

ผลของตัวแปรสูตรคาร์บอเนตคุณสมบัติทางกายภาพและประสิทธิภาพในการแทนส์เฟกชัน
ของโคโคซาน-ดีเอ็นเอ นาโนพาร์ทิเคิล

นางสาวอรติดา ศิริบรรจง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชอุตสาหกรรม ภาควิชาเภสัชอุตสาหกรรม
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



4 8 7 6 6 2 2 8 3 3

**EFFECT OF FORMULATION VARIABLES ON PHYSICAL PROPERTIES AND
TRANSFECTION EFFICIENCY OF CHITOSAN-DNA NANOPARTICLES**

Miss Ornsita Siribunchong

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy Program in Industrial Pharmacy**

Department of Manufacturing Pharmacy

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

502125

อรลิตา ศิริบรรจง : ผลของตัวแปรสูตรตำรับต่อคุณสมบัติทางกายภาพและประสิทธิภาพในการแทรกนํสเฟกซันของไคโตซาน-ดีเอ็นเอ นาโนพาร์ทิเคิล. (EFFECT OF FORMULATION VARIABLES ON PHYSICAL PROPERTIES AND TRANSFECTION EFFICIENCY OF CHITOSAN-DNA NANOPARTICLES) อ. ที่ปรึกษา : ศ.ดร.กาญจน์พิมล ฤทธิเดช, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร.วิมลมาศ ลิปิพันธ์, 103 หน้า.

งานวิจัยนี้ เตรียมไคโตซาน-ดีเอ็นเอ นาโนพาร์ทิเคิล ด้วยวิธี complex coacervation และศึกษาผลของตัวแปรสูตรตำรับ ได้แก่ ตัวทำละลายของไคโตซาน ตัวทำละลายของดีเอ็นเอ และ อัตราส่วนของไนโตรเจนต่อฟอสเฟต ต่อคุณสมบัติทางกายภาพ และประสิทธิภาพในการแทรกนํสเฟกซันของนาโนพาร์ทิเคิล พบว่าขนาดอนุภาคของพาร์ทิเคิลลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเพิ่มอัตราส่วนของไนโตรเจนต่อฟอสเฟต แล้วคงที่อยู่ในช่วง 102-278 นาโนเมตร และประจุที่พื้นผิวอนุภาคเพิ่มขึ้นจากค่าลบเป็นค่าบวกเมื่อเพิ่มอัตราส่วนของไนโตรเจนต่อฟอสเฟต แล้วคงที่อยู่ในช่วง +7.70 ถึง +33.53 มิลลิโวลต์ จากการศึกษาพบว่า ตัวทำละลายของไคโตซาน ตัวทำละลายของดีเอ็นเอ และ อัตราส่วนของไนโตรเจนต่อฟอสเฟตมีผลต่อขนาดอนุภาคและประจุที่พื้นผิวอนุภาค ผลจากการศึกษาเมื่อใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านศึกษารูปร่างของไคโตซาน-ดีเอ็นเอ นาโนพาร์ทิเคิล พบว่าอนุภาคส่วนใหญ่มีรูปร่างเป็นทรงกลม และบางอนุภาคเป็นทรงรี เมื่อศึกษาการเคลื่อนที่ของอนุภาคในสนามไฟฟ้า พบว่าการประกอบเป็นนาโนพาร์ทิเคิลเกิดขึ้นตั้งแต่อัตราส่วนของไนโตรเจนต่อฟอสเฟต 0.5:1 ถึง 7:1 และนาโนพาร์ทิเคิลสามารถป้องกันดีเอ็นเอจากการถูกทำลายโดยเอนไซม์ดีออกซีไรโบนิวคลีเอสได้ จากการศึกษาโดยใช้ flow cytometer และกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ พบว่าประสิทธิภาพในการแทรกนํสเฟกซันของนาโนพาร์ทิเคิลใน HeLa cells มากกว่าของดีเอ็นเอ และมีค่าใกล้เคียงกับ Lipofectamine™ Reagent ซึ่งเป็นตัวควบคุมทางบวก นอกจากนี้ยังพบว่าตัวทำละลายของดีเอ็นเอ และ อัตราส่วนของไนโตรเจนต่อฟอสเฟตมีผลต่อประสิทธิภาพในการแทรกนํสเฟกซันของนาโนพาร์ทิเคิล เมื่อศึกษาความสามารถในการมีชีวิตอยู่ของ HeLa cells โดยวิธี MTT พบว่าไคโตซานไม่มีผลต่อการมีชีวิตอยู่ของเซลล์

ภาควิชา เกษษุศตสาหกรรม
สาขาวิชา เกษษุศตสาหกรรม
ปีการศึกษา 2550

ลายมือชื่อนิสิต..... *อรลิตา ศิริบรรจง*
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... *พญ. น.*
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... *วิมลมาศ ลิปิพันธ์*

4876622833 : MAJOR MANUFACTURING PHARMACY

KEY WORD: gene delivery / chitosan / transfection efficiency

ORNSITA SIRIBUNCHONG : EFFECT OF FORMULATION VARIABLES ON
PHYSICAL PROPERTIES AND TRANSFECTION EFFICIENCY OF CHITOSAN-
DNA NANOPARTICLES THESIS ADVISOR : PROF. GARNPIMOL C. RITTHIDEJ,
Ph.D., THESIS COADVISOR : ASSOC. PROF. VIMOLMAS LIPIPUN, Ph.D. , 103 pp.

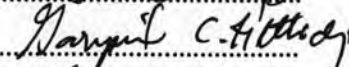
Chitosan-pDNA nanoparticles were prepared by using complex coacervation method. The effect of formulation variables, medium of chitosan, medium of pDNA and N/P ratio, on physical properties and transfection efficiency were examined. The particle size of the nanoparticles sharply decreased with increasing N/P ratio and became stable to constant value of 102-278 nm with PI in the range of 0.20-0.51. The zeta potential increased from negative charge to positive charge with increasing N/P ratio and finally increased to constant value in the range of +7.70 to +33.53 mV. The particle size and zeta potential were affected by all experimental variables. TEM images of nanoparticles showed that most nanoparticles had spherical shape, while a few particles had rod shape. The electrophoretic mobility analysis showed that the nanoparticles formation occurred at N/P ratio from 0.5:1 to 7:1 and the nanoparticles could render protection from deoxyribonuclease to pDNA. Flow cytometry and fluorescence microscopy were used to evaluate *in vitro* transfection efficiency in HeLa cells. The *in vitro* transfection efficiency of chitosan-pDNA nanoparticles was higher than that of naked pDNA and comparable to the positive control, Lipofectamine™ Reagent. The N/P ratio and medium of pDNA affected transfection efficiency. MTT assay used in cell viability study demonstrated that chitosan did not affect the viability of HeLa cells.

Department Manufacturing Pharmacy

Field of study Industrial Pharmacy

Academic year 2007

Student's signature.....

Advisor's signature.....

Co-advisor's signature.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to express my infinite gratitude and deep appreciation to my thesis advisor, Professor Dr. Garmpimol C. Ritthidej and my thesis co-advisor, Associate Professor Dr. Vimolmas Lipipun, for their guidance, suggestion, kindness, encouragement, and valuable help throughout my research study. They always stand beside me to help, be consulted, and advise me in every way that would bring me success and great development.

I would like to express my sincere gratitude and deep appreciation to Associate Professor Dr. Krairri Umprayn, Assistant Professor Dr. Nontima Vardhanabhuti and Dr. Narueporn Sutanthavibul for their kindness and helpful suggestion for the completion of this thesis:

I also would like to express my sincere thanks to all staffs in the Department of Manufacturing Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for their kindness and valuable help during my study.

I wish to express my sincere appreciation to the Department of Manufacturing Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for providing facilities during my study.

Finally, special gratitude is extended to my dear parents and my family for their love, understanding, helpful and continuous supports all my life.

CONTENTS

	PAGE
ABSTRACT (THAI).....	iv
ABSTRACT (ENGLISH).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	x
LIST OF FIGURES.....	xi
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xiii
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
CHAPTER II LITERATURE REVIEW.....	3
1. Gene therapy.....	3
2. Gene delivery system.....	6
2.1 Viral gene delivery.....	8
2.2 Non-viral gene delivery.....	9
2.2.1 Cationic phospholipids.....	10
2.2.2 Cationic polymers.....	11
3. Chitosan.....	14
4. Nanoparticulate system.....	19
5. Chitosan for gene delivery.....	20
6. Characteristics and toxicity of acids.....	22
6.1 Acetic acid.....	22
6.2 Lactic acid.....	22
6.3 Glycolic acid.....	23
CHAPTER III MATERIALS AND METHODS.....	24
1. Plasmid DNA and preparation of plasmid DNA.....	26
2. Preparation of chitosan-pDNA nanoparticles.....	27
3. Physical properties measurement of chitosan-pDNA nanoparticles.....	28
3.1 Measurement of particle size, PI and zeta potential.....	28
3.2 Morphological observation.....	28

	PAGE
4. Gel retardation assay.....	28
5. Protection effect of nanoparticles to pDNA.....	29
6. Cell line and cell culture.....	30
7. <i>In vitro</i> transfection in HeLa cells.....	30
7.1 Transfection with naked pDNA and chitosan-pDNA nanoparticles...30	
7.2 Transfection with Lipofectamine TM -pDNA complexes.....30	
8. Analysis of <i>in vitro</i> transfection efficiency.....	31
8.1 Fluorescence microscopy.....	31
8.2 Flow cytometry.....	31
9. Cell viability tests.....	31
CHAPTER IV RESULTS AND DISCUSSION.....	33
1. Plasmid DNA and preparation of plasmid DNA.....	33
2. Preparation of chitosan-pDNA nanoparticles.....	33
3. Effect of formulation variables on physical properties of chitosan-pDNA nanoparticles.....	34
3.1 Effect on particle size, PI and zeta potential of the nanoparticles.....	34
3.2 Effect on morphology of the nanoparticles.....	44
4. Gel retardation assay.....	47
5. Protection effect of nanoparticles to pDNA.....	48
6. Effect of formulation variables on <i>in vitro</i> transfection efficiency of chitosan-pDNA nanoparticles.....	53
6.1 Fluorescence microscopy.....	53
6.2 Flow cytometry.....	55
7. Cell viability.....	58
7.1 Cell viability of HeLa cells incubated with various concentration of chitosan and Lipofectamine TM Reagent.....	59
7.2 Cell viability of HeLa cells incubated with the medium of selected formulations.....	60
7.3 Cell viability of HeLa cells incubated with the nanoparticles of the selected formulations and Lipofectamine TM -pDNA complexes.....	61

	PAGE
REFERENCES.....	66
APPENDICES.....	75
APPENDIX A.....	76
APPENDIX B.....	83
APPENDIX C.....	92
APPENDIX D.....	95
BIOGRAPHY.....	101

LIST OF TABLES

TABLE	PAGE
1. Particle size, PI and zeta potential of chitosan-pDNA nanoparticles	35

LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
1. Schematic representation of gene delivery system.....	7
2. Structure of chitosan.....	15
3. Molecular structure of acetic acid, lactic acid and glycolic acid.....	23
4. Particle size of chitosan-pDNA nanoparticles at varying N/P ratios.....	36
5. Zeta potential of chitosan-pDNA nanoparticles at varying N/P ratios.....	39
6. Particle size and zeta potential at varying N/P ratios of the CSA nanoparticles.....	41
7. Particle size and zeta potential at varying N/P ratios of the CSL nanoparticles.....	42
8. Particle size and zeta potential at varying N/P ratios of the CSG nanoparticles.....	43
9. TEM image of 5:1 CSA/DNA S nanoparticles.....	45
10. TEM image of 2:1 CSA/DNA S nanoparticles.....	45
11. TEM image of 2:1 CSA/DNA C nanoparticles.....	46
12. TEM image of 2:1 CSA/DNA W nanoparticles.....	46
13. Electrophoretic mobility analysis of naked pDNA and CSA/DNA S nanoparticles at varying N/P ratios.....	47
14. Electrophoretic mobility analysis of the digestion of 2:1 CSA/DNA S nanoparticles with digestion 1, 2 and 3.....	49
15. Electrophoretic mobility analysis of 2:1, 3:1, 5:1 and 7:1 CSA/DNA S nanoparticles following DNase I digestion and chitosan digestion.....	51
16. Electrophoretic mobility analysis of the nanoparticles formulated at N/P ratio of 2:1 following DNase I digestion and chitosan digestion.....	52
17. The image of HeLa cells under fluorescence microscope after incubated with naked pDNA, 5:1 CSA/DNA S nanoparticles and Lipofectamine TM -pDNA complexes.....	54
18. <i>In vitro</i> transfection efficiency of chitosan-pDNA nanoparticles formulated at N/P ratio of 2:1 was shown as percentage of positive cells compared with negative control and positive control.....	56
19. <i>In vitro</i> transfection efficiency of the 2:1, 3:1 5:1 and 7:1 CSA/DNA S nanoparticles was shown as percentage of positive cells compared with negative control and positive control.....	58

FIGURE	PAGE
20. % Cell viability of HeLa cells incubated with various concentration of chitosan and Lipofectamine TM Reagent.....	59
21. % Cell viability of HeLa cells incubated with medium of selected formulations.....	60
22. % Cell viability of HeLa cells incubated with the nanoparticles of selected formulations and Lipofectamine TM -pDNA complexes.....	61

LIST OF ABBREVIATIONS

A	=	acetic acid
ADA	=	adenosine deaminase
AIDS	=	acquired immunodeficiency syndrome
C	=	sodium chloride
CF	=	cystic fibrosis
CO ₂	=	carbondioxide
CSA	=	chitosan in acetic acid
CSG	=	chitosan in glycolic acid
CSL	=	chitosan in lactic acid
CTCR	=	cystic transmembrane conductance regulator
°C	=	degree celcius
DC-Chol	=	3,[N-(N ¹ ,N-dimethylehtylenediamine)-carbamoyl]cholesterol
DMEM	=	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DNA	=	deoxyribonucleic acid
DNA C	=	pDNA in sodium chloride
DNA S	=	pDNA in sodium sulfat
DNase	=	deoxyribonuclease
DNA W	=	pDNA in water
DOFS	=	dioctadecyl amino glycil spermine
DOSPA	=	2,3-dioleoyloxy-N-[2-(sperminecarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium chloride
DOTAP	=	1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium propane
DOTMA	=	N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride
EDTA	=	ethylene diamine tetra acetate
FBS	=	foetal bovine serum
g	=	gram
G	=	glycolic acid

HIV	=	human immunodeficiency virus
HMG1	=	high-mobility group protein
Kb	=	kilobasepair
kDa	=	kilodalton
kg	=	kilogram
L	=	lactic acid
LD ₅₀	=	median lethal dose
LF	=	Lipofectamine TM Reagent
mg	=	milligram
µg	=	microgram
µl	=	microliter
min	=	minute
ml	=	milliliter
mM	=	millimolar
MTT	=	thiazoyl blue tetrazolium bromide
mV	=	millivolt
nm	=	nanometer
N/P ratio	=	amino group to phosphate group ratio
PBS	=	phosphate buffered saline
PCS	=	photon correlation spectroscopy
PDMAEMA	=	poly(2-(dimethylamino)ethyl)methacrylate
pEGFP-C2	=	Plasmid Enhanced Green Fluorescence Protein-C2
PEI	=	polyethyleneimine
PI	=	polydisperse index
PLL	=	polylysine
RES	=	reticuloendothelial system
RNA	=	ribonucleic acid
RNase	=	ribonuclease
rpm	=	round per minute
S	=	sodium sulfite

SCID	=	severe combined immunodeficiency disease
SD	=	standard deviation
SDS	=	sodium dodecyl sulfate
TAE	=	Tris/acetic acid/EDTA
TEM	=	transmission electron microscopy
U	=	unit
UV	=	ultraviolet
W	=	water