

ผลของสูตรคาร์บอโนพาร์ทีเคิลไขมันแข็ง และนาโนพาร์ทีเคิลไคโตซาน ต่อคุณสมบัติ  
ทางเคมีกายภาพ และความสามารถในการนำส่งวัคซีนเอชไอวีชนิดพลาสมิดดีเอ็นเอ  
ผ่านทางผิวหนัง

นาย รัฐพล อาษาสุจริต

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาคณะหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชกรรม

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**EFFECT OF SOLID LIPID NANOPARTICLES AND CHITOSAN  
NANOPARTICLES FORMULATION ON PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES  
AND ABILITY FOR TRANSDERMAL DELIVERY OF HIV PLASMID DNA  
VACCINE**

**Mr. Rathapon Asasutjarit**

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

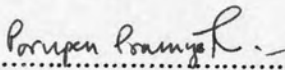
Copyright of Chulalongkorn University

**492159**

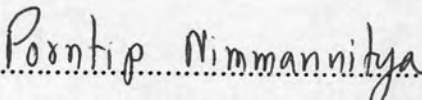
Thesis Title           Effect of Solid Lipid Nanoparticles and Chitosan Nanoparticles Formulation on  
Physicochemical Properties and Ability for Transdermal Delivery of HIV Plasmid  
DNA Vaccine  
By                        Mr. Rathapon Asasutjarit  
Filed of study         Pharmaceutics  
Thesis Advisor        Professor Garpimol C. Ritthidej, Ph.D.  
Thesis Co-advisor    Uracha Ruktanonchai, Ph.D.

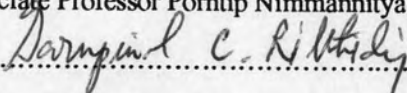
---

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

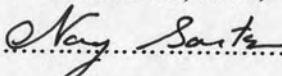
  
..... Dean of the Faculty of  
Pharmaceutical Sciences  
(Associate Professor Pornpen Pramyothin, Ph.D.)

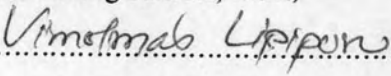
Thesis Committee

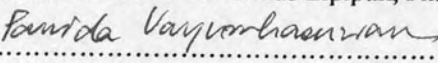
  
..... Chairman  
(Associate Professor Pornpip Nimmannitya, M.Sc.)

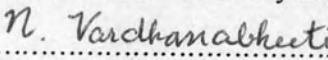
  
..... Thesis Advisor  
(Professor Garpimol C. Ritthidej, Ph.D.)

Uracha Ruktanonchai  
..... Thesis Co-advisor  
(Uracha Ruktanonchai, Ph.D.)

  
..... Member  
(Professor Narong Sarisuta, Ph.D.)

  
..... Member  
(Associate Professor Vimolmas Lipipun, Ph.D.)

  
..... Member  
(Assistant Professor Panida Vayumhasuwan, Ph.D.)

  
..... Member  
(Assistant Professor Nontima Vardhanabhuti, Ph.D.)

รัฐพล อาษาสุจริต : ผลของสูตรตำรับนาโนพาร์ทิเคิลไขมันแข็ง และนาโนพาร์ทิเคิลโคโคซานต่อคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ และความสามารถในการนำส่งวัคซีนเอชไอวีชนิดพลาสมิดดีเอ็นเอ ผ่านทางผิวหนัง. (EFFECT OF SOLID LIPID NANOPARTICLES AND CHITOSAN NANOPARTICLES FORMULATION ON PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES AND ABILITY FOR TRANSDERMAL DELIVERY OF HIV PLASMID DNA VACCINE) อ.ที่ปรึกษา : ศ.ดร.กาญจน์พิมล ฤทธิเดช, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ดร.อุรชา รักษ์ตานนท์ชัย, 130 หน้า.

งานวิจัยครั้งนี้ ศึกษาผลของส่วนประกอบของสูตรตำรับนาโนพาร์ทิเคิลไขมันแข็ง และนาโนพาร์ทิเคิลโคโคซาน ต่อคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ และความสามารถในการนำส่งวัคซีนเอชไอวีชนิดพลาสมิดดีเอ็นเอผ่านทางผิวหนัง ซึ่งนาโนพาร์ทิเคิลไขมันแข็งที่เตรียมขึ้นตามการออกแบบการทดลองแบบคอมพอลิทิสันศูนย์กลาง ชนิดพื้นผิวศูนย์กลาง ที่มีการปรับความเข้มข้นของสารลดแรงดึงผิว (ทีวิน 80 และ สแปน 85) ไคเมธิลไดออกตะเดคซิล แอมโมเนียมโบรไมด์ และคอเลสเตอรอล มีขนาดอนุภาค 136-191 นาโนเมตร คำนีการกระจายตัวของขนาดอนุภาค 0.23-0.37 ค่าศักย์ไฟฟ้าพื้นผิว 11-61 มิลลิโวลต์ และมีสถานะเป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้อง ทั้งนี้สมการรูปแบบที่ได้เป็นสมการควอคราติก ส่วนนาโนพาร์ทิเคิลโคโคซาน ที่เตรียมขึ้นจากการปรับอัตราส่วนของโคโคซานต่อไตรโพลีฟอสเฟต มีขนาดอนุภาค 258-997 นาโนเมตร คำนีการกระจายตัวของขนาดอนุภาค 0.28-0.54 และศักย์ไฟฟ้าพื้นผิว 10-39 มิลลิโวลต์ พบว่านาโนพาร์ทิเคิลไขมันแข็งส่วนใหญ่ มีความคงตัวทางกายภาพตลอด 2 เดือน แต่นาโนพาร์ทิเคิลโคโคซานเริ่มไม่คงตัวภายใน 1 เดือน ความสามารถในการเกิดสารเชิงซ้อนกับพลาสมิดดีเอ็นเอของนาโนพาร์ทิเคิลขึ้นกับส่วนประกอบของสูตรตำรับ โดยนาโนพาร์ทิเคิลโคโคซานสามารถจับกับพลาสมิดดีเอ็นเอได้ที่อัตราส่วนของนาโนพาร์ทิเคิลต่อพลาสมิดดีเอ็นเอต่ำที่สุด ผลการทดสอบความเป็นพิษต่ออีลาเซลล์ พบว่านาโนพาร์ทิเคิลไขมันแข็งมีความเป็นพิษสูงกว่านาโนพาร์ทิเคิลโคโคซาน จากการศึกษารานส์เฟกชัน และการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูด้วยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง และการทาผิว พบว่านาโนพาร์ทิเคิลทั้งสองเพิ่มประสิทธิภาพทรานส์เฟกชัน และการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของวัคซีนเอชไอวีชนิดพลาสมิดดีเอ็นเอได้ดีกว่าวัคซีนเอชไอวีชนิดพลาสมิดดีเอ็นเอเปล่า ยกเว้นการกระตุ้นด้วยการทาผิวด้วยสารเชิงซ้อนของนาโนพาร์ทิเคิลโคโคซาน มีประสิทธิภาพใกล้เคียงทางสถิติกับวัคซีนเอชไอวีชนิดพลาสมิดดีเอ็นเอเปล่าทาผิว ทั้งนี้วิธีการซึมผ่านผิวหนังของสารเชิงซ้อนนาโนพาร์ทิเคิล-วัคซีนคือรอยขุ่น รุขุมขนและต่อมไขมัน

สาขาวิชา เกษษกรรม  
ปีการศึกษา 2549

ลายมือชื่อนิสิต.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

## 4676975133 MAJOR: PHARMACEUTICS

KEY WORD: FORMULATION / SOLID LIPID NANOPARTICLES / CHITOSAN

NANOPARTICLES/ FACE-CENTERED CENTRAL COMPOSITE DESIGN/

PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES/PLASMID DNA VACCINE / TRANSDERMAL DELIVERY

RATHAPON ASASUTJARIT: EFFECT OF SOLID LIPID NANOPARTICLES AND CHITOSAN NANOPARTICLES FORMULATION ON PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES AND ABILITY FOR TRANSDERMAL DELIVERY OF HIV PLASMID DNA VACCINE. THESIS ADVISOR: PROF. GARNPIMOL C. RITTHIDEJ, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: URACHA RUKTANONCHAI, Ph.D. 130 pp.

Effect of solid lipid nanoparticles (SLN) and chitosan nanoparticles (CSN) formulation composition on their physicochemical properties and ability for transdermal delivery of HIV plasmid DNA (pDNA) vaccine were determined. The SLN formulated according to the face-centered central composite design with varying in concentration of mixture of Tween 80 and Span 85, dimethyldioctadecyl ammonium bromide and cholesterol had particle size of 136-191 nm with polydispersity index (PI) 0.23-0.37 and zeta potential 11-61 mV and were in solid state at room temperature. The model equations of responses fitted well with quadratic equations. The CSN prepared at varying ratios of chitosan:tripolyphosphate had particle size of 258-997 nm, PI 0.28-0.54 and zeta potential 10-39 mV. SLN were quite stable for 2 months while the changes of CSN were found within 1 month. The ability of nanoparticles to form complex with pDNA was affected by formulation compositions. It was found that the CSN could retain pDNA under electrical field at the lowest nanoparticles:pDNA ratio. *In vitro* cytotoxicity results demonstrated that HeLa cells were not well tolerant by high concentrations of SLN but could survive in CSN. The results of *in vitro* HIV pDNA vaccine transfection and mice immunization showed ability of SLN and CSN to use as a vector for *in vitro* transfection and also mice immunization by either intradermal injection or topical application. However, topical CSN-HIV pDNA vaccine complexes elicited statistically comparable immune response to naked HIV pDNA vaccine. The penetration study showed skin penetration pathways of nanoparticle-HIV pDNA vaccine were skin furrows and pilosebaceous unit.

Field of study    Pharmaceutics

Academic year    2006

Student's signature... *Rathapon Asasutjarit* .....

Advisor's signature... *Garnpimol C. Ritthidej* .....

Co-advisor's signature... *Uracha Ruktanonchai* .....

## ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere gratitude to Professor Dr. Garnpimol C. Ritthidej, my thesis advisor and Dr. Uracha Ruktanonchai, my thesis co-advisor for their invaluable guidance, kindness and encouragement throughout this study.

To Associate Professor Kiat Ruxrungtham (M.D.), Dr. Sunee Sirivichayakul, and all members of Clinical Immunology Research Group, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for their suggestion, guidance and kindness during my transfection study especially Dr. Sven-Iver Lorenzen.

To staff members of Nanotec for their assistance for use of the high pressure homogenizer and Zetasizer. Dr. Chanikul Chootrakool (Biotec) for the facility and assistance for Geldoc system. Associate Professor Dr. Vimolmas Lipipun who kindly taught me techniques for cell culture. Also Associate Professor Dr. Prasan Drumma-upakorn and Assistant Professor Dr. Pasarapa Towiwat who kindly taught me techniques for use and care of mice.

My grateful appreciation is expressed to Professor Dr. Richard H. Guy, Dr. M. Begoña Delgado-Charro and Mr. Adrian T. Roger for their kind supervision during my skin penetration study at Department of Pharmacy and Pharmacology, University of Bath, Bath, United Kingdom (8<sup>th</sup> October 2006-28<sup>th</sup> February 2007).

To Thailand Research Fund (TRF) for a great support under the Royal Golden Jubilee Ph.D. program grant and also the Rachadapisek Sompoch Fund, Graduate School, Chulalongkorn University for a support in a term of Chulalongkorn University 90<sup>th</sup> Anniversary grant.

To all the staff members of the Department of Manufacturing Pharmacy and Department of Pharmacy for their assistance and kindness.

And I would like to give my thanks to Associate Professor Dr. Orapan Matungkasombat, Dean of Faculty of Pharmacy, Rangsit University who provided me a chance to continue my study in this Ph.D. program.

To Ms. Duangrat Duangta and all my friends for her and their assistance, understanding and encouragement.

To my parents and my sister for their inspiration, understanding and encouragement.

Finally, I would like to express my thanks to all of those whose names have not been mentioned and to those who in one way or another have helped to make this thesis a reality.

# CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	x
LIST OF FIGURES.....	xi
LIST OF ABBREVIATIONS AND SYMBOLS.....	xiii
CHAPTER	
I. INTRODUCTION.....	1
II. LITERATURE REVIEW .....	3
1. Transdermal Vaccine Delivery.....	3
1.1 Anatomy of Skin and Its Function.....	4
1.2 Transdermal Vaccine Delivery System .....	8
1.3 Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Chitosan Nanoparticles (CSN) as Transdermal pDNA Vaccine Delivery System.....	11
1.3.1 SLN.....	11
1.3.2 CSN.....	12
1.4 Visualization of Skin Penetration .....	14
2. Human Immunodeficiency Virus.....	17
2.1 HIV Particle.....	17
2.2 Replication Cycle of HIV.....	19
2.3 HIV Infection Control.....	21
2.4 HIV Vaccine.....	21
3. Central Composite Design.....	23
III. MATERIALS AND METHODS.....	28
Materials.....	28
Animals.....	29
Equipment.....	30

Methods.....	30
1. Preparation and Characterizations of SLN.....	30
1.1 SLN Production.....	30
1.2 The Experimental Design.....	31
1.3 Differential Scanning Calorimetry Analysis of SLN.....	33
1.4 SLN X-Ray Diffraction Study.....	34
2. Preparation and Characterizations of CSN.....	34
2.1 CSN Production.....	34
3. Physical Properties Measurement of SLN and CSN.....	35
3.1 Size, PI and Zeta potential Measurement.....	35
3.2 Morphology Observation.....	35
3.3 Physical Stability Study.....	36
4. Ability of SLN and CSN to Form Complex with pHIS-HIV-hugag.....	36
5. Cell Culture.....	37
6. Cytotoxicity Assay.....	37
7. <i>In vitro</i> Transfection Study.....	37
8. Mice Immunization.....	39
8.1 Intradermal Immunization.....	40
8.2 Transdermal Immunization.....	40
8.3 Determination of Antigen-Specific IgG Titer.....	41
9. Study of Skin Penetration Pathway of Nanoparticles-pHIS-HIV-hugag Complex.....	41
9.1 pHIS-HIV-hugag Labeling.....	41
9.2 Preparation of Nanoparticles-pHIS-HIV-hugag Complex.....	42
9.3 Skin Penetration Experiment.....	42
9.4 Confocal Laser Scanning Microscopy.....	43
IV. RESULTS AND DISCUSSION.....	44
1. Preparation and Characterizations of SLN.....	44
1.1 SLN Production.....	44



1.2 The Experimental Design.....	46
1.3 Effect of Formulation Compositions on Particle Size, PI and Zeta potential of SLN.....	57
1.4 Differential Scanning Calorimetry and X-ray Diffraction Analysis of SLN.....	66
1.5 Physical Stability Study of SLN.....	70
2. Preparation and Characterizations of CSN.....	73
2.1 CSN Production.....	73
2.2 Physical Stability Study of CSN .....	75
3. Ability of SLN and CSN to Form Complex with pHIS-HIV-hugag .....	77
4. Cytotoxicity Assay.....	81
5. Transfection Study.....	82
6. Mice Immunization.....	84
7. Skin Penetration Pathway of Nanoparticles-pHIS-HIV-hugag Complex Study.....	87
V. CONCLUSIONS.....	94
REFERENCES.....	96
APPENDICES.....	104
Appendix A.....	105
Appendix B.....	109
Appendix C.....	112
Appendix D.....	116
Appendix E.....	124
Appendix F.....	128
VITA.....	130

## LIST OF TABLES

Table	Page
3.1 Formulation composition of SLN.....	31
3.2 Concentrations and coded level of variables for experimental design.....	31
3.3 Generated experimental design and responses of the design .....	33
3.4 Ratio of chitosan:tripolyphosphate for CSN production .....	35
3.5 Formulation composition of DOPE-SLN .....	39
3.6 Groups of mice used in immunization study .....	40
3.7 Formulation for labeling reaction.....	42
4.1 Particle size, PI and zeta potential of SLN .....	44
4.2 Statistical analysis of the experimental design .....	46
4.3 Comparison of observed values and predicted values of responses .....	56
4.4 Thermal analysis data of bulk materials and SLN.....	67
4.5 Particle size, PI, zeta potential and pH of CSN .....	73
4.6 Nanoparticles: pHIS-HIV-hugag immobilized ratio (w/w).....	78

## LIST OF FIGURES

Figure	Page
2.1 Anatomy of skin and skin penetration pathway.....	5
2.2 Focus on focal plane of conventional microscopy and CLSM .....	16
2.3 HIV-1 virion .....	18
2.4 HIV-1 life cycle .....	20
2.5 Central composite design for $k = 2$ and $\alpha = (2)^{1/2}$ .....	23
2.6 Central composite design for $k = 3$ and $\alpha = (3)^{1/2}$ and for $k = 3$ and $\alpha = 1$ .....	25
3.1 Scheme of experimental design: face-centered central composite design .....	32
4.1 Photograph of SLN 15: SEM and TEM .....	45
4.2 Normal % probability plot of the model equations for size, PI and zeta potential.....	48
4.3 Plots of studentized residuals versus predicted values of the model equations for size, PI and zeta potential .....	50
4.4 Outlier T plot and Cook's distance plot for size's model equation .....	51
4.5 Outlier T plot and Cook's distance plot for PI's model equation .....	52
4.6 Outlier T plot and Cook's distance plot for zeta potential's model equation.....	53
4.7 Plots of residuals in time sequence of the model equations for size, PI and zeta potential.....	55
4.8 Response surface for size of SLN: the effect of surfactant and DDAB.....	57
4.9 Response surface for PI of SLN: the effect of surfactant and DDAB.....	58
4.10 Response surface for zeta potential of SLN: the effect of surfactant and DDAB.....	59
4.11 Response surface for size of SLN: the effect of surfactant and cholesterol.....	60
4.12 Response surface for PI of SLN: the effect of surfactant and cholesterol.....	61
4.13 Response surface for zeta potential of SLN: the effect of surfactant and cholesterol.....	62
4.14 Response surface for size of SLN: the effect of DDAB and cholesterol .....	63
4.15 Response surface for PI of SLN: the effect of DDAB and cholesterol .....	64
4.16 Response surface for zeta potential of SLN: the effect of DDAB and cholesterol .....	65
4.17 Superimposition of DSC thermograms of cetylpalmitate, DDAB, cholesterol and SLN15.....	66

<b>Figure</b>	<b>Page</b>
4.18 XRD patterns of bulk cetylpalmitate, SLN10, SLN12 and SLN14.....	69
4.19 Particle size of SLN9-SLN15 measured at day 1, day 7, day 14, day 30 and day 60.....	70
4.20 PI of SLN9-SLN15 measured at day1, day 7, day 14, day 30 and day 60.....	71
4.21 Zeta potential of SLN9-SLN15 measured at day 1, day 7, day 14, day 30 and day 60.....	71
4.22 Photograph of CSN2: SEM and TEM .....	74
4.23 Particle size, PI and zeta potential of CSN2 measured at day 1, day 7, day 14, day 30 and day 60.....	76
4.24 TEM photographs of SLN15- and CSN2-pHIS-HIV-hugag complexes .....	77
4.25 Agarose gel electrophoresis of SLN- and CSN-pHIS-HIV-hugag complex .....	80
4.26 %Cell viability of HeLa cells incubated in varying concentrations of SLN and CSN2.....	81
4.27 Gag protein in cell lysates from HeLa cells incubated with Fugene 6-, SLN- and CSN-pHIS-HIV-hugag complexes for 24 hours detected by western blot technique.....	83
4.28 Mean IgG titers against gag protein in mice serum determined at day 6 after the second and the third pHIS-HIV-hugag immunization.....	84
4.29 Confocal micrographs of skin surface subsequent to treatment with nanoparticles-rhodamine-labeled-pHIS-HIV-hugag for 24 hours .....	87
4.30 Orthogonal section of porcine skin after 24-hour passive diffusion of Chol SLN- rhodamine labeled-pHIS-HIV-hugag complex varied the depth from surface of stratum corneum .....	89
4.31 Confocal micrographs of hair follicles and pilosebaceous units subsequent to treatment with nanoparticles-rhodamine-labeled-pHIS- HIV-hugag for 24 hours.....	90
4.32 The z-series of confocal images obtained following 24-hour passive diffusion of nanoparticles-rhodamine labeled-pHIS-HIV-hugag from surface of stratum corneum .....	92

## ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

Adj-R <sup>2</sup>	=	adjusted coefficient of determination
AIDS	=	acquired immune deficiency syndrome
APCs	=	antigen presenting cells
bp	=	base pair
cm	=	centimeter
CCD	=	central composite design
CLSM	=	confocal laser scanning microscopy
CMC	=	carboxymethylcellulose
CPC	=	cetylpyridinium chloride
CSN	=	chitosan nanoparticles
CT	=	cholera toxin
CTAB	=	cetyltrimethylammonium bromide
°C	=	degree celsius
Da	=	dalton
DDAB	=	dimethyl dioctadecyl ammonium bromide
DLNs	=	draining lymph nodes
DMEM	=	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	=	Deoxy ribonucleic acid
DOTAP	=	N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride
DOPE	=	dioleoyl phosphatidyl ethanolamine
EDTA	=	ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	=	enzyme linked immunosorbent assay
EQ1	=	esterquat 1 (N,N-di-(B-stearoylethyl)-N,N-dimethyl-ammonium chloride
ET	=	enterotoxin
FBS	=	fetal bovine serum
FITC	=	fluorescein isothiocyanate

g	=	gram
HAART	=	highly active antiretroviral therapy
HEL	=	Hen egg lysozyme
HIV	=	human immunodeficiency virus
id	=	intra-dermal
IFN	=	interferon
Ig	=	immunoglobulin
IL	=	interleukin
im	=	intra-muscular
ip	=	intra-peritoneal
iv	=	intra-venous
k	=	kilo
l	=	liter
Lkt	=	leukotoxin
M	=	molar
MHC	=	major histocompatibility complex
ml	=	milliliter
mRNA	=	messenger ribonucleic acid
mV	=	millivolt
N	=	normality
NC	=	nonionic:cationic
nm	=	nanometer
PBS	=	phosphate buffer saline
PCS	=	photon correlation spectroscopy
pDNA	=	plasmid deoxy ribonucleic acid
PI	=	polydispersity index
PLA	=	poly (D, L-lactide)
PLGA	=	poly (D, L-lactide-co-glycolide)
psi	=	pound per square inch
$r^2$	=	coefficient of determination
rpm	=	round per minute

sc	=	subcutaneous
SD	=	standard deviation
SLN	=	solid lipid nanoparticles
TAE	=	tris-acetate EDTA
TEM	=	transmission electron microscopy
UV	=	ultraviolet
v/v	=	volume by volume
w/v	=	weight by volume
w/w	=	weight by weight
μg	=	microgram
μl	=	microliter
%	=	percent