DEVELOPMENT OF ORAL PROTEIN DELIVERY BY LIPOSOMES; EFFECT OF PROTEIN SECONDARY STRUCTURE ON PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF LIPOSOMES AND PERMEABILITY ACROSS CACO-2 CELLS

WASU WITOONSARIDSILP

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY (PHARMACEUTICS) FACULTY OF GRADUATE STUDIES MAHIDOL UNIVERSITY 2011

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

DEVELOPMENT OF ORAL PROTEIN DELIVERY BY LIPOSOMES; EFFECT OF PROTEIN SECONDARY STRUCTURE ON PHYSICOCHEMICAL PEOPERTIES OF LIPOSOMES AND PERMEABILITY ACROSS CACO-2 CELLS

WASU WITOONSARIDSILP 4637607 PYPT / D

Ph.D. (PHARMACEUTICS)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: NARONG SARISUTA, Ph.D., CHRISTEL C. MUELLER-GOYMANN, Ph.D., BUSABA PANYARACHUN, Ph.D.

ABSTRACT

The study on protein conformation in different microenvironments and drug delivery systems would be beneficial in the development of novel protein drug delivery systems and also in the improvement of permeation across biological membranes. In our study the secondary structure of lysozyme (LZ) and the mechanism of binding interaction between LZ and liposomes were investigated under the influence of microenvironments, i.e., pH and electrolyte, and liposomal formulations, i.e., lipid composition and surface charge. The particle size, zeta potential, and entrapment efficiency of lysozyme liposomes (LZ-Lip) were characterized. Besides, mannosylated lysozyme liposomes (MAN-LZ-Lip), which could possibly target directly to the intestinal enterocytes, were also developed. Both LZ-Lip and MAN-LZ-Lip were investigated in their stability in GI fluids and permeability across Caco-2 cells monolayer. The results revealed that LZ's secondary structure remained intact in various pH's and sodium chloride concentrations. LZ-Lip size increased with the increasing Cholesterol (Chol) content. Elucidation with respect to zeta potential, entrapment efficiency, and ^{31}P NMR data indicated that LZ mainly interacted with lipid bilayers by electrostatic interaction with negatively charged liposomes with an entrapment efficiency of 23-37 % regardless of Chol content and pH of hydration medium. However, lower LZ entrapment was observed at higher sodium chloride content which might be due to the chloride ion binding with LZ. Only secondary structure of LZ from non-charged LZ-Lip in pH 10.6 with sodium chloride 5.0 mg/ml was altered with significant reduction of α-helix content from the solution at 29.19 % to 17.65 %. Moreover, mannosylamine (SAMAN) was synthesized in-house and confirmed by characterization. The physicochemical properties of MAN-LZ-Lip prepared by using mannosamine HCl (MANN) or SAMAN were described on the basis of competitive binding with LZ at liposomes surface or competitive insertion with dicetylphosphate (DCP) into lipid bilayers, respectively. Additionally, LZ-Lip and MAN-LZ-Lip were fairly stable in simulated GI fluids either pH 2.0 or pH 6.8, whose % LZ remaining were more than 86.0 %. Finally, the permeability of LZ-Lip across Caco-2 cells monolayer was significantly enhanced with a size dependent manner compared to LZ in the solution. In the case of MAN-LZ-Lip, permeability was even higher than that of LZ-Lip, which might be due to the role of mannose receptor or mannose binding protein on the intestinal enterocytes.

KEY WORDS: LYSOZYME/ CHARGED LIPOSOMES/ SECONDARY STRUCTURE/ MANNOSYLATED LIPOSOMES/ CACO-2 CELLS

214 pages

Copyright by Mahidol University

การพัฒนาระบบนำส่งยาโปรตีนในรูปไลโปโซม; ผลของโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนต่อสมบัติทางเคมีกายภาพของไลโปโซมและการซึมผ่านเซลล์คาโคทู

DEVELOPMENT OF ORAL PROTEIN DELIVERY BY LIPOSOMES; EFFECT OF PROTEIN SECONDARY STRUCTURE ON PHYSICOCHEMICAL PEOPERTIES OF LIPOSOMES AND PERMEABILITY ACROSS CACO-2 CELLS

วสุ วิฑูรย์สฤษฏ์ศิลป์ 4637607 PYPT / D

ปร.ด. (เภสัชการ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: ณรงค์ สาริสุต, Ph.D., Christel C. Mueller-Goymann, Ph.D., บุษบา ปันยารชุน, Ph.D.

บทคัดย่อ

การศึกษาโครงสร้างของโปรตีนในสารละลายที่มีสิ่งแวดล้อมที่ต่างกัน และ ในระบบนำส่งยาต่างๆนั้น จะมีคุณประโยชน์ในการพัฒนาระบบนำส่งสำหรับยาโปรตีนและการพัฒนาการซึมผ่านของยาโปรตีนผ่านเซลล์ในร่างกาย จุดประสงค์ของการวิจัยนี้คือ เพื่อศึกษาผลของสิ่งแวดล้อมในสารละลาย ได้แก่ ค่าความเป็นกรดและด่าง (pH), ความเข้มข้นของสารละลายเกลือ และ ผลของสูตรตำรับไลโปโซม ต่อ โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน ไลโซไซม (LZ) และ กลไกลการการเกิดปฏิกิริยา ระหว่าง LZ และ ไลโปโซม นอกจากนี้ยังได้พัฒนาตำรับ แมนโนไซเลท ไลโซไซมไลโปโซม (MAN-LZ-Lip) เพื่อการนำส่งโดยตรงไปที่เซลล์เอนเทโรไซท์ในทางเดินอาหาร ทำการทดสอบความคงสภาพของตำรับไลโปโซมทั้ง LZ-Lip และ MAN-LZ-Lip ในสภาวะเลียนแบบทางเดินอาหาร (GI fluids) และ ศึกษาการซึมผ่านของตำรับไลโปโซมผ่านเซลล์คาโคทู จากผลการศึกษาพบว่า pH และ ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ต่างกันไม่มีผลต่อโครงสร้างทุติยภูมิของ LZ ในส่วนของ LZ-Lip พบว่า LZ-Lip จะมีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อปริมาณของโคลเลสเตอรอลในตำรับมากขึ้น ผลจากค่าศักย์ไฟฟ้าซีตา, ค่าปริมาณการกักเก็บยา และ ^{31}ฟอสเฟอรัส เอ็นเอ็มอาร์ สามารถอธิบายได้ว่า LZ จะทำปฏิกิริยากับกับไลโปโซมประจุลบแบบไฟฟ้าสถิตย์ (electrostatic interaction) โดยมีค่าปริมาณการกักเก็บยาที่ 23-37% ทั้งนี้ไม่ขึ้นกับปริมาณคลอเลสเทอรอล และ pH ของสารละลาย อย่างไรก็ตามค่าปริมาณการกักเก็บยาจะลดลงเมื่อปริมาณเกลือโซเดียม คลอไรด์ในตำรับเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจจะเกิดการจับของ คลอไรด์ไอออน ต่อ LZ ผลจากการศึกษาโครงสร้างทุติยภูมิของ LZ ใน LZ-Lip พบว่า โครงสร้างทุติยภูมมีการเปลี่ยนแปลงในตำรับไลไปโซมที่ไม่มีประจุ ในสภาวะ pH 10.6 และ เกลือโซเดียมคลอไรด์ 5.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่าร้อยละของแอลฟาเฮลิคลดลงจาก 29.19 เป็น 17.65 สำหรับการเตรียม MAN-LZ-Lip นั้น สามารถเตรียมได้จากการเพิ่มสารที่เป็นลิแกนคือ แมนโนซามีน ไฮโดรคลอไรด์ (MANN) หรือ แมนโนซิลเอมีน (SAMAN) ซึ่งสมบัติทางเคมีกายภาพของ MANN-DCP-LZ-Lip และ SAMAN-DCP-LZ-Lip นี้ สามารถอธิบายได้โดยกลไกการแย่งจับสารประจุลบไดเซทิลฟอสเฟส (DCP) กับ LZ หรือ กลไกการแย่งกับ DCP ในการเข้าไปอยู่ในชั้นไขมันในไลโปโซม ตามลำดับ นอกจากนี้ไลโปโซมทั้งสองชนิดมีความคงสภาพดีใน GI fluid ทั้งที่ pH 2.0 และ pH 6.8 โดยมีค่าร้อยละคงเหลืออยู่ของ LZ ในไลโปโซมมากกว่า 86.0 นอกจากนี้ผลการทดสอบการซึมผ่านเซลล์คาโคทูพบว่า LZ-Lip สามารถเพิ่มการซึมผ่านเซลล์ได้มากกว่า LZ และการซึมผ่านเพิ่มขึ้นเมื่อขนาดของไลโปโซมเล็กลง สำหรับตำหรับ MAN-LZ-Lip นั้น สามารถเพิ่มการซึมผ่านได้มากกว่า LZ และ LZ-Lip ทั้งนี้อาจเกิดจากการจับที่เฉพาะเจาะจงบนเซลล์เอนเทอโรไซท์โดยใช้แมนโนรีเซปเตอร์ หรือ แมนโนสไบดิงโปรตีน

214 หน้า

Copyright by Mahidol University