

50353201 : MAJOR : PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY

KEY WORDS : LIPOSOMES/ GENE CARRIERS/ SURFACTANTS/ CATIONIC POLYMERS

KINGKAN SUBSANTISUK : DEVELOPMENT OF GENE CARRIERS USING LIPOSOMES WITH SURFACTANTS COATED WITH CATIONIC POLYMERS. THESIS

ADVISORS : ASSOC. PROF. PRANEET OPANASOPIT, Ph.D. AND ASSOC. PROF. TANASAIT NGAWHIRUNPAT, Ph.D. 128 pp.

In the present study, two types of liposomes; cationic polymers-coated anionic liposomes and cationic liposomes were prepared by sonication method and studied for their use as gene carriers. The anionic liposomes were composed of egg yolk phosphatidylcholine (EPC) and anionic surfactants i.e. sodium oleate (NaO) or sodium taurocholate (NaT) or zwitterionic surfactant 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) at the molar ratio of 10:1, 10:1.5 and 10:2. Subsequently, these liposomes were coated with cationic polymer chitosan lactate (CSL), methylated *N*-(4-pyridylmethyl) chitosan (TM₆₉-Py₆₂-CS) or polyethylenimine (PEI). In the preparation of cationic liposomes, EPC, cholesterol (Chol) and various cationic surfactants i.e. stearylamine (SA), dodecyl trimethylammonium bromide (DTAB) and cetylpyridinium chloride (CPC) at the molar ratio of 10:2:1, 10:2:2, 10:2:3 and 10:2:4 were used. In the gene delivery study, the liposomes were used to form complexes with plasmid DNA encoding green fluorescent protein (pEGFP-C2) and investigated for their ability to transfect human hepatoma cell lines (Huh-7 cells) compared with PEI and Lipofectamine2000™. The results revealed that all liposomal formulations were able to form complex with DNA depending on the carrier to DNA weight ratios. The liposomes coated with PEI showed higher transfection efficiency than that coated with TM₆₉-Py₆₂-CS or CSL. While the transfection efficiency of PEI-coated anionic liposomes was significantly higher than that of the PEI/DNA complexes, and the liposomes coated with TM₆₉-Py₆₂-CS or CSL showed lower transfection efficiency than the cationic polymer/DNA complexes. Among PEI-coated liposomes, the formulations which were prepared by using NaO as surfactant showed higher transfection efficiency than those using NaT or CHAPS. The complexes of PEI coated-liposomes were EPC:NaO (10:2) liposomes at the weight ratio of 0.5 > EPC:CHAPS (10:2) liposomes at the weight ratio of 0.75 > EPC:NaT (10:1.5) liposomes at the weight ratio of 0.75. In case of cationic liposomes, only EPC:Chol:SA liposomes/DNA complexes showed gene expression and the highest transfection efficiency was thus obtained at the molar ratio of 10:2:4. All liposomal formulations had lower cytotoxicity than PEI. PEI coated NaO-liposomes had the highest transfection and low cytotoxicity, suggesting that these formulations have the potential to be used as effective and safe gene delivery carrier.

Program of Pharmaceutical Technology Graduate School, Silpakorn University Academic Year 2008

Student's signature

Thesis Advisors' signature 1. 2.

50353201 : สาขาวิชาเทคโนโลยีเกษตรกรรม

คำสำคัญ : ลิโปโซม/ ตัวพาหีน/ สารลดแรงตึงผิว/ พอลิเมอร์ประจุบวก

กึ่งกาญจน์ สืบสันติสุข : การพัฒนาตัวพาหีนโดยใช้ลิโปโซมร่วมกับสารลดแรงตึงผิวเคลือบด้วยพอลิเมอร์ประจุบวก. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : รศ.ดร. ประณีต โอปณะโสภิต และ รศ.ดร. ธนะเศรษฐ์ จ้าวหิรัญพัฒน์. 128 หน้า.

ในการศึกษากครั้งนี้เตรียมลิโปโซมสองชนิดคือลิโปโซมประจุลบซึ่งเคลือบด้วยพอลิเมอร์ประจุบวกและลิโปโซมประจุบวกเตรียมโดยวิธีลดขนาดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงและศึกษาการเป็นตัวนำส่งยีนของลิโปโซม ลิโปโซมประจุลบประกอบด้วยฟอสฟาทีดิลโคลีนจากไข่แดง (EPC) และสารลดแรงตึงผิวประจุลบ ได้แก่ โซเดียมโอเลต (NaO) หรือโซเดียมทอโรโคลเลต (NaT) หรือสารลดแรงตึงผิวที่มีทั้งประจุบวกและลบ ได้แก่ 3-[(3-โคลลามิโดโพรพิล)-โดเมทริลแอมโมนิโอ]-1-โพรเพนซัลโฟเนต (CHAPS) ที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 10:1, 10:1.5 และ 10:2 นำลิโปโซมประจุลบเหล่านี้มาเคลือบด้วยพอลิเมอร์ประจุบวก คือ ไคโตซานแลคเตต (CSL), เมธิลเตต เอ็น(-4-ไพริดีลเมทริล) ไคโตซาน (TM₆₉-Py₆₂-CS) หรือพอลิเอทิลีนอิมิน (PEI) ในการเตรียมลิโปโซมประจุบวกประกอบด้วย EPC, คอเลสเตอรอล (Chol) และสารลดแรงตึงผิวประจุบวกชนิดต่างๆ ได้แก่ สเตียริลเอมีน (SA), โดเดซิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (DTAB) และ เซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์ (CPC) ที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 10:2:1, 10:2:2, 10:2:3 และ 10:2:4 ในการศึกษาการนำส่งยีนนั้นทำโดยนำลิโปโซมมาทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับดีเอ็นเอที่สามารถแปลรหัสได้เป็น green fluorescent protein (pEGFP-C2) และศึกษาประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้คือ human hepatoma cell lines (Huh7 cells) เปรียบเทียบกับ PEI และไลโปเฟคตามีน ผลการศึกษาพบว่าลิโปโซมทุกตัวรับสามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับดีเอ็นเอได้ขึ้นกับอัตราส่วนโดยน้ำหนักของตัวพาหต่อดีเอ็นเอ ลิโปโซมซึ่งเคลือบด้วย PEI จะให้ประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนสูงกว่าการเคลือบด้วย TM₆₉-Py₆₂-CS หรือ CSL ประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีนของลิโปโซมซึ่งเคลือบด้วย PEI สูงกว่าสารประกอบเชิงซ้อนของ PEI กับดีเอ็นเออย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ลิโปโซมซึ่งเคลือบด้วย TM₆₉-Py₆₂-CS หรือ CSL จะให้ประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีนต่ำกว่าสารประกอบเชิงซ้อนของพอลิเมอร์ประจุบวกกับดีเอ็นเอ ในกลุ่มลิโปโซมซึ่งเคลือบด้วย PEI ตัวรับที่เตรียมโดยใช้ NaO เป็นสารลดแรงตึงผิวจะให้ประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนสูงกว่าตัวรับที่เตรียมจาก NaT หรือ CHAPS สารประกอบเชิงซ้อนของลิโปโซมซึ่งเคลือบด้วย PEI ซึ่งเตรียมจาก EPC:NaO = 10:2 ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนัก 0.5 > EPC:CHAPS = 10:2 ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนัก 0.75 > EPC:NaT = 10:1.5 ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนัก 0.75 ในกรณีของลิโปโซมประจุบวกพบว่าสารประกอบเชิงซ้อนของ EPC:Chol:SA ลิโปโซมกับดีเอ็นเอเท่านั้นที่เกิดการแสดงออกของยีนและให้ประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีนสูงสุดที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 10:2:4 ลิโปโซมทุกตัวรับมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำกว่า PEI โดยที่ NaO ลิโปโซมซึ่งเคลือบด้วย PEI จะให้ประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีนสูงสุดและมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ แสดงให้เห็นว่าลิโปโซมตัวรับนี้เป็นตัวพาหีนที่มีประสิทธิภาพและมีความปลอดภัย

สาขาวิชาเทคโนโลยีเกษตรกรรม

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2551

ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ 1. 2.