Thesis Title The Entrapment of Gallidermin in Nanovesicles for Pharmaceutical and Cosmeceutical Uses

Author Ms. Penpan Khanrin

Degree Master of Science (Pharmaceutical Sciences)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Aranya Manosroi	Chairperson
Prof. Dr. Jiradej Manosroi	Member
Prof. Dr. Rolf G. Werner	Member

ABSTRACT

The objective of this study was to entrap gallidermin (Gdm) in nanovesicles (liposomes and niosomes) for pharmaceutical and cosmeceutical uses. Gallidermin is an antimicrobial peptide. Gdm is unstable because of the reactivity of the unsaturated amino acids in their structure. Entrapment of Gdm in nanovesicles can solve this problem. In this study, the investigation of the appropriate nanovesicular formulations entrapped with the three peptide drugs (insulin, bacitracin (BCT) and BSA) with different charges and polarity was performed to be used as the models to entrap Gdm. Neutral (L-alpha-dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) /Cholesterol (CHL) in molar ratio 1:1), cationic (DPPC/CHL/Dimethyldioctadecylammonium bromide (DDAB) in molar ratio 1:1:0.05) and anionic liposomes (DPPC/CHL/Dicetyl phosphate (DP) in molar ratio 1:1:0.05), neutral (Polyoxyethylene sorbitan monostearate (Tween 61)/CHL in molar ratio 1:1), cationic (Tween 61/CHL/DDAB in molar ratio 1:1:0.05) and anionic Tween 61 niosomes (Tween 61/CHL/DP in molar ratio 1:1:0.05) and neutral (Sorbitan monostearate (Span 60)/CHL in molar ratio 1:1), cationic (Span 60/CHL/DDAB in molar ratio 1:1) and anionic Span 60 niosomes (Span 60/CHL/DP in molar ratio 1:1:0.05) were prepared by freeze dried empty liposomes (FDEL) method and reconstituted in phosphate buffer at pH 7.0. BSA gave the highest entrapment efficiency of 72.94% in neutral niosomes while BCT and insulin gave 90.88 % in anionic niosomes and 87.15 % in cationic niosomes, respectively. The Tween 61 nanovesicular formulations showed the best physical stability with no sedimentation for 4 weeks when dispersed in phosphate buffer at pH 5.4. Tween 61 niosomal dispersion in phosphate buffer at pH 5.4 was selected to

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

entrap Gdm. The maximum loading of Gdm in neutral, cationic and anionic Tween 61 niosomes were 30, 40 and 59.75 mg/g of the total surfactant lipid mixtures. The % entrapment efficiency of Gdm in neutral, cationic and anionic Tween 61 niosomes determined by gel filtration and HPLC and gel electrophoresis together with gel documentation were 30.51, 10.57 and 45.06 % and 23.47, 16.09 and 56.59 %, respectively. The anionic Tween 61 niosomes gave the highest entrapment efficiency of Gdm (45.06 and 56.59%). The morphology and particle sizes of these vesicular formulations were in bilayer structure and in nanosize ranges of 140-280 nm. The charge ratio of negative charge lipid (DP) in niosomes to Gdm was 500:1 in molar ratio. Chemical stability of Gdm entrapped in Tween 61 niosomes at 4 ± 2, 30 ± 2 and 45 ± 2 ^{o}C for 4 months was better than Gdm in solution. The percentage remaining of Gdm in niosomes was about 90-96 %, while Gdm remaining in the solution was in the range of 60-75%. Gdm entrapped in anionic niosomes which gave the highest entrapment efficiency was selected to perform antibacterial activity by disc diffusion method and surface inoculation technique against *P. acne* and *Staphylococcus aureus*. Gdm (30 μg), the positive controls (erythromycin), blank anionic niosomes and Gdm (26.7 μg) entrapped in anionic niosomes gave the inhibition zone diameters of 19, 7.5, 0 and 7 mm against *Propionibacterium acne* using disc diffusion method and 21, 0, 0 and 10 mm by surface inoculation technique. Gdm (30 μg), erythromycin, blank anionic niosomes and Gdm (26.7 μg) entrapped in anionic niosomes gave the inhibition zone diameters of 19, 7.5, 0 and 7 mm against *Staphylococcus aureus* by disc diffusion method and 27, 12.5, 0 and 17 mm by for surface inoculation technique, respectively. Erythromycin showed only slightly inhibition zone indicating the resistance of *P.acne*s to this antibiotic. The MIC and MBC values of Gdm 15 μg/μl were at 1/32 and 1/16 dilutions against *P. acne* and at 1/16 and 1/8 dilution against *S. aureus*. Gdm (15 μg/μl) entrapped in anionic niosomes showed the MIC and MBC values at 1/4 and 1/2 dilutions against *P. acne* and at 1/2 and 1/1 dilution against *S. aureus*. Although Gdm entrapped in anionic niosomes gave lower inhibition zone than erythromycin, it is not resistant to *P.acne*s. Gdm which entrapped in the niosomal formulations may be sustained released. The results from this study can be applied for the further development of Gdm for pharmaceutical and cosmeceutical uses.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การเก็บกักกัลลิเดอร์มินในถุงขนาดนาโนเพื่อใช้ทางยาและเวชสำอาง	
ผู้เขียน	นางสาว เพ็ญพรรณ ขันรินทร์	
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เภสัชกรรม)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ. ดร.อรัญญา มโนสร้อย	ประธานกรรมการ
	ศ. ดร.จีรเดช มโนสร้อย	กรรมการ
	ศ. ดร.รอล์ฟ จี เวอร์เนอร์	กรรมการ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเก็บกักกัลลิเดอร์มิน (Gdm) ในถุงขนาดนาโน (ไลโปโซมและนีโอโซม) เพื่อใช้ในทางยาและเวชสำอาง กัลลิเดอร์มินเป็นโพลีเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย มีความคงตัวทางเคมีต่ำเนื่องจากสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่พันธะคู่ในโครงสร้าง จึงเสื่อมสภาพและมีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต่ำ การนำกัลลิเดอร์มินมาเก็บกักในถุงขนาดนาโน (ไลโปโซมและนีโอโซม) สามารถช่วยลดปัญหานี้ได้ ได้ทำการหาสูตรที่ดีที่สุดเพื่อนำมาเก็บกักกัลลิเดอร์มินโดยนำเปปไทด์สามตัวที่มีประจุบวก (บาซิทราซิน) และประจุลบ (อินซูลินและ โบไวน์ซีรัมอัลบูมิน (BSA)) ที่พีเอช 7 มาใช้เป็นแบบจำลองเก็บกักในไลโปโซมชนิดไม่มีประจุ (ดีพีพีซี/คอเลสเตอรอล ที่อัตราส่วนโมลาร์ 1:1) ไลโปโซมประจุบวก (ดีพีพีซี/คอเลสเตอรอล/ดีดีเอบี ที่อัตราส่วนโมลาร์ 1:1:0.05) ไลโปโซมประจุลบ (ดีพีพีซี/คอเลสเตอรอล/ไดซิทิลฟอสเฟต ที่อัตราส่วนโมลาร์ 1:1:0.05) ทวีน 61 นีโอโซมชนิดไม่มีประจุ (ทวีน 61/คอเลสเตอรอล ที่อัตราส่วนโมลาร์ 1:1) ทวีน 61 นีโอโซมประจุบวก (ทวีน 61/คอเลสเตอรอล/ดีดีเอบี ที่อัตราส่วนโมลาร์ 1:1:0.05) ทวีน 61 นีโอโซมประจุลบ (ทวีน 61/คอเลสเตอรอล/ไดซิทิลฟอสเฟต ที่อัตราส่วนโมลาร์ 1:1:0.05) สแปน 60 นีโอโซมชนิดไม่มีประจุ (สแปน 60/คอเลสเตอรอล ที่อัตราส่วนโมลาร์ 1:1) สแปน 60 นีโอโซมประจุบวก (สแปน 60/คอเลสเตอรอล/ดีดีเอบี ที่อัตราส่วนโมลาร์ 1:1:0.05) และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สแปน 60 นีโอโซมประจุลบ (สแปน 60/คอเลสเตอรอล/ไดซิทิลฟอสเฟต ที่อัตราส่วนโมลาร์ 1:1:0.05) ได้ถูกเตรียมด้วยเทคนิคการเตรียมโดยวิธีการแบบทำให้แห้ง (FDEL) แล้วนำไปกระจายตัวในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่พีเอชเท่ากับ 7.0 BSA ถูกเก็บกักได้ในปริมาณสูงสุดคือ 72.94% ในทวีน 61 นีโอโซมชนิดไม่มีประจุ ในขณะที่บาซิทราซินและอินซูลินถูกเก็บกักได้ปริมาณสูงสุดคือ 90.88% ในทวีน 61 นีโอโซมชนิดประจุลบและ 87.15% ในทวีน 61 นีโอโซมชนิดประจุบวก ตามลำดับ สูตรของ ทวีน 61 นีโอโซมมีความคงตัวดีที่สุดเมื่อนำไปกระจายตัวใน ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่พีเอชเท่ากับ 5.4 โดยไม่เกิดการตกตะกอนเมื่อศึกษาเป็นเวลา 4 สัปดาห์ จึงนำ ทวีน 61 นีโอโซมนีโอโซมชนิดไม่มีประจุ นีโอโซมประจุบวกและนีโอโซมประจุลบ ที่กระจายตัวในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่พีเอชเท่ากับ 5.4 ไปเก็บกักกัลลิเดอร์มิน โดยปริมาณสูงสุดของกัลลิเดอร์มินที่สามารถเก็บกักในนีโอโซมชนิดไม่มีประจุ ประจุบวกและประจุลบเท่ากับ 30, 40 และ 59.75 มิลลิกรัมต่อกรัมรวมของสารลดแรงตึงผิวโดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพในการเก็บกักด้วยวิธีเจลฟิลเตรชันและหาปริมาณด้วย HPLC และด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟเรสซีสและเจลดอคูเมนเทชัน เท่ากับ 30.51, 10.57 และ 45.06 % และ23.47, 16.09 และ 56.59 % ตามลำดับ ซึ่งจากผลการศึกษาทั้งสองวิธีพบว่า นีโอโซมประจุลบให้ประสิทธิภาพในการเก็บกักกัลลิเดอร์มินสูงที่สุด จากการตรวจสอบลักษณะและขนาดอนุภาคของถุงขนาดนาโน โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) และเทคนิคการกระเจิงของแสง (DLS) พบว่า เป็นอนุภาคขนาดเล็กที่มีผนังสองชั้นที่มีขนาดอยู่ในช่วง 140-280 นาโนเมตร ได้นำกัลเดอร์มินที่เก็บกักในนีโอโซมประจุลบไปศึกษาหาอัตราส่วนระหว่างประจุที่เหมาะสมของประจุบวกของกัลลิเดอร์มินและประจุลบของนีโอโซมโดยใช้โพลีอะคริลามายด์ เจลอิเล็กโทรโฟเรสซีสและเจลดอคูเมนเทชัน พบว่าอัตราส่วนระหว่างประจุที่เหมาะสมที่สุดคือ กัลลิเดอร์มิน/นีโอโซมประจุลบ ที่อัตราส่วนโมลาร์ 1 : 500 ได้ศึกษาความคงตัวทางเคมีของกัลเดอร์มินที่เก็บกักในนีโอโซมที่อุณหภูมิ 4 ± 2 ^{o}C, 30 ± 2 ^{o}C และ 45 ± 2 ^{o}C เป็นเวลา 4 เดือน พบว่าทุกตำรับในทั้งสามอุณหภูมิไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพ ได้นำทุกตำรับมาวิเคราะห์หาปริมาณ Gdm ที่มีอยู่ในตำรับด้วย HPLC ทุก 1 เดือน เปรียบเทียบกับกัลลิเดอร์มินที่ไม่ได้เก็บกักในนีโอโซม พบว่า กัลเดอร์มินในสารละลายมีคงเหลือเพียง 60-75 % เท่านั้น ในขณะที่กัลลิเดอร์มินที่เก็บกักในนีโอโซมมีปริมาณคงอยู่สูงถึง 90-96 % แสดงว่ากัลลิเดอร์มินมีความคงตัวอยู่ในนีโอโซมทั้งสามชนิดที่อุณหภูมิต่างๆ จากผลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการเก็บกักพบว่า นีโอโซมประจุลบมีประสิทธิภาพสูงที่สุดจึงเลือกไปศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย *Propionicbcaterium acne. (P. acne)* และ *Staphylococcus aureus (S. aureus)*. เปรียบเทียบกับกัลลิเดอร์มินที่ไม่ได้เก็บกักและตัวยามาตรฐานอิริโธรมัยซินด้วยวิธี disc diffusion และเทคนิค surface inoculation พบว่ากัลลิเดอร์มิน (30 ไมโครกรัม) อิริโธรมัยซิน นีโอโซมประจุลบเปล่าและกัลลิเดอร์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

มิน (26.7 ไมโครกรัม) ที่เก็บกักในนีโอโซมประจุลบมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *P. acne* เกิดเคลียร์โซนกว้างเฉลี่ย 19, 7.5, 0 และ 7 มิลลิเมตรตามลำดับเมื่อทดสอบด้วยวิธี disc diffusion ตามลำดับ และเกิดเคลียร์โซนกว้างเฉลี่ย 21, 0, 0 และ 10 มิลลิเมตรตามลำดับเมื่อทดสอบด้วยเทคนิค surface inoculation ผลการยับยั้ง *S. aureus.* พบว่ากัลลิเดอร์มิน (30 ไมโครกรัม) อีริโธรมัยซิน นีโอโซมประจุลบเปล่าและกัลลิเดอร์มิน (26.7 ไมโครกรัม) ที่เก็บกักใน นีโอโซมประจุลบ เกิดเคลียร์โซนกว้างเฉลี่ย 19, 7.5, 0 และ 7 มิลลิเมตรตามลำดับเมื่อทดสอบด้วยวิธี disc diffusion ตามลำดับ และเกิดเคลียร์โซนกว้างเฉลี่ย 27, 12.5, 0 และ 17 มิลลิเมตรตามลำดับเมื่อทดสอบด้วยเทคนิค surface inoculation จากผลการศึกษาพบว่าอิริโธรมัยซิน เกิดเคลียร์โซนน้อยหรือไม่เกิดเคลียร์โซนเลย อาจเป็นเพราะว่าเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดดื้อต่ออิริโธรมัยซินจึงทำให้ไม่สามารถยับยั้งได้ ค่า MIC และ MBC ของกัลลิเดอร์มิน (15 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร) ที่ไม่ได้เก็บกักในนีโอโซมประจุลบต่อ *P. acne* และ *S. aureus* ที่ความเข้มข้นเจือจาง 1/32 และ 1/16 , 1/16 และ 1/8 ตามลำดับ กัลลิเดอร์มิน (15 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร) ที่เก็บกักในนีโอโซมประจุลบต่อ *P. acne* และ *S. aureus* ให้ฤทธิ์ที่ความเข้มข้นเจือจาง 1/4 และ 1/2 , 1/2 และ 1/1 ตามลำดับ ถึงแม้ว่ากัลลิเดอร์มินที่เก็บกักในนีโอโซมจะมีให้เคลียร์โซนที่น้อยกว่าอิริโธรมัยซิน แต่ *P. acne* ไม่ต้านต่อตัวยากัลลิเดอร์มิน อีกทั้งกัลลิเดอร์มินที่เก็บกักในนีโอโซมยังให้ผลในการออกฤทธิ์เนิ่นอีกด้วย ซึ่งจากผลการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์อย่างมากในการนำไปพัฒนาการเก็บกักกัลลิเดอร์มินเพื่อการใช้ประโยชน์ในทางยาและเวชสำอางต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved