ไคโตแซนไมโครพาร์ทิเคิลสำหรับนำส่งโปรตีน และแอนติเจน: การเตรียม อันตรกิริยากับเซลล์นำเสนอแอนติเจน และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลอง

นายจิรศักดิ์ กุศลวิริยะวงศ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชกรรม
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHITOSAN MICROPARTICLES FOR PROTEIN AND ANTIGEN DELIVERY: PREPARATION, INTERACTIONS WITH ANTIGEN PRESENTING CELLS AND *IN VIVO* IMMUNE RESPONSE

Mr. Chirasak Kusonwiriyawong

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Pharmaceutics
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic year 2006
Copyright of Chulalongkorn University

4921.7

Thesis Title	Chitosan microparticles for protein and antigen delivery: Preparation, interactions with antigen presenting cells, and *in vivo* immune response
By	Mr. Chirasak Kusonwiriyawong
Field of Study	Pharmaceutics
Thesis Advisor	Professor Garnpimol C. Ritthidej
Thesis Co-advisor	Associate Professor Vimolmas Lipipun

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctoral Degree

.....Pornpen Pramyothin.....Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences

(Associate Professor Pornpen Pramyothin, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....P. Kulvanich..... Chairman

(Associate Professor Poj Kulvanich, Ph.D.)

.....Garnpimol C. Ritthidej..... Thesis Advisor

(Professor Garnpimol Ritthidej, Ph.D.)

.....Vimolmas Lipipun..... Thesis Co-advisor

(Associate Professor Vimolmas Lipipun, Ph.D.)

..... Member

(Professor Wanpen Chaicumpa, Ph.D.)

..... Member

(Sit Thirapakpoomanunt, M.S. Microbiology)

.....N. Vardhanabhuti..... Member

(Assistant Professor Nontima Vardhanabhuti, Ph.D.)

.....M. Sutanthavibul..... Member

(Narueporn Sutanthavibul, Ph.D.)

จิรศักดิ์ กุศลวิริยะวงศ์: ไคโตแซนไมโครพาร์ทิเคิลสำหรับนำส่งโปรตีน และแอนติเจน: การเตรียม อันตรกิริยากับเซลล์นำเสนอแอนติเจน และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลอง (CHITOSAN MICROPARTICLES FOR PROTEIN AND ANTIGEN DELIVERY: PREPARATION, INTERACTIONS WITH ANTIGEN PRESENTING CELLS AND *IN VIVO* IMMUNE RESPONSE) อ. ที่ปรึกษา: ศ.ดร. กาญจน์พิมล ฤทธิเดช, อ. ที่ปรึกษาร่วม: รศ.ดร. วิมลมาศ ลิปิพันธ์, 104 หน้า

ไคโตแซนไมโครพาร์ทิเคิลถูกเตรียมขึ้นจากไคโตแซน ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล และมาจากแหล่งผลิตแตกต่างกัน ด้วยวิธีพ่นแห้ง เพื่อใช้เป็นระบบนำส่งโปรตีน และแอนติเจน โดยศึกษาตัวแปรที่เกี่ยวข้องกับสูตรตำรับและกระบวนการผลิตในขั้นแรก เพื่อให้ได้ไมโครพาร์ทิเคิลที่มีคุณสมบัติตามต้องการ จากนั้นจึงเตรียมไคโตแซนไมโครพาร์ทิเคิลที่บรรจุโปรตีน และศึกษาคุณสมบัติเชิงเคมีฟิสิกส์ของไมโครพาร์ทิเคิลที่เตรียมขึ้น ได้แก่ ขนาดและรูปร่างลักษณะอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค ประจุและองค์ประกอบบนผิวอนุภาค ปริมาณโปรตีน และประสิทธิภาพการบรรจุโปรตีน การปลดปล่อยโปรตีน และความคงสภาพของโปรตีนที่บรรจุอยู่ภายในอนุภาค ไคโตแซนไมโครพาร์ทิเคิลที่เตรียมได้ มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 3.185-7.177 ไมครอน โปรตีนที่บรรจุอยู่ภายในอนุภาคมีความคงสภาพ เมื่อบรรจุที่ร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก หรือมากกว่า จากนั้นจึงดัดแปรไมโครพาร์ทิเคิลโดยการพ่นแห้งร่วมกับสารช่วย หรือ crosslink กับ tripolyphosphate anions พบว่า การพ่นแห้งร่วมกับเจลาติน ทำให้ค่าประจุบนผิวอนุภาคเพิ่มขึ้น ในขณะที่การพ่นแห้งร่วมกับ poloxamer 407 และ Eudragit E ไม่ก่อให้เกิดผลดังกล่าว โดยรวมแล้ว การพ่นแห้งร่วมกับสารช่วย เหนี่ยวนำให้เกิดการปลดปล่อยโปรตีนที่เร็วขึ้น และในปริมาณที่มากขึ้น ส่วนการ crosslink ส่งผลให้อนุภาคมีค่าประจุบนผิวลดลง นอกจากนั้น ยังเตรียม poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) และ poly(α-butyl cyanoacrylate) (BCA) ไมโคร-/นาโนพาร์ทิเคิล โดยวิธี double-emulsion solvent evaporation และ anionic polymerization ตามลำดับ เพื่อศึกษาเปรียบเทียบกับไคโตแซนไมโครพาร์ทิเคิลด้วย จากนั้น จึงทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของไมโคร-/นาโนพาร์ทิเคิลที่เตรียมได้ กับเดนไดรติกเซลล์ และมาโครฟาจ พบว่า ไคโตแซน เจลาติน/ไคโตแซน poloxamer 407/ไคโตแซน และ PLGA ไมโครพาร์ทิเคิลค่อนข้างไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ในขณะที่ Eudragit E/ไคโตแซน และ BCA ไมโคร-/นาโนพาร์ทิเคิลเป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อทดสอบ cellular uptake ของไมโครพาร์ทิเคิลที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ พบว่าเซลล์ทั้งสองชนิดสามารถจับกินไคโตแซนไมโครพาร์ทิเคิลได้เป็นอย่างดี ขั้นสุดท้าย จึงบรรจุเจอีแอนติเจนลงในไมโครพาร์ทิเคิลที่เลือกไว้ แล้วฉีดเข้าใต้ผิวหนังของหนู พบว่าไคโตแซนไมโครพาร์ทิเคิลที่เตรียมจากไคโตแซน ทั้งชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ และสูง และเจลาติน/ไคโตแซนไมโครพาร์ทิเคิลกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่ใกล้เคียงกันกับเจอีวัคซีนที่มีจำหน่ายในทางการค้า ในสัปดาห์ที่ 12 หลังจากการฉีดเข็มแรก พบว่า serum IgG titer ซึ่งถูกเหนี่ยวนำให้สร้างขึ้นโดยไคโตแซนไมโครพาร์ทิเคิล ชนิดน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ยังมีระดับสูงขึ้น ในขณะที่ serum IgG titer ซึ่งถูกเหนี่ยวนำให้สร้างขึ้นโดยสูตรตำรับอื่น ๆ รวมทั้งผลิตภัณฑ์ที่จำหน่ายในทางการค้า มีระดับคงที่ หรือเริ่มมีระดับลดลง ไคโตแซนไมโครพาร์ทิเคิลชนิดดังกล่าว จึงมีศักยภาพสูงที่จะพัฒนาให้เป็นระบบนำส่งวัคซีนที่มีประสิทธิภาพต่อไปได้

สาขาวิชา เภสัชกรรม ลายมือชื่อนิสิต .....

ปีการศึกษา 2549 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

4576953233: MAJOR PHARMACEUTICS
KEY WORDS: CHITOSAN/ POLY(LACTIC-CO-GLYCOLIC ACID)/ POLY(α-BUTYL CYANOACRYLATE)/ MICROPARTICLES/ NANOPARTICLES/ BOVINE SERUM ALBUMIN/ JAPANESE ENCEPHALITIS/ PROTEIN/ VACCINE

CHIRASAK KUSONWIRIYAWONG: CHITOSAN MICROPARTICLES FOR PROTEIN AND ANTIGEN DELIVERY: PREPARATION, INTERACTIONS WITH ANTIGEN PRESENTING CELLS AND *IN VIVO* IMMUNE RESPONSE, THESIS ADVISOR: PROF. GARNPIMOL C. RITTHIDEJ, THESIS COADVISOR: ASSOC. PROF. VIMOLMAS LIPIPUN, 104 pp.

Chitosan microparticles of different molecular weights and sources for protein and antigen delivery were prepared by spray drying. Formulation and process parameters were firstly optimized in order to obtain the microparticles with controlled properties. Bovine serum albumin was subsequently incorporated into microparticles. Physicochemical properties of the resultant microparticles were evaluated in terms of particle size and size distribution, zeta potential, particle morphology, particle surface composition, protein content and entrapment efficiency, *in vitro* release, and integrity of encapsulated protein. Size of chitosan microparticles was ranged between 3.185-7.177 μm. Integrity and structural comformation of entrapped protein were retained at protein loading of 5% w/w or higher. The microparticles were further modified by co-spray drying with excipients or crosslinking with tripolyphosphate anions. Incorporation of gelatin resulted in an increase in zeta potential of microparticles, while poloxamer 407 and Eudragit E had no effect. The added excipents mostly induced faster and/or higher amount of released protein. Crosslinking the particles caused an obvious reduction of drug release. For comparison, poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and poly(α-butyl cyanoacrylate) (BCA) micro-/nanoparticles were prepared by double-emulsion solvent-evaporation and anionic polymerization methods, respectively, and characterized by their properties. All micro-/nanoparticles were subjected to cytotoxicity test with dendritic cells and macrophages. The chitosan, gelatin/chitosan, poloxamer 407/chitosan and PLGA microparticles were relatively non-toxic to both cells, while the opposite results were obtained from Eudragit E/chitosan and BCA micro-/nanoparticles. The non-toxic chitosan and composite microparticles were efficiently taken up by both cells. The Japanese Encephalitis (JE) antigen was finally incorporated into the selected microparticles and administered subcutaneously into mice. The chitosan of both low and high molecular weight and the gelatin/chitosan microparticles elicited a comparable immune response to the commercial JE vaccine. At week 12 after the first immunization, the serum IgG titer, induced by the low molecular weight chitosan particles, still kept increasing, while that of the others were stable or started to decline. The chitosan microparticles of low molecular weight presented a high potential application as an efficient vaccine delivery system.

Field of study: Pharmaceutics Student's signature C. Kusonwiriyawong
Academic year: 2006 Advisor's signature Garnpimol C. Ritthidej
Co-advisor's signature Vimolmas Lipipun

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere gratitude to my thesis advisor, Professor Garnpimol C. Ritthidej, and thesis co-advisor, Associate Professor Vimolmas Lipipun. Their invaluable advice, support, and encouragement are deeply appreciated.

I am also indebted to my thesis committee, Associate Professor Poj Kulvanich, Professor Wanpen Chaicumpa, Mr. Sit Thirapakpoomanunt, Assistant Professor Nontima Vardhanabhuti, Dr. Narueporn Sutanthavibul. Their suggestions and comments are gratefully acknowledged.

Thank all my friends and students of the Department of Manufacturing Pharmacy, past and present, for the memorable experience we shared over the past five years. Thank staff members of the department as well for their kind assistance.

This dissertation is dedicated to my parents and sisters. Without their love, support and enthusiasm, this dissertation might not exist.

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT iv

ENGLISH ABSTRACT v

ACKNOWLEDGEMENTS vi

CONTENTS vii

LIST OF TABLES ix

LIST OF FIGURES x

CHAPTER

I INTRODUCTION 1

II LITERATURE REVIEW 4

III Retained integrity of encapsulated protein in spray-dried chitosan microparticles

Introduction 10

Materials and methods 11

Results 14

Discussion 23

Conclusions 28

IV Chitosan, poly(lactic-co-glycolic acid), and poly(α-butyl cyanoacrylate) micro-/nanoparticles intended for cellular delivery of protein: Physicochemical properties, cytotoxicity and cellular uptake in dendritic cells and macrophages

Introduction 29

Materials and methods 30

Results 36

Discussion 65

Conclusions 70

V Chitosan microparticles for delivery of Japanese Encephalitis antigen: Physicochemical properties, in vitro cellular uptake and in vivo immune response in mice

Introduction 71

Materials and methods 72

Results 77

Page

Discussion..... 85
Conclusions..... 87
VI CONCLUSIONS..... 89
REFERENCES..... 92
BIOGRAPHY..... 104

LIST OF TABLES

Table Page

3.1 Effects of formulation and process parameters on particle size and yield percentage of chitosan microparticles..... 15

3.2 Effects of protein loading and process parameters on physicochemical properties of BSA-loaded chitosan microparticles, prepared by spray drying of 1% w/v chitosan solution..... 19

4.1 Physicochemical properties of chitosan and chitosan composite microparticles..... 38

4.2 Physicochemical properties of crosslinked chitosan and chitosan composite microparticles..... 40

4.3 Physicochemical properties of poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles. 47

4.4 Physicochemical properties of poly(α-butyl cyanoacrylate) nanoparticles... 48

4.5 Percentage of elements exposed at and BSA coverage on the particle surface..... 51

4.6 *In vitro* cellular uptake of micro-/nanoparticles, as percentage of cells taking up the particles..... 65

5.1 Physicochemical properties of JE-loaded microparticles..... 77

LIST OF FIGURES

Figure Page

3.1 Scanning electron photomicrographs of LCS microparticles, obtained by spray drying at a spray rate of 5 ml/min and the inlet air temperature of (A) 80 °C, (B) 100 °C, and (C) 120 °C..... 16

3.2 Scanning electron photomicrographs of HCS microparticles, obtained by spray drying at an inlet air temperature of 100 °C and the spray rate of (A) 3, (B) 5, and (C) 7 ml/min..... 17

3.3 Scanning electron photomicrographs of BSA-loaded chitosan microparticles, obtained by spray drying of (A) 1%, (B) 5%, (C) 10% w/w BSA in 1% w/v LCS solution, (D) 1% w/w BSA in 1% w/v HCS solution at the spray rate of 3 ml/min and the inlet air temperature of 120 °C, and 10% w/w BSA in 1% w/v LCS solution at a spray rate of 5 ml/min and the inlet air temperature of (E) 120 °C, and (F) 100 °C, respectively..... 20

3.4 *In vitro* BSA released from different chitosan microparticles, as percentage of BSA remained in microparticles plotted against time..... 21

3.5 SDS-PAGE of (A) Lanes 1 and 2: unprocessed BSA, Lane 3: molecular weight standards, broad range (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA), Lane 4: sample buffer, Lanes 5 and 6: BSA recovered from 10% w/w BSA-loaded LCS microparticles, prepared at a spray rate of 3 ml/min and the inlet air temperature of 120 °C and 100 °C, respectively, Lanes 7 and 8: BSA recovered from 5% w/w BSA-loaded LCS microparticles, prepared at a spray rate of 3 ml/min and the inlet air temperature of 120 °C and 100 °C, respectively, and (B) Lane 1: blank

Figure Page

chitosan microparticles, Lane 2: BSA recovered from 1% w/w BSA-loaded LCS microparticles, prepared at the spray rate of 3 ml/min and the inlet air temperature of 120 °C, and Lane 3: molecular weight standards, broad range..... 22

3.6 CD spectra of (A) unprocessed BSA and BSA recovered from BSA-loaded chitosan microparticles, percent of which designates the BSA loading, and (B) unprocessed BSA dissolved in distilled water and 0.5% acetic acid solution..... 25

4.1 Scanning electron photomicrographs of blank (A) LCS, (B) HCS, (C) JCS, and BSA-loaded (D) LCS, (E) HCS, and (F) JCS microparticles..... 41

4.2 Scanning electron photomicrographs of blank LCS microparticles, co-spray dried with 15% w/w of (A) GEL, (B) POL, (C) EUD, and BSA-loaded LCS microparticles, co-spray dried with 15% w/w of (D) GEL, (E) POL, and (F) EUD..... 42

4.3 Scanning electron photomicrographs of BSA-loaded LCS microparticles, crosslinked in 1% w/v tripolyphosphate solution at (A) pH 5, (B) pH 9, BSA-loaded (C) 15 GEL LCS, (D) 15 POL LCS, and (E) 15 EUD LCS microparticles, crosslinked in 1% w/v tripolyphosphate solution at pH 5... 43

4.4 Scanning electron photomicrographs of (A) blank and (B) BSA-loaded PLGA microparticles, prepared with 2% w/v PVA..... 49

4.5 Scanning electron photomicrographs of blank BCA nanoparticles, prepared by anionic polymerization at (A) pH 3 without dextran, (B) pH 3 with 10% dextran, (C) pH 1 with 10% dextran, and BSA-loaded BCA nanoparticles, prepared at (D) pH 3 without dextran, (E) pH 3 with 10%

Figure Page

dextran, and (F) pH 1 with 10% dextran and loaded with BSA at hour 4 of polymerization..... 50

4.6 *In vitro* BSA released from (A) chitosan microparticles, (B) crosslinked and LCS composite microparticles, PLGA microparticles, and (C) BCA nanoparticles, as a function of time..... 52

4.7 SDS-PAGE of (A) Lane 1: molecular weight standards, broad range (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA), Lanes 2 and 3: blank and BSA recovered from BSA-loaded LCS microparticles, Lanes 4 and 5: blank and BSA recovered from BSA-loaded HCS microparticles, Lanes 6 and 7: blank and BSA recovered from BSA-loaded JCS microparticles, (B) Lane 1: molecular weight standards, broad range, Lanes 2 and 3: blank and BSA recovered from BSA-loaded 15 GEL LCS microparticles, Lanes 4 and 5: blank and BSA recovered from BSA-loaded 15 POL LCS microparticles, Lanes 6 and 7: blank and BSA recovered from BSA-loaded 15 EUD LCS microparticles, and (C) Lane 1: unprocessed BSA, Lanes 2 and 3: blank and BSA recovered from BSA-loaded PLGA microparticles, Lane 4: molecular weight standards, broad range, Lane 5: 1.5 μg unprocessed BSA, BSA recovered from BSA-loaded Lane 6: BCA 3.0, Lane 7: BCA 3.5, Lane 8: BCA 3.10, Lane 9: BCA 1.10-4 nanoparticles..... 57

4.8 CD spectra of BSA recovered from BSA-loaded (A) chitosan microparticles of different molecular weights and sources, (B) chitosan

Figure Page

composite microparticles, and (C) PLGA microparticles and BCA nanoparticles..... 59

4.9 Percentage of dendritic cells' viability, co-incubated with (A) chitosan microparticles, (B) crosslinked and LCS composite microparticles, and (C) PLGA microparticles and BCA nanoparticles, as a function of micro-/nanoparticle loading..... 61

4.10 Percentage of macrophages' viability, co-incubated with (A) chitosan microparticles, and (B) crosslinked and LCS composite microparticles, as a function of micro-/nanoparticle loading..... 63

5.1 Scanning electron photomicrographs of JE-loaded (A) LCS, (B) GEL LCS, (C) POL LCS, (D) HCS, and (E) PLGA microparticles..... 79

5.2 *In vitro* cellular uptake of microparticles, as percentage of cells taking up the particles..... 80

5.3 Confocal laser-scanning photomicrographs of dendritic cells taking up (A) JE antigen, JE-loaded (B) LCS, (C) GEL LCS, (D) POL LCS, (E) HCS, and (F) PLGA microparticles..... 81

5.4 Confocal laser-scanning photomicrographs of macrophages taking up (A) JE antigen, JE-loaded (B) LCS, (C) GEL LCS, (D) POL LCS, (E) HCS, and (F) PLGA microparticles..... 82

5.5 Serum titer of (A) total IgG, (B) IgG_1 isotype, and (C) IgG_{2a} isotype induced by the commercial JE vaccine and JE-loaded microparticles, as plots of natural logarithm of reciprocal serum titer against time (n=8)..... 83