENCY CALCITONIN ORAL
DELIVERY SYSTEM USING VIRAL LIGAND AND CPP**

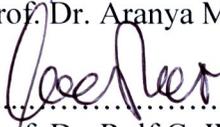
WARANGKANA LOHCHAROENKAL

THIS THESIS HAS BEEN APPROVED
TO BE A PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN PHARMACY

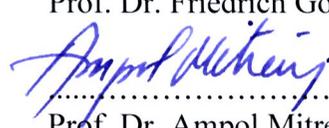
EXAMINING COMMITTEE

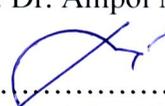

.....CHAIRPERSON
Prof. Dr. Jiradej Manosroi


.....MEMBER
Prof. Dr. Aranya Manosroi


.....MEMBER
Prof. Dr. Rolf G. Werner


.....MEMBER
Prof. Dr. Friedrich Götz

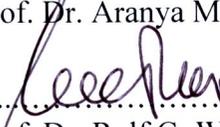

.....MEMBER
Prof. Dr. Ampol Mitrevej


.....MEMBER
Asst. Prof. Dr. Kassara Pattamapun

THESIS ADVISORY COMMITTEE


.....ADVISOR
Prof. Dr. Jiradej Manosroi


.....CO-ADVISOR
Prof. Dr. Aranya Manosroi


.....CO-ADVISOR
Prof. Dr. Rolf G. Werner


.....CO-ADVISOR
Prof. Dr. Friedrich Götz

9 November 2011

© Copyright by Chiang Mai University

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deep and sincere gratitude to my major advisor, Prof. Dr. Jiradej Manosroi for his supervision, advices, and guidances from the very early stage of this research as well as giving me extraordinary experiences throughout the work. He has provided me an unflinching encouragement and support in various ways. His truly scientist intuition has made him as a constant oasis of ideas and passions in science, which exceptionally inspire and enrich my growth as a student, a researcher and a scientist want to be. Also, I am gratefully acknowledge to my co-advisor, Prof. Dr. Aranya Manosroi for her valuable advices, supervision and crucial contribution to this thesis. I would like to thank both of them for the efforts on the collaboration with the foreign professors to be my co-advisors.

I wish to express my sincere thanks to my foreign co-advisors, Prof. Dr. Friedrich Götz, Microbial Genetics Department, University of Tübingen and Prof. Dr. Rolf G. Werner, the Senior Vice President of Corporate Division Biopharmaceuticals, Boehringer Ingelheim in Germany for their kind supports and suggestions especially Prof. Dr. Friedrich Götz for giving me opportunity to carry out a part of my thesis at Microbial Genetics Department, University of Tübingen in Germany for 10 months during June 2008 to April 2009.

My sincere thanks also go to Prof. Dr. Ampol Mitrevej and Asst. Prof. Dr. Kassara Pattamapun for being the examining committees of my thesis defense.

I also wish to express my warm thanks to my colleagues, all staffs and graduate students at Natural Products Research and Development Center (NPRDC), Faculty of Pharmacy, Science and Technology Research Institute (STRI), Chiang Mai

University, Thailand for their technical help and friendship during my study. I would like to thank all people, especially Mr. Jan Yeh and Mrs. Mei-Hui, Dr. Ralph Bertram, Ms. Stefanie Heinrich, Mr. Mulugeta Nega, Mr. Martin Schlag, Ms. Wenqi Yu, Dr. Steffen Schlag, Dr. Melanie Kull, Ms. Rosmarie Gaupp and Ms. Martina Leibig at Microbial Genetics Department, University of Tübingen, Germany for their friendship and help during my stay in Germany.

I would like to thank the Thailand Research Fund (TRF) for providing me the Royal Golden Jubilee PhD (RGJ-PhD) scholarship program and the Nanoscience and Nanotechnology Research Center Project, Faculty of Sciences, Chiang Mai University, Thailand for partial financial support. My sincere thanks are to the official assistance and supports from all personnels and staffs at the Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University.

Finally, I would like to thank my family for all their love and encouragement throughout my study. Thanks to everybody who was important to the successful realization of the thesis, as well as expressing my apology that I could not mention personally one by one.

Warangkana Lohcharoenkal

Thesis Title	Development of a High Efficiency Calcitonin Oral Delivery System Using Viral Ligand and CPP	
Author	Ms. Warangkana Lohcharoenkal	
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

E 42142

This study aimed to develop a high efficiency orally active calcitonin delivery system using VP sequence of poliovirus and cell penetrating peptide (CPP) as a ligand for poliovirus receptor (PVR) in gastrointestinal tract and transport carrier, respectively. Green fluorescent protein (GFP) was used as a reporter protein in the delivery system development step. Five constructed plasmids encoding protein and fusion proteins including GFP, N-terminal Tat-GFP (Tat-GFP), C-terminal Tat-GFP (GFP-Tat), N-terminal VP-GFP (VP-GFP) and Tat-GFP-VP were transformed and expressed in *E. coli* BL21 (DE3). Effects of the N-terminal and C-terminal fusion proteins on the cellular uptake efficiency of these fusion proteins were evaluated. Tat-GFP fusion protein gave higher cellular uptake than GFP-Tat fusion protein. VP-GFP enhanced the uptake of GFP into HT-29 and KB cells, but lower than the Tat-GFP fusion protein. The cellular uptake of Tat-GFP-VP fusion protein was lower than either Tat-GFP or VP-GFP indicating no synergistic effect of Tat and VP on the enhancement of the GFP uptake. Since the highest GFP cellular uptake efficiency of Tat-GFP was lower than 6% which might not be enough for the application in drug

delivery systems, the strategies of entrapment in nanovesicles and simple mixing were applied. Neutral, cationic and anionic liposomes and niosomes were prepared by the freeze dried empty liposome (FDEL) method. The neutral, cationic and anionic liposomes were composed of DPPC/cholesterol (CHL), DPPC/CHL/DDAB and DPPC/CHL/DP at the molar ratios of 7:3, 7:2:1 and 7:2:1, respectively, while the neutral, cationic and anionic niosomes were composed of Tween 61/ CHL, Tween 61/CHL/DDAB and Tween 61/CHL/DP at the molar ratios of 1:1, 1:1:0.05 and 1:1:0.05, respectively. The Tat-GFP fusion protein was loaded in non-elastic nanovesicles by reconstitution the lyophilized blank nanovesicles with the Tat-GFP (1 μ M) in phosphate buffer solution (pH 7.0). The loaded elastic nanovesicles was prepared by reconstitution the lyophilized blank nanovesicles with the Tat-GFP in phosphate buffer solution containing 25% v/v ethanol. The particle sizes and zeta potential of the blank and loaded nanovesicles characterized by DLS were in the range of 50.77 ± 0.89 to 777.83 ± 13.95 nm and (-) 17.3 ± 3.33 to 36.6 ± 2.95 mV, respectively. The Tat-GFP loaded in elastic anionic niosomes gave the highest GFP uptake of 14.62 ± 0.07 and $15.32\pm 0.96\%$ in HT-29 and KB cells which was 2.81 and 2.84 folds of the free Tat-GFP, respectively. However, this niosomal formulation demonstrated obviously cytotoxicity with cell viability of only 37.29 ± 0.67 and 62.48 ± 5.58 in HT-29 and KB cells, respectively. The low toxic elastic anionic niosomes containing lower ethanol contents or the edge activators such as sodium cholate (NaC) showed similar uptake efficiency of Tat-GFP in the range of 13.28 ± 0.48 to $15.95\pm 0.78\%$ in HT-29 cell and 12.74 ± 1.31 to 16.62 ± 1.53 in KB cells. The elastic anionic niosomes containing 1 mol% NaC showed the highest cell viability of 92.32 ± 3.82 and $96.62\pm 5.96\%$ in HT-29 and KB cells, respectively. For the simple mixing strategy, the cellular uptake of GFP from the Tat/GFP mixture at 1:1 molar ratio in HT-29 cells after 1 hr incubation was $9.31\pm 0.05\%$ which was 1.79 folds of the Tat-GFP fusion protein. The transdermal transport of the Tat/GFP mixture was 8.87 folds of the Tat-GFP fusion protein. By using polioviral capsid peptide VP, the enhancement of GFP translocation by mixing with VP or Tat peptide at various molar ratios was demonstrated. GFP/VP mixture increased the cellular uptake of GFP into HT-29 and KB cells in the range of 8.52-8.73 and 8.58-8.92%, which were 3.89-3.98 and 3.90-4.05 folds of GFP, respectively. For GFP/Tat

mixtures, the uptake efficiency of GFP in HT-29 and KB cells were in the range of 9.29-10.05 and 9.67-11.19% which were 4.24-4.59 and 4.39-5.09 folds of GFP respectively. GFP/VP/Tat mixtures showed similar cellular uptake efficiency to either VP or Tat indicating no synergistic effect of VP and Tat on the translocation of GFP into HT-29 and KB cells. The simple mixing strategy was selected for further investigation with salmon calcitonin (sCT) due to the inadequate data of *in vivo* toxicity after oral administration of the niosomal formulation which contained non-ionic surfactants. The mixtures of Tat/sCT, VP/sCT and VP/Tat/sCT at various molar ratios were prepared. The physico-chemical interaction between sCT and VP or Tat of Tat/sCT, VP/sCT and VP/Tat/sCT mixtures was investigated by dynamic particle sizes determination, DSC thermogram and FT-IR spectrum. The enhancement of *in vitro* and *in vivo* sCT bioactivity by mixing with Tat and/or VP was determined from the increase of intracellular calcium level and the decrease of serum calcium, respectively. *In vitro* calcitonin bioactivity was determined in HT-29 and KB cells. When mixed with Tat, the *in vitro* activity of sCT was increased with the maximum relative intracellular calcium of $116.46 \pm 0.57\%$ and $172.14 \pm 4.12\%$ at 3:1 and 1:1 molar ratio of Tat/sCT mixture in HT-29 and KB cell lines, respectively. The VP/sCT mixture at 6:1 molar ratio showed a significant increase of intracellular calcium in HT-29 cells of 152.07% of the control resulting from the ligand-receptor mediated cellular delivery of sCT by the interaction between VP and PVR (poliovirus receptor) in HT-29, the cells harbouring the extracellular domain CD155 which is the receptor for VP. The oral hypocalcemic activity in rats of sCT and the mixtures (Tat/sCT mixtures at 3:1 and 1:1; VP/sCT mixtures at 6:1 and 3:1; and VP/Tat/sCT mixture at 6:1:1 molar ratios) which showed the highest sCT activity in HT-29 and KB cells were investigated. The Tat/sCT mixture at the dose of 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (1:1 molar ratio) demonstrated hypocalcemic effect with the reduction in the serum calcium level of about 18-31% of the control and the prolonged activity of over 24 hr. However, the hypocalcemic effect was not observed in the VP/sCT mixtures due to the lack of PVR in rats. The potential of the Tat/GFP mixture for the application in transdermal delivery was also evaluated by Franz diffusion cell at $37 \pm 2^\circ\text{C}$ for 6 hours. The result showed that the Tat/sCT mixture gave higher cumulative amounts and fluxes both in the VED and the receiver compartment than the sCT solution. The higher percentage

remaining of sCT than the sCT solution after the 1 month storage at 4 ± 2 , 25 ± 2 and $45\pm 2^\circ\text{C}$ was observed, indicating the improved sCT stability of the Tat/sCT mixture. This study has demonstrated that the Tat peptide, a CPP can efficiently both orally and transdermally deliver sCT into the cell by the simple mixing strategy. For VP, an appropriate animal model bearing PVR are needed for the *in vivo* study. The application of the Tat peptide and VP for the enhancement of sCT delivery to increase the *in vitro* intracellular calcium level, *in vivo* hypocalcemic activity and the chemical stability of sCT can be also applied for further development of other efficient peptide drugs delivery systems.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การพัฒนาระบบนำส่งประสิทธิภาพสูงของแคลซิ โตนินแบบรับประทานโดยใช้ไวรัสลิแกนด์และซีพีพี	
ผู้เขียน	นางสาว วรางคณา โล่ห์เจริญกาล	
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เภสัชศาสตร์)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ศ. ดร. จีระเดช มโนสร้อย	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	ศ. ดร. อรัญญา มโนสร้อย	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ศ. ดร. รอล์ฟ จี แวร์เนอร์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ศ. ดร. พรีดิช เกอท์ซ	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

E 42142

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาระบบนำส่งยาประสิทธิภาพสูงสำหรับการให้แคลซิโตนิน โดยการรับประทานด้วยการใช้ส่วนของวีพีจากโพลีโอไวรัสและเปปไทด์นำส่งที่เรียกว่าซีพีพี เพื่อเป็นลิแกนด์สำหรับตัวรับของโพลีโอไวรัสในทางเดินอาหาร และเป็นตัวพาของระบบนำส่งตามลำดับ จีเอฟพีใช้เป็น โปรตีนตัวติดตาม (รีพอร์ตเตอร์) ในขั้นตอนของการพัฒนาระบบนำส่งพลาสมิด 5 ตัวของจีเอฟพีและพีวชัน โปรตีนระหว่างแททเปปไทด์กับจีเอฟพีที่ปลายอะมิโน (แทท-จีเอฟพี) และปลายคาร์บอกซี (จีเอฟพี-แทท) พีวชัน โปรตีนระหว่างวีพีเปปไทด์กับจีเอฟพีที่ปลายอะมิโน (วีพี-จีเอฟพี) และพีวชัน โปรตีนระหว่างแทท จีเอฟพีและวีพี ได้จากการผลิตในแบคทีเรียอีโคไลสายพันธุ์ BL21 (DE3) ผลของการเชื่อมต่อนของโปรตีนนำส่งที่ปลายอะมิโนและปลายคาร์บอกซีต่อประสิทธิภาพของการนำส่งเข้าสู่เซลล์ พบว่าการเชื่อมต่อนของแททที่ปลายอะมิโนของจีเอฟพีสามารถนำส่งพีวชัน โปรตีนเข้าสู่เซลล์ได้มากกว่าที่ปลายคาร์บอกซี การเชื่อมต่อนกับวีพีที่ปลายอะมิโนสามารถนำส่งจีเอฟพีเข้าสู่เซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) และเซลล์มะเร็งลำไส้ (HT-29) ได้น้อยกว่าพีวชัน โปรตีนระหว่างแททกับจีเอฟพี นอกจากนี้ การนำส่งเข้าสู่เซลล์ของพีวชัน

โปรตีนระหว่างแทท จีเอฟพี และวีพีทีน้อยกว่าฟิวชั่นโปรตีนระหว่างแททกับจีเอฟพีและวีพีกับจีเอฟพี ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม่มีการเสริมฤทธิ์กันระหว่างการนำส่งจีเอฟพีด้วยแททและวีพี เนื่องจากประสิทธิภาพสูงสุดในการนำส่งจีเอฟพีเข้าสู่เซลล์ของแทท-จีเอฟพียังมีค่าต่ำกว่า 6% ของปริมาณเริ่มต้นซึ่งไม่เพียงพอต่อการนำไปใช้เป็นระบบนำส่งยา ดังนั้นจึงได้นำเทคนิคการเก็บกักในถุงขนาดนาโนและการเตรียมของผสมมาประยุกต์ ได้เตรียมไลโปโซมและนีโอโซมทั้งชนิดไม่มีประจุ ประจุบวกและประจุลบโดยวิธีการแบบทำให้แห้ง (FDEL) ไลโปโซมชนิดไม่มีประจุ ประจุบวก และประจุลบประกอบด้วย ดีพีพีซี/ คอเลสเทอรอล, ดีพีพีซี/คอเลสเทอรอล/ดีดีเอบีและดีพีพีซี/คอเลสเทอรอล/ไดซิทิลฟอสเฟต ที่อัตราส่วน โมลาร์เท่ากับ 7:3, 7:2:1 และ 7:2:1 ส่วนนีโอโซมประกอบด้วย ทวิน61/คอเลสเทอรอล, ทวิน61/คอเลสเทอรอล/ดีดีเอบีและทวิน61/คอเลสเทอรอล/ไดซิทิลฟอสเฟต ที่อัตราส่วน 1:1, 1:1:0.05 และ 1:1:0.05 ตามลำดับ ได้นำแทท-จีเอฟพีเก็บกักในถุงขนาดนาโนแบบไม่ยึดหยุ่น โดยนำผงแห้งของถุงขนาดนาโนเปล่ากระจายตัวในสารละลายของแทท-จีเอฟพีที่ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่พีเอช 7.0 สำหรับการเก็บกักแทท-จีเอฟพีในถุงขนาดนาโนแบบยึดหยุ่นได้เตรียมโดยกระจายผงแห้งของถุงขนาดนาโนเปล่าด้วยสารละลายแทท-จีเอฟพีในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีเอทานอลความเข้มข้น 25% ปริมาตร/ปริมาตร ได้ศึกษาขนาดอนุภาคและศักย์ซีต้าของถุงขนาดนาโนที่เตรียมได้ ด้วยเทคนิคการกระเจิงของแสง (DLS) พบว่ามีขนาดอยู่ในช่วง 50.77 ± 0.89 ถึง 777.83 ± 13.95 นาโนเมตร และค่าศักย์ซีต้าเท่ากับ (-) 17.3 ± 3.33 ถึง 36.6 ± 2.95 มิลลิโวลต์ Tat-GFP ที่เก็บกักในนีโอโซมประจุลบแบบยึดหยุ่นให้ค่าการนำส่งจีเอฟพีสูงสุดเท่ากับ 14.62 ± 0.07 และ $15.32 \pm 0.96\%$ ในเซลล์ HT-29 และ KB ซึ่งคิดเป็น 2.81 และ 2.84 เท่าของ Tat-GFP ที่ไม่ได้เก็บกัก อย่างไรก็ตาม นีโอโซมประจุลบแบบยึดหยุ่นมีความเป็นพิษต่อเซลล์โดยพบการอยู่รอดของเซลล์ HT-29 และ KB เท่ากับ 37.29 ± 0.67 และ $62.48 \pm 5.58\%$ ได้ลดความเป็นพิษต่อเซลล์ของนีโอโซมประจุลบแบบยึดหยุ่นโดยลดปริมาณเอทานอลหรือใช้สารในกลุ่ม edge activator เช่น โซเดียมโคเลท (NaC) ซึ่งให้ประสิทธิภาพในการนำส่งแทท-จีเอฟพีเข้าสู่เซลล์ได้ใกล้เคียงกันในช่วง 13.28 ± 0.48 ถึง $15.95 \pm 0.78\%$ ในเซลล์ HT-29 และ 12.74 ± 1.31 ถึง $16.62 \pm 1.53\%$ ในเซลล์ KB อย่างไรก็ตาม นีโอโซมประจุลบแบบยึดหยุ่นที่มีโซเดียมโคเลทอยู่ในปริมาณ 1% โมล มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์สูงเท่ากับ 92.32 ± 3.82 และ $96.62 \pm 5.96\%$ ในเซลล์ HT-29 และ KB ตามลำดับ สำหรับเทคนิคการผสม พบว่าของผสมของแททกับจีเอฟพี (แทท/จีเอฟพี) ในอัตราส่วนโมลาร์ 1:1 ให้ค่าประสิทธิภาพในการนำส่งจีเอฟพีเท่ากับ $9.31 \pm 0.05\%$ ซึ่งคิดเป็น 1.79 เท่าของฟิวชั่นโปรตีนในเซลล์ HT-29 และสามารถเพิ่มการนำส่งจีเอฟ

ที่ผ่านชั้นผิวหนังได้มากกว่าผิวหนังโปรตีนถึง 8.87 เท่า ได้ศึกษาการเพิ่มการนำส่งจีเอฟพีเข้าสู่เซลล์ด้วยการผสมจีเอฟพีกับวีพีหรือแททที่อัตราส่วนโมลาร์ต่างๆ ในการผสมกับวีพี (วีพี/จีเอฟพี) พบว่าค่าการนำส่งจีเอฟพีเข้าสู่เซลล์ HT-29 และ KB เท่ากับ 8.52-8.73 และ 8.58-8.92% ซึ่งคิดเป็น 3.89-3.98 และ 3.90-4.05 เท่าของจีเอฟพีเดี่ยวๆ ในการผสมกับแทท พบว่าค่าการนำส่งจีเอฟพีเข้าสู่เซลล์ HT-29 และ KB เท่ากับ 9.29-10.05 และ 9.67-11.19% ซึ่งคิดเป็น 4.24-4.59 และ 4.39-5.09 เท่าของจีเอฟพี ตามลำดับ ของผสมของจีเอฟพีกับทั้งวีพี และแทท (วีพี/แทท/จีเอฟพี) ให้ค่าการนำส่งใกล้เคียงกับแทท/จีเอฟพีหรือวีพี/จีเอฟพี ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม่มีการเสริมฤทธิ์กันระหว่างแททและวีพีเปปไทด์ในการนำส่งจีเอฟพีเข้าสู่เซลล์ ได้นำรูปแบบของผสมมาศึกษาต่อกับแคลซิโดนิน เนื่องจากความเป็นพิษเมื่อให้โดยการรับประทานของนีโอโซมที่ประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ ได้เตรียมของผสมของแทท/แคลซิโดนิน วีพี/แคลซิโดนิน และวีพี/แทท/แคลซิโดนินในอัตราส่วน โมลาร์ต่างๆ และได้ศึกษาการปฏิกิริยาทางกายภาพและเคมีระหว่างแคลซิโดนินและวีพีหรือแททในแทท/แคลซิโดนิน วีพี/แคลซิโดนิน และวีพี/แทท/แคลซิโดนินด้วยการวัดขนาดอนุภาค ดิฟเฟอเรนเชียล แคลอริเมทรี และเอฟที-ไออาร์สเปกตรัม ในการเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพของแคลซิโดนินในหลอดทดลองและสัตว์ทดลองโดยผสมกับแททและ/หรือวีพี ได้พิจารณาจากการเพิ่มขึ้นของระดับแคลเซียมในเซลล์และการลดลงของแคลเซียมในเลือด ในการศึกษาในหลอดทดลองโดยใช้เซลล์ HT-29 และ KB พบว่าเมื่อผสมแคลซิโดนินกับแททสามารถเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยให้ความเข้มข้นของแคลเซียมในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 116.46 ± 0.57 และ $172.14 \pm 4.12\%$ จากของผสมแทท/แคลซิโดนินที่อัตราส่วนโมลาร์ 3:1 และ 1:1 ในเซลล์ HT-29 และ KB ของผสมวีพี/แคลซิโดนินที่อัตราส่วนโมลาร์ 6:1 ให้ความเข้มข้นแคลเซียมสูงถึง 152.07% ในเซลล์ HT-29 ซึ่งมีการแสดงออกของตัวรับของโพลิโอไวรัส ได้นำของผสมแทท/แคลซิโดนินที่ 3:1 และ 1:1, วีพี/แคลซิโดนินที่ 6:1 และ 3:1 และวีพี/แทท/แคลซิโดนินที่ 6:1:1 ซึ่งให้ฤทธิ์สูงสุดในเซลล์ทั้ง 2 ชนิดมาศึกษาในหนูทดลอง ซึ่งพบว่าแทท/แคลซิโดนินที่อัตราส่วนโมลาร์ 1:1 สามารถลดระดับแคลเซียมในซีรัมได้ 18-31% ของระดับเริ่มต้นและให้ฤทธิ์ลดระดับแคลเซียมในเลือดหนูได้มากกว่า 24 ชั่วโมงที่ขนาด 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม อย่างไรก็ตาม ของผสมวีพี/แคลซิโดนินไม่ทำให้ฤทธิ์ลดระดับแคลเซียมเนื่องจากไม่มีตัวรับสำหรับโพลิโอไวรัสในหนูซึ่งเป็นสัตว์ฟันแทะ นอกจากนี้ยังพบว่าแทท/แคลซิโดนินเพิ่มการนำส่งแคลซิโดนินผ่านทางผิวหนังได้ โดยแทท/แคลซิโดนินที่อัตราส่วนโมลาร์ 1:1 สามารถนำส่งแคลซิโดนินผ่านผิวหนังได้ดีกว่าแคลซิโดนินเดี่ยวๆ และยังเพิ่มความคงตัวของแคลซิโดนิน โดยพบปริมาณแคลซิโดนินที่เหลืออยู่มากกว่าสารละลายแคลซิโดนิน

เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 เดือน การศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของแทบเปปไทด์ในการนำส่งแคลซิโทนินทั้งทางปากและผิวหนังด้วยเทคนิคการผสม สำหรับประสิทธิภาพของวิธีนั้น จำเป็นจะต้องมีการศึกษาขั้นอื่นอีกครั้งในสัตว์ทดลองที่มีการแสดงออกของยีนตัวรับของโพลีโอไวรัส การใช้แทบเพื่อเพิ่มการนำส่งแคลซิโทนินในการเพิ่มขึ้นระดับแคลเซียมในเซลล์ ลดระดับแคลเซียมในเลือดหนู และเพิ่มความคงตัวของแคลซิโทนินสามารถนำไปประยุกต์ในการพัฒนาระบบนำส่งเปปไทด์อื่นได้ต่อไป

TABLE OF CONTENTS

	Page
Acknowledgement	iii
Abstract (English)	v
Abstract (Thai)	ix
List of tables	xxvii
List of figures	xxx
Abbreviations and symbols	xxxviii
Chapter 1 Introduction	
1.1 Statement and significance of the problem	1
1.2 Objective	4
1.3 Scope of study	4
1.4 Literature reviews	5
1.4.1. Green fluorescent protein (GFP)	5
1.4.1.1. Introduction	5
A. Historical perspective	5
B. Chromophore formation	9
1.4.1.2. Applications of GFP	11
A. Fusion tags	11
B. The reporter gene	12
C. Fluorescence resonance energy transfer (FRET)	13

D. Photobleaching	14
E. Protein-Protein interaction	15
F. Other applications	16
1.4.2. Calcitonin	17
1.4.2.1. Introduction	17
1.4.2.2. Physiologic roles of calcitonin	20
1.4.2.3. Indications	21
A. Osteoporosis	22
B. Paget's disease	22
C. Analgesic effect	23
1.4.2.4. Pharmaceutical sCT formulations	23
1.4.2.5. Calcitonin receptor (CTR) and cell signaling	24
1.4.3. Cell penetrating peptides (CPPs)	25
1.4.3.1. Introduction	25
1.4.3.2. Mechanism of translocation	27
1.4.3.3. Applications	32
A. The targeted and enhanced delivery	32
B. Protein and peptide delivery	33
C. Antisense nucleotides delivery	34
D. Peptide nucleic acids (PNAs) delivery	35
E. siRNA delivery	35

F. Liposome delivery	36
G. Plasmid delivery	36
1.4.3.4. Tat peptide	39
A. Introduction	39
B. Tat and cell surface interactions	40
C. Possible mechanisms of internalisation	46
1.4.4. Poliovirus	50
1.4.4.1. General introduction	50
1.4.4.2. The structure of poliovirus	52
1.4.4.3. Cellular life cycle	54
A. Cell entry	54
B. Polyprotein translation and proteolytic processing	56
C. RNA replication	57
1.4.4.4. Poliovirus receptor (PVR, CD155) and pathogenesis	60
1.4.4.5. Interaction of poliovirus receptor to poliovirus	64
1.4.4.6. Application of poliovirus capsid proteins	67
A. Drug design	67
B. Ligand-receptor mediated drug targeting	69
1.4.5. Protein and peptide delivery systems	70

1.4.5.1. Barriers of protein and peptide delivery	70
A. Physical barriers: size, charge and solubility constraints	70
B. Enzymatic barriers	70
1.4.5.2. Strategy for peptide delivery	74
A. Chemical modification	74
B. Protease inhibitors co-administration	76
C. Absorption enhancers	77
D. Formulation vehicles	79
1. Emulsions	79
2. Hydrogels	80
3. Polymeric Particulate Systems	81
4. Nanovesicles	81
E. Cell penetrating peptides (CPPs)	82
1.4.6. Protein expression	82
1.4.6.1. Fundamental techniques	82
A. Polymerase chain reaction (PCR)	82
B. Agarose gel electrophoresis	87
C. SDS-PAGE	88
D. Western blot analysis	90
1.4.6.2. Generation of expression plasmids	91
A. Multi-parallel molecular cloning strategies	91
B. Choice of tag	93

1.4.6.3. Expression system	95
A. <i>Escherichia coli</i> -mediated protein expression	95
B. Baculovirus-mediated insect cell protein expression	96
C. Other expression systems	97
1.4.6.4. Protein purification	99
Chapter 2 Materials and methods	
2.1. Materials and equipments	100
2.1.1. Chemicals	100
2.1.2. Animals	102
2.1.3. Cell lines, bacterial cultures and plasmids	102
2.1.4. Equipments	102
2.2 Methods	105
Part 1 : Construction of GFP, Tat/GFP, VP/GFP and VP/Tat/GFP fusion proteins expression plasmid	106
1.1. Primer design	106
1.2. Amplification of genes encoding GFP or fusion protein	107
1.3. Linearization of pET28a(+) expression vector and PCR fragment digestion	107
1.4. Ligation reaction	108

Part 2 : Expression and purification of GFP, Tat/GFP, VP/GFP and VP/Tat/GFP fusion protein	109
2.1. Transformation	109
2.2. Protein expression	110
2.3. Purification and analysis	110
2.3.1. Ni-NTA purification	110
2.3.2. SDS-PAGE and western blot analysis	111
2.3.3. Protein concentration determination by Bradford method	112
2.3.4. Fluorescent intensity measurement	113
Part 3 : Cellular uptake of GFP, Tat/GFP, VP/GFP and VP/Tat/GFP fusion proteins	113
3.1. Cell culture	113
3.2. Cellular uptake study	113
Part 4 : Cellular uptake efficiency enhancement strategy	114
4.1. Entrapment in nanovesicles	114

4.1.1. Preparation of the empty nanovesicles (liposomes/niosomes)	115
4.1.2. Physical properties	115
determination of nanovesicular formulations	
A. Mean particle sizes and zeta potential	116
B. Entrapment efficiency of Tat-GFP loaded in nanovesicles	116
C. Deformability index (DI) determination	117
4.1.3. Cellular uptake study of Tat- GFP loaded nanovesicles	117
4.1.4. Chemical stability	117
determination of Tat-GFP loaded nanovesicles	
4.1.5. Cytotoxicity of nanovesicular formulations by the SRB assay	118
4.1.6. Development of low toxic elastic anionic niosomes	118
4.1.7. Transdermal absorption study	119

A. Preparation of rat skin	119
B. Transdermal absorption experiment	120
4.2. Tat/GFP, VP/GFP and VP/Tat/GFP mixture	121
4.2.1. Evaluation of simple mixing method as cargoes transport strategy	121
A. Cellular uptake study	121
B. Transepithelial study	121
C. Transdermal delivery through rat skin	122
4.2.2. Tat/GFP, VP/GFP and VP/Tat/GFP mixture preparation	122
4.2.3. Cellular uptake study of Tat/GFP, VP/GFP and VP/Tat/GFP mixture	123
Part 5 : <i>In vitro</i> calcitonin activity study of Tat/sCT, VP/sCT and VP/Tat/sCT mixture	123
5.1. Mixture preparation	123
5.2. Physical properties of mixture	123
5.2.1. Size and zeta potential determination	124

5.2.2. Differential scanning calorimetry (DSC)	124
5.2.3. Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)	124
5.3. <i>In vitro</i> calcitonin activity experiment	124
5.4. Determination of poliovirus receptor (PVR) expression	125
Part 6 : <i>In vivo</i> calcitonin activity of Tat/sCT, VP/sCT and VP/Tat/sCT mixture	126
6.1. Animals	126
6.2. Subcutaneous administration of sCT	126
6.3. Oral administration of Tat/sCT, VP/sCT and VP/Tat/sCT mixture	126
6.4. Transdermal absorption of sCT and Tat/sCT at 1:1 molar ratio	127
6.5. Chemical stability of sCT and Tat/sCT mixture	127
 Chapter 3 Results and discussion	
Part 1 : Construction of GFP, Tat/GFP, VP/GFP and VP/Tat/GFP fusion protein expression plasmid	129

1.1. Amplification of genes encoding GFP, Tat/GFP, VP/GFP and VP/Tat/GFP	129
1.2. Construction of GFP, Tat/GFP, VP/GFP and VP/Tat/GFP fusion protein expression vectors	131
Part 2 : Expression and purification of GFP, Tat/GFP, VP/GFP and VP/Tat/GFP fusion protein	134
2.1. Transformation of expression vectors and colony screening	134
2.2. Protein expression and purification	136
2.2.1. Target protein verification for expression level and solubility	136
2.3. Analysis of purified proteins	136
Part 3 : Cellular uptake of GFP, Tat/GFP, VP/GFP and VP/Tat/GFP fusion protein	140
Part 4 : Cellular uptake efficiency enhancement strategy	145
4.1. Entrapment in nanovesicles	146
4.1.1. Preparation and physical properties determination of nanovesicular formulations (liposomes/niosomes)	146
A. Mean particle sizes and zeta potential	146

B. Entrapment efficiency of Tat-GFP loaded in nanovesicles	147
C. Deformability index (DI) determination	150
4.1.2. Cellular uptake and cytotoxicity of Tat-GFP loaded nanovesicles	151
4.1.3. Chemical stability determination of Tat-GFP loaded nanovesicles	154
4.1.4. Development of low toxic elastic anionic niosomes	156
4.1.5. Cellular uptake and cytotoxicity	160
4.1.6. Transdermal absorption study	161
4.2. Tat/GFP, VP/GFP and VP/Tat/GFP mixture	164
4.2.1. Evaluation of simple mixing method as cargoes transport strategy	164
4.2.2. Cellular uptake study of Tat/GFP, VP/GFP and VP/Tat/GFP mixture	169
Part 5 : <i>In vitro</i> calcitonin activity of Tat/sCT, VP/sCT and VP/Tat/sCT mixture	170
5.1. Physical properties of the mixture	170
5.1.1. Sizes and zeta potential determination	170

5.1.2. Differential scanning calorimetry (DSC) and Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)	172
5.2. <i>In vitro</i> calcitonin activity experiment	181
Part 6 : <i>In vivo</i> calcitonin activity of Tat/sCT, VP/sCT and VP/Tat/sCT mixtures	182
6.1. Subcutaneous administration of sCT	182
6.2. Oral administration of Tat/sCT, VP/sCT and VP/Tat/sCT mixtures	184
6.3. Transdermal absorption of sCT and Tat/sCT at 1:1 molar ratio	186
6.4. Chemical stability of sCT and Tat/sCT mixture	190
Chapter 4 Conclusion	
Part 1 : Construction of GFP, Tat/GFP, VP/GFP and VP/Tat/GFP fusion protein expression plasmid	192
Part 2 : Expression and purification of GFP, Tat/GFP, VP/GFP and VP/Tat/GFP fusion protein	192
Part 3 : Cellular uptake of GFP, Tat/GFP, VP/GFP	193
Part 4 : Cellular uptake efficiency enhancement strategy	194
4.1. Entrapment in nanovesicles	194

4.2. Tat/GFP, VP/GFP and VP/Tat/GFP mixture	195
Part 5 : <i>In vitro</i> calcitonin activity of Tat/sCT, VP/sCT and VP/Tat/sCT mixture	196
Part 6 : <i>In vivo</i> calcitonin activity of Tat/sCT, VP/sCT and VP/Tat/sCT mixture	197
References	200
Appendices	234
Appendix A Chemical and physical properties of substances used in this study	235
Appendix B Plasmid map	242
Appendix C Formulation of buffer and solution used in this study	244
Appendix D Amino acids sequence of GFPmut2	246
Appendix E Calculation of nanovesicle compositions	247
Curriculum vitae	249

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Nucleotide and amino acid sequence of GFP of wild-type <i>Aequorea victoria</i>	8
2	Selection of the commonly used CPPs	27
3a	Bond specificities of secreted peptidases	72
3b	Intestinal brush-border membrane-bound peptidases	72
4	Comparison of commonly used tags for purification and expression enhancement	94
5	The amount of each component (μ l) in PCR reaction	108
6	Vesicular sizes (nm) and zeta potential (mV) of the blank and Tat-GFP loaded nanovesicles	148
7	Entrapment efficiency of Tat-GFP fusion protein in various nanovesicular formulations	149
8	Deformability index (DI) and the DI ratios of the blank nanovesicles	151
9	Cellular uptake of Tat-GFP fusion protein and cell viability of HT-29 cells after incubated with various nanovesicular formulations	153
10	Vesicle sizes, zeta potential and DI of blank elastic and non-elastic anionic niosomes containing ethanol, NaC or NaDC at various concentrations	157

11	Entrapment efficiencies of Tat-GFP loaded in different elastic vesicular formulations	159
12	Cellular uptake and cytotoxicity of Tat-GFP loaded in elastic and non-elastic niosomes in HT-29 and KB cells	162
13	The cumulative amounts ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) and fluxes ($\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$) of GFP and Tat-GFP from various systems in SC, VED and receiver compartment following transdermal absorption across excised rat skin at 6 hours by vertical Franz diffusion cells	163
14	Transdermal absorption across excised rat skin of GFP, Tat-GFP fusion protein and Tat/GFP mixture at 6 hours in stratum corneum (SC), viable epidermis and dermis (VED) and receiver compartment of vertical Franz diffusion cells	168
15	Particle sizes (nm) and zeta potential (mV) of sCT, Tat, VP and Tat/VP/sCT mixtures at various molar ratios	174
16	Percentage remaining of sCT in sCT solution and Tat/sCT mixture after 1 month storage at different temperatures	191
D	Amino acid sequences of GFPmut2 (237 amino acids)	247

E	Amounts of the composition in the prepared nanovesicles	248
---	--	-----

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	Bioluminescence in <i>Aequorea victoria</i>	7
2	Solid-state structures of GFP, the chromophore is located in the center of the 11-sheet β -barrel	9
3	The amino acid sequences of salmon calcitonin	18
4	Proposed mechanisms of cellular delivery of cargos mediated by cell penetrating peptides (CPP)	29
5	Proposed models for MPG-mediated membrane translocation of nucleic acids (A) and model of Pep-1-mediated transfer of proteins through lipid bilayers (B)	31
6	Utility of protein transduction technology	38
7	Genomic organization and proteolytic processing of poliovirus	53
8	Hypothesis for poliovirus transport through the axon. Human poliovirus receptor (hPVR)-mediated endocytosis occurs at synapses	64
9	The mature structure of human PV receptor (hCD155)	65
10	The footprint of the CD155 on the PV surface	66

11	Structures of “carrier” molecules used for enhancing oral bioavailability of protein and peptide drugs	80
12	Schematic drawing of the PCR cycle	90
13	Agarose electrophoresis of (A) pET28a(+) digested with HpaI (lane 1), pET28a(+)GFP digested with HpaI (lane 2), pET28a(+)GFP-Tat digested with HpaI	90
14	Scope of the study	105
15	Experimental set-up of Franz diffusion cell apparatus	121
16	PCR product of GFP (A) and GFP-Tat (B)	130
17	PCR product of VP-GFP	130
18	Agarose electrophoresis of (A) 1 kb DNA ladder (lane 1), linearized pET28a(+) (lane 2), digested GFP (lane 3) and digested GFP-Tat (lane 4) (B) 1 kb DNA ladder (lane 1), linearized pET28a(+) (lane 2) and digested Tat-GFP	131
19	Agarose electrophoresis of linearized pET28a(+) (lane 1), digested VP-GFP (lane 2) and digested Tat-GFP-VP (lane 3)	132
20	Agarose electrophoresis of ligation products (A) pET28a(+)GFP (lane 1; 6059 bp), pET28a(+)GFP-Tat (lane 2; 6086 bp) and 1 kb DNA ladder. (B) 1 kb DNA ladder (lane 1), pET28a(+)Tat-GFP (lane 2; 6086 bp) and pET28a(+) (lane 3; 5369 bp)	132

- 21 Agarose electrophoresis of ligation products (A) VC 133
1 kb DNA ladder (lane 1) and pET28a(+)VP-GFP
(lane 2; 6110 bp) (B) VC 1 kb DNA ladder (lane 1)
and pET28a(+)Tat-GFP-VP (lane 2; 6137 bp)
- 22 Agarose electrophoresis of (A) pET28a(+) digested 133
with HpaI (lane 1), pET28a(+)GFP digested with
HpaI (lane 2), pET28a(+)GFP-Tat digested
- 23 *E. coli* DH5 α transformed with pET28a(+) (A and 134
G), pET28a(+)GFP (B and H), pET28a(+)GFP-Tat
(C and I), pET28a(+)Tat-GFP (D and J), pET28a(+)VP-GFP (E and K) and pET28a(+)Tat-GFP-VP (F and L). A-F and G-L were captured under transmission light and fluorescent filter, respectively
- 24 SDS-PAGE analysis of the expressed proteins from 137
non-transformed *E. coli* BL21 (DE3) (lane 2), *E. coli*
BL21 (DE3) transformed with pET28a(+) (lane 3), *E. coli*
BL21 (DE3) transformed with pET28a(+)GFP
(lane 4, 6 and 8) and *E. coli* BL21 (DE3) transformed
with pET28a(+)GFP-Tat (lane 5, 7 and 9). Lanes 2-5
were TCP fraction. Lanes 6-7 were soluble cytoplas-
mic fractions. Lanes 8-9 were insoluble cytoplasmic
fractions

- 25 SDS-PAGE analysis of GFP (A) and GFP-Tat (B) 138
expression after IPTG induction at final
concentration 0.1 mM (lane 2), 0.2 mM (lane 3), 0.4
mM (lane 4) and 1 mM (lane 5) for 3 hr
- 26 SDS-PAGE analysis of GFP (A) and GFP-Tat (B) 138
expression after IPTG induction at final
concentration 0.1 mM for 1 hr (lane 2), 2 hr (lane 3),
3 hr (lane 4), 4 hr (lane 5) and 5 hr (lane 6)
- 27 (A) Analysis of the purified GFP (lane 2; ~28 kDa) 139
and GFP-Tat (lane 3; ~30 kDa) and Tat-GFP (lane 4;
~30 kDa) by 12% SDS-PAGE (B) Purified Tat-GFP
(lane 1; ~30 kDa), VP-GFP (lane 2; ~30 kDa) and
Tat-GFP-VP (lane 3; ~32 kDa) resolved in SDS-
PAGE
- 28 Western blot analysis using anti-penta-His-HRP 139
conjugate antibody. M : molecular weight markers, G
: GFP, G-T : GFP-Tat fusion protein, T-G : Tat-GFP
fusion protein
- 29 Fluorescent intensity at various concentrations of 140
GFP, GFP-Tat, Tat-GFP, VP-GFP and Tat-GFP-VP
fusion protein

30	Cellular uptake efficiency represented as percentage of protein detected in HT-29 and KB cells after 1 hour incubation with GFP or Tat/GFP fusion proteins at 1 μ M	141
31	Cellular uptake efficiency of GFP and Tat/GFP fusion proteins in HT-29 cell lines as fluorescent intensity units (rfu) after incubation for 1 hour with various concentrations of GFP, GFP-Tat and Tat-GFP fusion proteins	142
32	The effect of incubation on cellular uptake of GFP and Tat/GFP fusion proteins in HT-29 cell lines. The concentration of all samples was 1 μ M	142
33	CLSM pattern from uptake study of N-terminal 6XHis GFP, GFP-Tat and Tat-GFP	143
34	Cellular uptake efficiency represented as percentage of protein detected in HT-29 and KB cells after 1 hour incubation with GFP or Tat/VP/GFP fusion proteins at 1 μ M	145
35	The percentages of fluorescent signal remaining in comparing to at initial of Tat-GFP loaded in elastic and non-elastic anionic niosomes and the non-loaded Tat-GFP when stored at 30 \pm 2 $^{\circ}$ C for 3 months	155

- 36 The negative staining TEM images of (a) blank elastic anionic niosomes (Tween61/CHL/DP/NaC at 1:1:0.02 molar ratio, 1 mol% NaC) (b) Tat-GFP loaded elastic anionic niosomes 158
- 37 Comparison of cellular uptake at various time intervals of GFP, Tat:GFP fusion protein (Tat-GFP) and mixture (Tat/GFP) into HT-29 cells. The folds of Tat/GFP uptake in comparing to Tat-GFP and GFP at 1 hour were labeled above the bar chart. 165
- 38 Transepithelial permeation of GFP, Tat-GFP and Tat/GFP through HT-29 cells. Percentages of protein in lower chamber comparing with the total protein added into each well were presented. The concentration of all samples was equivalent to 2 μ M of GFP. Tat/GFP at 1:1 molar ratio was used. 166
- 39 Cellular uptake (%) of GFP, mixture of GFP, VP1 BC loop (VP) and Tat into the HT-29 (A) and KB cells (B). The concentration of GFP was 1 μ M at all molar ratio. The molar ratio with the highest GFP uptake in each mixture was specified by asterisk and folds of uptake comparing with GFP were labeled. 171

- 40 Agarose gel electrophoresis of poliovirus receptor (PVR, CD155; 349 bp) transcripts amplified by RT-PCR from KB cells (lane 1) and HT-29 cells (lane 2). Lane 3 was the 100 kb DNA ladder. 172
- 41 Differential scanning calorimetry (DSC) thermograms of sCT (A), Tat (B) VP (C), Tat/sCT mixture (D), VP/sCT mixture (E) and VP/Tat/sCT mixture (F) 175
- 42 FT-IR spectra of sCT (A), Tat (B) VP (C), Tat/sCT mixture (D), VP/sCT mixture (E) and VP/Tat/sCT mixture (F) 178
- 43 Relative intracellular calcium (%) after incubation with sCT (fixed concentration 100 pg/ml), Tat (61.22 pg/ml), VP (61.22 pg/ml) and Tat/VP/sCT mixtures at various molar ratios. The direction of particle size increasing was indicated by arrow. 183
- 44 Relative serum calcium level in: **A.** Subcutaneous administration of sCT at various doses of 10, 50, 100, 250 and 500 µg/kg. **B.** Oral administration of sCT, Tat, VP at 32 µg/kg (3.64 µM) and the mixtures containing sCT equivalent to 50 µg/kg. 185

45	Cumulative amounts ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) and fluxes ($\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{hr}$) of sCT of each sample in VED and receiver compartment solution at 1, 3 and 6 hour	189
46	Percentages of sCT (%) detected in each compartment at various time intervals calculated from the initial sCT concentration in the sample (2.5 mg/ml)	190
B.1	Restriction sites of the pWH105-gfpmut2 map	242
B.2	Restriction sites of the pET28a(+) map under T7 promoter	243

ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

BSA	Bovine serum albumin
CHL	Cholesterol
CPP	Cell penetrating peptide
DDAB	Dimethyl dioctadecyl ammonium bromide
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DP	Dicetyl phosphate
DPPC	L- alpha -dipalmitoyl phosphatidylcholine
DSC	Differential scanning calorimeter
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FBS	Fetal bovine serum
FDEL	Freeze dried empty liposomes
FT-IR	Fourier-transform infrared
HPLC	High performance liquid chromatography
HRP	Horseradish peroxidase
HT-29	Human colon adenocarcinoma
KB	Human mouth epidermal carcinoma
mV	Millivolt
NaC	Sodium cholate
NaDC	Sodium deoxycholate
nm	Nanometer
PBS	Phosphate-buffered saline

PCR	Polymerase chain reaction
PVR	Poliovirus receptor
SC	Stratum corneum
sCT	Salmon calcitonin
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SRB	Sulforhodamine B
TEM	Transmission electron microscopy
Tween61	Polyoxyethylene sorbitan monostearate
VED	Viable epidermis and dermis
VP	Viral protein
μg	Microgram
μl	Microliter
μM	Micromolar
$^{\circ}\text{C}$	Celcius degree