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

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

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 μM) 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±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±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±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±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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

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±0.57% and 172.14±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 µg/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±2°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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

remaining of sCT than the sCT solution after the 1 month storage at 4±2, 25±2 and 45±2°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.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การพัฒนาระบบนำส่งประสิทธิภาพสูงของแคลซิโตนินแบบรับประทานโดยใช้ไวรัสลิแกนด์และซีพีพี

ผู้เขียน นางสาว วรางคณา โล่ห์เจริญกาล

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เภสัชศาสตร์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

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

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาระบบนำส่งยาประสิทธิภาพสูงสำหรับการให้แคลซิโตนินโดยการรับประทานด้วยการใช้ส่วนของวีพีจากโปลิโอไวรัสและเปปไทด์นำส่งที่เรียกว่าซีพีพีเพื่อเป็นลิแกนด์สำหรับตัวรับของโปลิโอไวรัสในทางเดินอาหาร และเป็นตัวพาของระบบนำส่งตามลำดับ จีเอฟพีใช้เป็นโปรตีนตัวติดตาม (รีพอร์ตเตอร์) ในขั้นตอนของการพัฒนาระบบนำส่ง พลาสมิด 5 ตัวของจีเอฟพีและฟิวชั่นโปรตีนระหว่างแททเปปไทด์กับจีเอฟพีที่ปลายอะมิโน (แทท-จีเอฟพี) และปลายคาร์บอกซี (จีเอฟพี-แทท) ฟิวชั่นโปรตีนระหว่างวีพีเปปไทด์กับจีเอฟพีที่ปลายอะมิโน (วีพี-จีเอฟพี) และฟิวชั่นโปรตีนระหว่างแทท จีเอฟพีและวีพี ได้จากการผลิตในแบคทีเรียอีโคไลสายพันธุ์ BL21 (DE3) ผลของการเชื่อมต่อของโปรตีนนำส่งที่ปลายอะมิโนและปลายคาร์บอกซีต่อประสิทธิภาพของการนำส่งเข้าสู่เซลล์ พบว่าการเชื่อมต่อของแททที่ปลายอะมิโนของจีเอฟพีสามารถนำส่งฟิวชั่นโปรตีนเข้าสู่เซลล์ได้มากกว่าที่ปลายคาร์บอกซี การเชื่อมต่อกับวีพีที่ปลายอะมิโนสามารถนำส่งจีเอฟพีเข้าสู่เซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) และเซลล์มะเร็งลำไส้ (HT-29) ได้น้อยกว่าฟิวชั่นโปรตีนระหว่างแททกับจีเอฟพี นอกจากนั้น การนำส่งเข้าสู่เซลล์ของฟิวชั่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โปรตีนระหว่างแทท จีเอฟพี และวีพีก็น้อยกว่าฟิวชั่นโปรตีนระหว่างแททกับจีเอฟพีและวีพีกับจีเอฟพี ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม่มีการเสริมฤทธิ์กันระหว่างการนำส่งจีเอฟพีด้วยแททและวีพี เนื่องจากประสิทธิภาพสูงสุดในการนำส่งจีเอฟพีเข้าสู่เซลล์ของแทท-จีเอฟพียังมีค่าต่ำกว่า 6% ของปริมาณเริ่มต้นซึ่งไม่เพียงพอต่อการนำไปใช้เป็นระบบนำส่งยา ดังนั้นจึงได้นำเทคนิคการเก็บกักในถุงขนาดนาโนและการเตรียมของผสมมาประยุกต์ ได้เตรียมไลโปโซมและนีโอโซมทั้งชนิดไม่มีประจุ ประจุบวกและประจุลบโดยวิธีการแบบทำให้แห้ง (FDEL) ไลโปโซมชนิดไม่มีประจุ ประจุบวกและประจุลบประกอบด้วย ดีพีพีซี/ คอเลสเตอรอล, ดีพีพีซี/คอเลสเตอรอล/ดีดีเอบีและดีพีพีซี/คอเลสเตอรอล/ไดซิติลฟอสเฟต ที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 7:3, 7:2:1 และ 7:2:1 ส่วนนีโอโซมประกอบด้วย ทวีน61/คลอเลสเตอรอล, ทวีน61/คลอเลสเตอรอล/ดีดีเอบีและทวีน61/คลอเลสเตอรอล/ไดซิทิลฟอสเฟต ที่อัตราส่วน 1:1, 1:1:0.05 และ 1:1:0.05 ตามลำดับ ได้นำแทท-จีเอฟพีเก็บกักในถุงขนาดนาโนแบบไม่ยืดหยุ่นโดยนำผงแห้งของถุงขนาดนาโนเปล่ากระจายตัวในสารละลายของแทท-จีเอฟพีที่ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่พีเอช 7.0 สำหรับการเก็บกักแทท-จีเอฟพีในถุงขนาดนาโนแบบยืดหยุ่นได้เตรียมโดยกระจายผงแห้งของถุงขนาดนาโนเปล่าด้วยสารละลายแทท-จีเอฟพีในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีเอธานอลความเข้มข้น 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 มิลลิโวลท์ Tat-GFP ที่เก็บกักในนีโอโซมประจุลบแบบยืดหยุ่นให้ค่าการนำส่งจีเอฟพีสูงสุดเท่ากับ 14.62±0.07 และ 15.32±0.96% ในเซลล์ HT-29 และ KB ซึ่งคิดเป็น 2.81 และ 2.84 เท่าของ Tat-GFP ที่ไม่ได้เก็บกัก อย่างไรก็ตาม นีโอโซมประจุลบแบบยืดหยุ่นมีความเป็นพิษต่อเซลล์โดยพบการอยู่รอดของเซลล์ HT-29 และ KB เท่ากับ 37.29±0.67 และ 62.48±5.58% ได้ลดความเป็นพิษต่อเซลล์ของนีโอโซมประจุลบแบบยืดหยุ่นโดยลดปริมาณเอธานอลหรือใช้สารในกลุ่ม edge activator เช่น โซเดียมโคเลท (NaC) ซึ่งให้ประสิทธิภาพในการนำส่งแทท-จีเอฟพีเข้าสู่เซลล์ได้ใกล้เคียงกันในช่วง 13.28±0.48 ถึง 15.95±0.78% ในเซลล์ HT-29 และ 12.74±1.31 ถึง 16.62±1.53% ในเซลล์ KB อย่างไรก็ตาม นีโอโซมประจุลบแบบยืดหยุ่นที่มีโซเดียมโคเลทอยู่ในปริมาณ 1% โมล มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์สูงเท่ากับ 92.32±3.82 และ 96.62±5.96% ในเซลล์ HT-29 และ KB ตามลำดับ สำหรับเทคนิคการผสม พบว่าของผสมของแททกับจีเอฟพี (แทท/จีเอฟพี) ในอัตราส่วนโมลาร์ 1:1 ให้ค่าประสิทธิภาพในการนำส่งจีเอฟพีเท่ากับ 9.31±0.05% ซึ่งคิดเป็น 1.79 เท่าของฟิวชั่นโปรตีนในเซลล์ HT-29 และสามารถเพิ่มการนำส่งจีเอฟ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

พีผ่านชั้นผิวหนังได้มากกว่าฟิวชั่นโปรตีนถึง 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 ได้นำรูปแบบของผสมมาศึกษาต่อกับแคลซิโตนิน เนื่องจากความเป็นพิษเมื่อให้โดยการรับประทานของนีโอโซมที่ประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ ได้เตรียมของผสมของแทท/แคลซิโตนิน วีพี/แคลซิโตนิน และวีพี/แทท/แคลซิโตนินในอัตราส่วนโมลาร์ต่างๆ และได้ศึกษาการปฏิกิริยาทางกายภาพและเคมีระหว่างแคลซิโตนินและวีพีหรือแททในแทท/แคลซิโตนิน วีพี/แคลซิโตนิน และวีพี/แทท/แคลซิโตนินด้วยการวัดขนาดอนุภาค ดิฟเฟอเรนเชียล แคลอริเมททรี และเอฟที-ไออาร์สเปกตรัม ในการเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพของแคลซิโตนินในหลอดทดลองและสัตว์ทดลองโดยผสมกับแททและ/หรือวีพี ได้พิจารณาจากการเพิ่มขึ้นของระดับแคลเซียมในเซลล์และการลดลงของแคลเซียมในเลือด ในการศึกษาในหลอดทดลองโดยใช้เซลล์ HT-29 และ KB พบว่าเมื่อผสมแคลซิโตนินกับแททสามารถเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยให้ความเข้มข้นของแคลเซียมในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 116.46±0.57 และ 172.14±4.12% จากของผสมแทท/แคลซิโตนินที่อัตราส่วนโมลาร์ 3:1 และ 1:1 ในเซลล์ HT-29 และ KB ของผสมวีพี/แคลซิโตนินที่อัตราส่วนโมลาร์ 6:1 ให้ความเข้มข้นแคลเซียมสูงถึง 152.07% ในเซลล์ HT-29 ซึ่งมีการแสดงออกของตัวรับของโปลิโอไวรัส ได้นำของผสมแทท/แคลซิโตนินที่ 3:1 และ 1:1, วีพี/แคลซิโตนินที่ 6:1 และ 3:1 และวีพี/แทท/แคลซิโตนินที่ 6:1:1 ซึ่งให้ฤทธิ์สูงสุดในเซลล์ทั้ง 2 ชนิดมาศึกษาในหนูทดลอง ซึ่งพบว่าแทท/แคลซิโตนินที่อัตราส่วนโมลาร์ 1:1 สามารถลดระดับแคลเซียมในซีรัมได้ 18-31% ของระดับเริ่มต้นและให้ฤทธิ์ลดระดับแคลเซียมในเลือดหนูได้มากกว่า 24 ชั่วโมงที่ขนาด 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม อย่างไรก็ตาม ของผสมวีพี/แคลซิโตนินไม่ให้ฤทธิ์ลดระดับแคลเซียมเนื่องจากไม่มีตัวรับสำหรับโปลิโอไวรัสในหนูซึ่งเป็นสัตว์ฟันแทะ นอกจากนี้ยังพบว่าแทท/แคลซิโตนินเพิ่มการนำส่งแคลซิโตนินผ่านทางผิวหนังได้ โดยแทท/แคลซิโตนินที่อัตราส่วนโมลาร์ 1:1 สามารถนำส่งแคลซิโตนินผ่านผิวหนังได้ดีกว่าแคลซิโตนินเดี่ยวๆ และยังเพิ่มความคงตัวของแคลซิโตนิน โดยพบปริมาณแคลซิโตนินที่เหลืออยู่มากกว่าสารละลายแคลซิโตนิน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 เดือน การศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของแททเปปไทด์ในการนำส่งแคลซิโตนินทั้งทางปากและผิวหนังด้วยเทคนิคการผสม สำหรับประสิทธิภาพของวีพีนั้น จำเป็นจะต้องมีการศึกษายืนยันอีกครั้งในสัตว์ทดลองที่มีการแสดงออกของยีนตัวรับของโปลิโอไวรัส การใช้แททเพื่อเพิ่มการนำส่งแคลซิโตนินในการเพิ่มขึ้นระดับแคลเซียมในเซลล์ ลดระดับแคลเซียมในเลือดหนู และเพิ่มความคงตัวทางเคมีของแคลซิโตนินสามารถนำไปประยุกต์ในการพัฒนาระบบนำส่งเปปไทด์อื่นได้ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved