

**INTRANASAL DELIVERY OF SELF-ASSEMBLY INSULIN
NANOCOMPLEXES BASED ON SURFACE MODIFIED
TRIMETHYL CHITOSAN**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(PHARMACEUTICS)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2008**

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

ระบบนำส่งยาทางจมูกของอินซูลินนาโนคอมเพล็กซ์ที่เตรียมจากอนุพันธ์ไตรเมทิล
ไคโตแซน

(INTRANASAL DELIVERY OF SELF-ASSEMBLY INSULIN NANOCOMPLEXES
BASED ON SURFACE MODIFIED TRIMETHYL CHITOSAN)

อัญชลี จินตพัฒน์กิจ 4536902 PYPT/D

ปร.ด. (เภสัชการ)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: วราภรณ์ จรรยาประเสริฐ, Ph.D., THOMAS KISSEL,
Ph.D., เพ็ญโฉม ฝั่งวิชา, Ph.D.

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อศึกษาศักยภาพของการใช้นาโนคอมเพล็กซ์ที่เตรียมจากไตรเมทิลไคโตแซน (TMC) และ อนุพันธ์ PEGylated TMC ในการนำส่งอินซูลินทางจมูก ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าดักจับอินซูลินในเซชันที่เหมาะสมของ TMC คือ 40% ซึ่ง TMC ละลายน้ำได้ดีที่สุดและดักจับอินซูลินได้ดีที่สุดไม่ส่งผลกระทบต่อคุณสมบัติทางกายภาพและความเป็นพิษของ TMC สำหรับคุณสมบัติในการยึดเกาะเยื่อเมือกพบว่า PEGylated TMC มีคุณสมบัติในการยึดเกาะเยื่อเมือกสูงกว่า TMC ซึ่งเป็นผลมาจากการแทรกซึมผ่านของสายโซ่ PEG ในเยื่อเมือก และการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างประจุบวกของ TMC และประจุลบของไกลโคโปรตีนในเยื่อเมือก อินซูลินนาโนคอมเพล็กซ์ที่เตรียมจากอันตรกิริยาไฟฟ้าสถิตระหว่างพอลิเมอร์และอินซูลิน แสดงให้เห็นว่าอัตราส่วนระหว่างประจุบวกของพอลิเมอร์และประจุลบของอินซูลินมีบทบาทสำคัญในการเตรียมนาโนคอมเพล็กซ์ นาโนคอมเพล็กซ์ที่มีความคงตัวและมีประสิทธิภาพในการบรรจุอินซูลินสูงเตรียมได้ที่หรือใกล้เคียงกับอัตราส่วนระหว่างประจุบวกของพอลิเมอร์และประจุลบของอินซูลินที่เหมาะสมซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของพอลิเมอร์ เปรียบเทียบกับอินซูลินนาโนพาร์ติเคิลที่เตรียมจากเจลไอออนิกของพอลิเมอร์กับไตรโพลีฟอสเฟต (TPP) อินซูลินนาโนคอมเพล็กซ์มีความคงตัวในฟอสเฟตบัฟเฟอร์สูงกว่าอินซูลินนาโนพาร์ติเคิล และสามารถป้องกันการทำลายของอินซูลินจากความร้อนและเอนไซม์ได้สูงกว่านาโนพาร์ติเคิล นอกจากนี้พบว่า การมี TPP ในระบบจะเร่งการทำลายของอินซูลินโดยทริปซิน และการทำลายอินซูลินเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณ TPP จากการศึกษาการนำส่งอินซูลินนาโนคอมเพล็กซ์ทางจมูกในสัตว์ทดลอง พบว่าอินซูลินนาโนคอมเพล็กซ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ 34 – 47% จากระดับปกติ ประสิทธิภาพในการลดระดับน้ำตาลในเลือดของอินซูลินนาโนคอมเพล็กซ์เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณของพอลิเมอร์ และลดลงเมื่อเพิ่มดักจับการแทนที่ของสายโซ่ PEG ประสิทธิภาพในการลดน้ำตาลในเลือดของอินซูลินนาโนคอมเพล็กซ์มีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงเยื่อเมือกของเนื้อเยื่อโพรงจมูก อินซูลินนาโนคอมเพล็กซ์ที่เตรียมจาก TMC มีฤทธิ์เป็นสารเพิ่มการดูดซึมของอินซูลินทางจมูกที่มีผลระยะยาวต่อเนื่องต่อเนื้อเยื่อโพรงจมูกในระดับสูง ในขณะที่อินซูลินนาโนคอมเพล็กซ์ที่เตรียมจาก PEGylated TMC โดยเฉพาะ PEG(5k)₆₈₀-g-TMC400-40 เพิ่มการดูดซึมของอินซูลินทางจมูกและมีผลระยะยาวต่อเนื่องต่อเนื้อเยื่อโพรงจมูกในระดับต่ำ อย่างไรก็ตามการระคายเคืองของนาโนคอมเพล็กซ์เป็นแบบชั่วคราว เนื้อเยื่อโพรงจมูกสามารถกลับคืนสู่สภาพเดิมได้หลังจากการให้ทางจมูก 24 ชั่วโมง จากการให้อินซูลินนาโนคอมเพล็กซ์ทางจมูกติดต่อกันทุกวันเป็นเวลาหนึ่งสัปดาห์ พบว่าเนื้อเยื่อโพรงจมูกมีการปรับตัวตามการระคายเคืองเยื่อเมือกของอินซูลินนาโนคอมเพล็กซ์แต่ละชนิด โดยสรุปผลการศึกษาในสัตว์ทดลองบ่งชี้ว่านาโนคอมเพล็กซ์ที่เตรียมจาก PEG(5k)₆₈₀-g-TMC400-40 มีศักยภาพในการเป็นตัวนำส่งอินซูลินทางจมูกที่มีความปลอดภัยและประสิทธิภาพ

**INTRANASAL DELIVERY OF SELF-ASSEMBLY INSULIN NANOCOMPLEXES
BASED ON SURFACE MODIFIED TRIMETHYL CHITOSAN**

ANCHALEE JINTAPATTANAKIT 4536902 PYPT/D

Ph.D. (PHARMACEUTICS)

THESIS ADVISORS: VARAPORN JUNYAPRASERT, Ph.D., THOMAS KISSEL,
Ph.D., PENCHOM PEUNGVICHA, Ph.D.**ABSTRACT**

This study aimed to investigate the potential use of nanocomplexes (NC) based on *N*-trimethyl chitosan (TMC) and its corresponding poly(ethylene glycol)-*graft*-TMC copolymers (PEGylated TMC) for intranasal insulin delivery. The results indicated that a suitable degree of quaternization (DQ) of TMC was 40%, which provided the highest water solubility; its physicochemical properties and cytotoxicity were independent of degree of dimethylation (DD). Regarding mucoadhesive properties, PEGylated TMC showed significantly higher levels of adhesion to mucus than unmodified TMC, due to the synergistic effects of interpenetration of PEG chains into the mucus and electrostatic interaction between positively charged TMC and anionic glycoproteins present in the mucus layer. The self-assembly insulin nanocomplexes (NC) prepared via the electrostatic interaction between the polymers and insulin showed that polymer/insulin (+/-) charge ratio played an important role in NC formation. Stable NC with high insulin association efficiency were obtained at or close to optimized polymer/insulin (+/-) charge ratio, depending on the polymer structure. Compared to insulin loaded nanoparticles (NP) prepared by ionotropic gelation with tripolyphosphate (TPP) counterions, NC were more stable in pH 6.8 phosphate buffer and could protect against the degradation of insulin at higher temperature and with proteolytic enzyme more efficiently than NP. Moreover, the presence of TPP accelerated the degradation of free insulin and insulin loaded NP by trypsin and the insulin degradation increased with increasing TPP concentration. From *in vivo* studies, the insulin NC showed about a 34 – 47% decrease in blood glucose concentration. The hypoglycemic response of the insulin NC increased with increasing polymer ratio and decreased with increasing PEG substitution degree which consistently correlated with the acute alteration in nasal morphology. The NC of TMC acted as a nasal absorption enhancer causing severe damage to nasal mucosa. In contrast, the NC of PEGylated TMC, especially PEG(5k)₆₈₀-g-TMC400-40 could enhance nasal absorption of insulin with mild irritation. However, the irritating effects of the NC on the rat nasal epithelium were reversible and the epithelium could be recovered after 24 h post nasal administration. After one-week daily administration of each insulin NC, it was shown that the nasal epithelium adapted to resist the acute effect. Finally, the results from *in vivo* studies indicated that NC based on PEG(5k)₆₈₀-g-TMC400-40 would be a potential carrier for safe and effective nasal delivery of insulin.

**KEY WORDS : INTRANASAL DELIVERY / INSULIN / NANOCOMPLEXES /
TRIMETHYL CHITOSAN / PEGYLATION**

252 pp.