รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสังเคราะห์สารไขมันประจุบวก เพื่อนำส่งยาไปยังเซลล์เป้าหมาย

บุญเอก ยิ่งยงณรงค์กุล

สิงหาคม 2557

สัญญาเลขที่ RMU5480003

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสังเคราะห์สารไขมันประจุบวก เพื่อนำส่งยาไปยังเซลล์เป้าหมาย

SYNTHESIS OF CATIONIC LIPIDS FOR DRUG DELIVERY TO TARGETED CELLS

ผศ.ดร.บุญเอก ยิ่งยงณรงค์กุล มหาวิทยาลัยรามคำแหง

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ได้พิจารณาให้ทุนเพิ่มขีดความสามารถด้านการวิจัยของอาจารย์รุ่นกลางในสถาบันอุดมศึกษา ทำให้งานวิจัยประสบความสำเร็จตามความมุ่งหมาย

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วันชัย อัศวลาภสกุล ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รองศาสตราจารย์ ดร.หม่อมหลวงเสาวรส สวัสดิวัฒน์ ศูนย์วิจัยธาลัสซีเมีย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อาทิตย์ ไชยร้องเดื่อ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และ รองศาสตราจารย์ ดร. ปราณีต โอปณะโสภิต คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่ได้ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสังเคราะห์

ผู้วิจัยขอขอบคุณ นายสุรศักดิ์ เขียวชอุ่ม ในการบันทึกข้อมูลทางอินฟราเรด (IR) น.ส.ณัฐธิสา นิยมธรรม ในการบันทึกข้อมูลทางนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR) และ น.ส.กัญญารัตน์ จันทร์แจ้ง ในการบันทึกข้อมูลทางแมสสเปกตรา (MS)

ขอขอบคุณผู้บริหาร อาจารย์ และเจ้าหน้าที่ของมหาวิทยาลัยรามคำแหง ที่ได้ให้การสนับสนุนและช่วยเหลือ ทำให้งานวิจัยดำเนินไปได้ด้วยดี

บุญเอก ยิ่งยงณรงค์กุล

ABSTRACT

Project Code: RMU5480003

Project Title: การสังเคราะห์สารไขมันประจุบวกเพื่อนำส่งยาไปยังเซลล์เป้าหมาย

Investigator: บุญเอก ยิ่งยงณรงค์กุล

E-mail Address: boonek@ru.ac.th

Objectives: เพื่อสังเคราะห์สารไขมันประจุบวก (cationic lipids) ชนิดใหม่ นำสารที่สังเคราะห์ได้มาทดสอบความสามารถในการจับ (bind) กับดีเอ็นเอ (DNA) และเพื่อทดสอบความสามารถของไขมันประจุบวกในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ นำไขมันประจุบวกที่มีประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ที่ดีมาใช้เป็นระบบนำส่งยาหรือสารออกฤทธิ์จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติไปยังเซลล์เป้าหมาย

Methodology: สังเคราะห์ด้วยวิธีการสังเคราะห์บนวัฏภาคของแข็ง ทดสอบประสิทธิภาพในการจับดีเอ็นเอ การพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ ทดสอบความเป็นพิษของสารต่อเซลล์ทดสอบ และนำส่งยาหรือสารออกฤทธิ์จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติไปยังเซลล์เป้าหมาย

Results: ได้สังเคราะห์ไขมันประจุบวกชนิดใหม่ทั้งหมด 34 สาร ซึ่งมีความหลากหลายทางโครงสร้าง นำสารทังหมดไปทดสอบประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ พบสาร 4 สาร มีประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ ได้ดีกว่าสารมาตรฐาน Lipofectamine^{TM} 2000 ไขมันประจุบวกที่มีคอเลสเตอรอลเป็นส่วนหางไม่มีขั้วสามารถกักเก็บสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เคอร์คูมิน และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเข้าเซลล์และฆ่าเซลล์มะเร็งได้สูงขึ้น 2-8 เท่า

Discussion and Conclusion: จากการประเมินประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของไขมันประจุบวกของแต่ละกลุ่ม ทำให้เข้าใจความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีขึ้น ไขมันประจุบวกที่มีประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอและสารธรรมชาติเข้าสู่เซลล์ได้ดี สามารถใช้เป็นสารนำในการศึกษาสารระบบนำส่งยาในการศึกษาขั้นต่อไป

Suggestion/ Further Implication/ Implementation: ควรทำการการปรับเปลี่ยนโครงสร้างสาร หรือสังเคราะห์สารที่มีโครงสร้างต่างออกไปเพื่อให้มีประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้ดีขึ้น ควรใช้สารนำ (lead compound) ไปศึกษาเป็นสารนำส่งยาในสัตว์ทดลองเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เป็นสารนำส่งยาต่อไป

Keywords: การสังเคราะห์บนวัฏภาคของแข็ง ไขมันประจุบวก ไลโปโซมประจุบวก การนำดีเอ็นเอ การนำส่งยา

ABSTRACT

Project Code: RMU5480003

Project Title: Synthesis of cationic lipids for drug delivery to targeted cells

Investigator: Boon-ek Yingyongnarongkul

E-mail Address: boonek@ru.ac.th

Objectives: To synthesize new cationic lipids by solid phase chemistry and evaluate their DNA binding and transfection efficiency and to use cationic liposome to deliver cytotoxic natural products into cancer cells

Methodology: Cationic lipids were synthesis by solid phase chemistry. DNA binding, transfection efficiency and cytotoxicity of the synthesized compounds were evaluated. Delivery of cytotoxic natural products into targeted cells using synthesized lipids was also studied.

Results: Thirty four cationic lipids with structural diversity have been synthesized. The synthesized lipids were tested for their transfection efficiency. Four compounds exhibited higher transfection efficiency than commercially available agents, Lipofectamine™ 2000. The cholesterol-based cationic lipid was able to encapsulate the natural products, curcumin. Liposomal curcumin exhibited 2–8 times higher cytotoxicity than free curcumin against cancer cells.

Discussion and Conclusion: Transfection efficiency evaluation of the synthesized compounds had led to a better understanding of structure-activity relationships of the synthesized cationic lipids. Cationic lipids with high DNA and natural products delivery efficiency could be used as lead compounds for further study for drug delivery system.

Suggestion/ Further Implication/ Implementation: Further work on structure modification of lead compounds or synthesis of novel cationic lipids for better transfection efficiency should be conducted. Further study of lead compound as *in vivo* drug delivery system should be carried out.

Keywords: Solid phase synthesis, cationic lipids, cationic liposome, DNA delivery, drug delivery

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ..... I

Abstract (ภาษาไทย)..... II

Abstract (ภาษาอังกฤษ)..... III

Executive Summary..... VII

การสังเคราะห์สารไขมันประจุบวก เพื่อนำส่งยาไปยังเซลล์เป้าหมาย..... 1

บทนำ..... 1

วัตถุประสงค์..... 3

โครงการย่อยที่ 1 การสังเคราะห์ไขมันประจุบวกที่มี aminoglycerol เป็นโครงสร้างหลัก..... 5

ผลการศึกษา..... 5

การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก **Aa**-**Gc**……..... 5

การศึกษาการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของไขมันประจุบวก..... 7

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์..... 8

วิธีการ..... 10

การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก **Aa**-**Ec**..... 10

การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก **Fa**-**Gc**..... 10

การเตรียมไลโปโซมและสารประกอบเชิงซ้อนไลโปโซมและดีเอ็นเอ..... 18

การศึกษาการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์..... 19

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์..... 19

สรุปผลการศึกษาและวิจารณ์ผล..... 19

เอกสารอ้างอิง..... 19

โครงการย่อยที่ 2 การสังเคราะห์ไขมันประจุบวกที่มีคอเลสเตอรอลเป็นโครงสร้างหลัก
สำหรับนำส่งเคอร์คูมินเข้าสู่เซลล์..... 23

ผลการศึกษา..... 23

วิธีการ..... 27

การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก **1**..... 27

การเตรียม *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-1,3-diaminopropane (**3**)..... 27

การสังเคราะห์ *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*N*′-(chloroacetyl)-1,3-diaminopropane
(**4**)..... 27

หน้า

การสังเคราะห์ 3β-Cholest-5-en-3-yl-*N*-(3-aminopropyl)carbamate (**6**)..... 28
การสังเคราะห์สาร **7**..... 28
การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก **1**..... 29
การเตรียม liposome-encapsulated curcumin..... 29
การหา Curcumin encapsulation efficiency..... 29
Cell cultures..... 30
Cell uptake studies..... 30
Cytotoxicity assays..... 30
เอกสารอ้างอิง..... 30

โครงการย่อยที่ 3 ผลของสารผสมไขมันประจุบวกที่มีต่อประสิทธิภาพในการ พาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์..... 35
ผลการศึกษา..... 35
วิธีการ..... 39
การเตรียมไลโปโซมและสารประกอบเชิงซ้อนไลโปโซมและดีเอ็นเอ..... 39
การศึกษาการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์..... 40
การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์..... 40
สรุปผลการศึกษาและวิจารณ์ผล..... 40
เอกสารอ้างอิง..... 40

โครงการย่อยที่ 4 การสังเคราะห์และประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของไขมันประจุบวกที่มีโครงสร้างส่วนกลางที่หลากหลาย..... 43
ผลการศึกษา..... 43
การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก **Ax-Dz**..... 44
การศึกษาการจับดีเอ็นเอของไขมันประจุบวก **Ax-Dz**..... 46
การศึกษาการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของไขมันประจุบวก **Ax-Dz**..... 47
ผลของซีรัมต่อประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์..... 48
ความเป็นพิษต่อเซลล์ของไขมันปรจุบวก..... 49
วิธีการ..... 51
การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก **Ax-Az**..... 51
การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก **Bx-Dz**..... 51

หน้า

การเตรียมไลโปโซม..... 52
ไลโปโซมเตรียมจากไขมันประจุบวก..... 52
ไลโปโซมเตรียมจากไขมันประจุบวกผสม DOPE……..... 52
การเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนไลโปโซมและดีเอ็นเอ..... 52
การศึกษาการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์……..... 52
การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์..... 53
สรุปผลการศึกษาและวิจารณ์ผล..... 53
เอกสารอ้างอิง……..... 53

ภาคผนวก

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ..... 56
Reprint ผลงานวิจัย และ Manuscript..... 57

EXECUTIVE SUMMARY

การสังเคราะห์สารไขมันประจุบวก เพื่อนำส่งยาไปยังเซลล์เป้าหมาย

โครงการวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มย่อย ผลงานวิจัยที่ได้ดำเนินการมาในรอบ 3 ปีมีดังนี้

1. การสังเคราะห์ไขมันประจุบวกที่มี di(hydroxyethyl)amino เป็นโครงสร้างหลัก

ในการสังเคราะห์ไขมันประจุบวกที่มี di(hydroxyethyl)amino เป็นโครงสร้างหลัก ด้วยเทคนิคการสังเคราะห์บนวัฏภาคของแข็งได้ 21 สาร การหาเอกลักษณ์ของสารดังกล่าวอาศัยข้อมูลทาง IR ^{1}H NMR และ MS สเปกโทรสโกปี จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าไขมันประจุบวก 5 ชนิด คือ **Fb-Gc** แสดงประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ HeLa ไขมันประจุบวก **Ga** แสดงประสิทธิ์ภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ HeLa ได้ดีที่สุด ซึ่งมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับสารเกรดการค้า Lipofectamine™ 2000 นอกจากนี้ไขมันประจุบวกชนิดนี้ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์

2. การสังเคราะห์ไขมันประจุบวกที่มีคอเลสเตอรอลเป็นโครงสร้างหลักสำหรับนำส่งเคอร์คูมินเข้าสู่เซลล์

ได้ทำการสังเคราะห์ไขมันประจุบวกชนิดใหม่ที่มี cholesterol เป็นส่วนหางไม่มีขั้ว พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารดังกล่าวอาศัยข้อมูลทาง IR ^{1}H NMR และ MS สเปกโทรสโกปี ไลโปโซมเตรียมจากไขมันประจุบวกผสม DOPE มีประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมินได้ 68% ไลโปโซมชนิดนี้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการคงตัว และเพิ่มประสิทธิภาพในการเข้าสู่เซลล์ของเคอร์คูมินได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ยังพบว่าเคอร์คูมินที่ถูกกักเก็บในไลโปโซมมีประสิทธิภาพในการฆ่าเซลล์มะเร็ง HeLa, A549, HepG2, K562 และ 1310 ได้ดีกว่าการใช้เคอร์คูมินถึง 2-8 เท่า และไลโปโซมที่ใช้นี้ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบโดยมีค่า ED_{50} ที่ 90-210 μM

3 ผลของสารผสมไขมันประจุบวกที่มีต่อประสิทธิภาพในการ พาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์

จากการศึกษาผลของสารผสมไขมันประจุบวกต่อประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ พบว่าไลโปโซมผสม **Ga** และ **Ab** ซึ่งมีส่วนของส่วนหัวมีขั้ว โครงสร้างส่วนกลาง และ ส่วนหางไม่มีขั้วที่ต่างกัน สามารถออกฤทธิ์เสริมกัน ซึ่งมีประสิทธิภาพดีกว่าสารเกรดการค้า Lipofectamine™2000 มากกว่า 3 เท่า ไลโปโซมผสม **Ga** และ **Ab** มีประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้ดีกว่าไลโปโซมที่เตรียมจาก **Ga** และ **Ab** เดี่ยว ๆ ถึง 6 และ 17 เท่า ตามลำดับ นอกจากนี้ไขมันประจุบวกผสมนี้มีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่าสารมาตรฐาน Lipofectamine™ 2000

4 การสังเคราะห์และประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของไขมันประจุบวกที่มีโครงสร้างส่วนกลางที่หลากหลาย

ในการสังเคราะห์ไขมันประจุบวกที่มี spermine เป็นส่วนหัวมีขั้ว และมีโครงสร้างส่วนกลางที่ต่างกัน 4 ชนิดคือ di(hydroxyethyl)-amino, carbonyl-di(hydroxyethyl)amino, aminoglycerol และ 2-amino-1,3-propaindiol ด้วยเทคนิคการสังเคราะห์บนวัฏภาคของแข็งได้ 12 สาร การหาเอกลักษณ์ของสารดังกล่าวอาศัยข้อมูลทาง IR ^{1}H NMR และ MS สเปกโทรสโกปี จากการศึกษาผลของโครงสร้างส่วนกลางของไขมันประจุบวกต่อประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ พบว่าไขมันประจุบวกที่มีโครงสร้างส่วนกลางทั้งสี่ชนิดจำเป็นต้องใช้ไขมันตัวช่วย (DOPE) เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอได้สูง ไขมันประจุบวก Cy และ Cz ซึ่งมี aminoglycerol เป็นโครงสร้างส่วนกลางมีประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้ดีในสภาวะไม่มีซีรัม ในขณะที่ไขมันประจุบวก **Dx** ซึ่งมี 2-amino-1,3-propanediol เป็นโครงสร้างส่วนกลางมีประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้ดีในสภาวะมีซีรัม และมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าสารมาตรฐาน Lipofectamine^{TM} 2000 ไขมันประจุบวกทั้งสามชนิดนี้ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์

การสังเคราะห์สารไขมันประจุบวก เพื่อนำส่งยาไปยังเซลล์เป้าหมาย

บทนำ

ในปัจจุบันมนุษย์ได้มีการพัฒนาวิธีการต่างๆในการป้องกันและรักษาโรคภัยไข้เจ็บต่างๆ ในที่นี้รวมถึงการพัฒนาตัวยาชนิดใหม่ๆทั้งจากการสังเคราะห์ทางเคมี และการหาสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติ โรคร้ายต่างๆที่เกิดขึ้นนั้นมีหลายสาเหตุ เกิดได้จากสารเคมี หรือจากเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ แต่สาเหตุของโรคดังกล่าวสามารถป้องกันหรือแก้ไขได้ สำหรับโรคที่เกิดจากพันธุกรรม เป็นโรคที่ป้องกันยากและการรักษาต้องแก้ที่รหัสพันธุกรรม (DNA) ด้วยวิทยาการที่ก้าวไกลการรักษาระดับ DNA ก็มีทางเป็นไปได้ ซึ่งวิธีการรักษาระดับ DNA มีวิธีการหลักอยู่ 3 วิธี ดังนี้

1. Antigene Therapy[1-6] เป็นวิธีการที่มีการพา oligonucleotide เข้าสู่นิวเคลียส เพื่อที่เข้าไปจับกับ DNA ที่มีความผิดปกติ DNA นี้ก็ไม่สามารถถอดรหัส เพื่อสังเคราะห์โปรตีนที่ผิดปกติได้

2. Antisense Therapy[7-10] เป็นวิธีการที่มีการพา oligonucleotide เข้าสู่เซลล์ เพื่อที่เข้าไปจับกับ mRNA ที่ผิดปกติ เมื่อ mRNA เกิดการรวมตัวเป็นสายคู่ (duplex) บางส่วนกับ oligonucleotide mRNA นี้ก็ไม่สามารถผ่านขบวนการ translation ในการผลิตโปรตีนได้ และ mRNA นี้ก็จะถูกทำลายโดย nuclease ที่มีอยู่ในเซลล์

3. Gene Correction[11-14] เป็นการพาชิ้นส่วน DNA บางส่วนเข้าไปในนิวเคลียสเพื่อไปแทนที่ส่วนที่ผิดปกติ โดยเกิดผ่านขบวนการ trans-splicing ก็จะได้ DNA ที่มีความปกติกลับมา

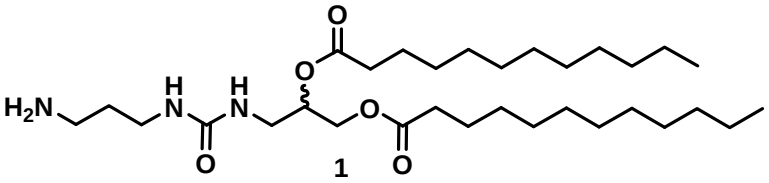
สิ่งสำคัญอย่างหนึ่งที่จะทำให้วิธีการรักษาโรคทางพันธุกรรม หรือ Gene Therapy (โดยผ่านขบวนการทั้งสามชนิด) จะประสบความสำเร็จได้คือ ตัวพา (vector) ซึ่งตัวพามีอยู่ 2 วิธีหลักคือ 1) viral vector[15,16] เป็นเทคนิคการใช้ไวรัสเป็นตัวพา DNA เข้าสู่เซลล์ วิธีการนี้จะมีประสิทธิภาพสูง แต่มีปัญหาเกี่ยวกับภูมิคุ้มกันบกพร่อง 2) non-viral vector[17] เป็นเทคนิคที่ไม่ใช้ไวรัสเป็นตัวพา DNA เข้าสู่เซลล์ ซึ่งมีอยู่ด้วยกันหลายวิธี เช่น micro injection,[18] electroporation,[19] calcium phosphate,[20] cationic lipid[21] และ dendrimer ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดีและข้อเสียต่างกันไป cationic lipid เป็นวิธีการหนึ่งที่มีความเป็นไปได้สูงที่จะประยุกต์ใช้สำหรับ gene therapy ทั้งนี้เมื่อเทียบกับ viral vector แล้ว cationic lipid สามารถพา DNA ที่มีขนาดใหญ่กว่าเข้าสู่เซลล์ได้ วิธีการเตรียมไม่ยุ่งยาก และไม่มีผลข้างเคียง หรือเป็นพิษกับเซลล์

เนื่องจากไลโปโซมมีสมบัติในการสลายตัวได้ (biodegradable) ไม่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย และสามารถที่นำพา (carry) ตัวยาทั้งที่มีขั้วและไม่มีขั้วได้ จึงมีการพัฒนาการใช้ไลโปโซมเป็นระบบนำส่งยา โดยเฉพาะยาต้านมะเร็ง[22-25] ซึ่งการใช้ไลโปโซมเป็นระบบนำส่งยาได้ถูกพัฒนาจนเป็นผลิตภัณฑ์และกำลังอยู่ระหว่างทำ clinical trials อีกจำนวนหนึ่ง[24]

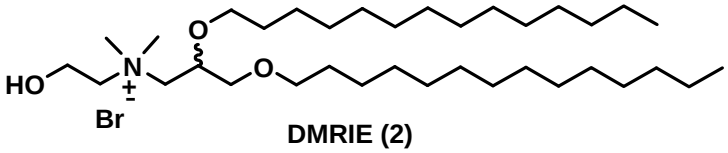
ส่วนประกอบของไขมันประจุบวกประกอบไปด้วยสามส่วนสำคัญคือ ส่วนหัวประจุบวก (cationic head) ส่วนไขมันส่วนหาง (hydrophobic tail) และ ส่วนตัวเชื่อม (linker) ส่วนหัวประจุบวกมีได้ตั้งแต่ประจุเดียวจนถึงหลายประจุ ส่วนมากส่วนหัวประกอบด้วยเอมีนชนิดต่างๆ หรือกัวนิดีน (guanidine) ส่วนไขมัน

ส่วนหาง ประกอบด้วยสองกลุ่มหลักคือ กลุ่ม long-chain fatty acid จำนวน หนึ่งหรือสองสายโซ่ และกลุ่มสเตียรอยด์ เช่น cholesterol หรือ bile acid สำหรับส่วนตัวเชื่อม (linker) คือพันธะเคมีที่เชื่อมต่อระหว่างส่วนหัวประจุบวกและส่วนไขมันส่วนหาง โดยพันธะดังกล่าวเป็นได้ทั้งพันธะที่ย่อยสลายได้ง่าย เช่น พันธะเอสเทอร์ และ เอไมด์ และพันธะที่ย่อยสลายได้ยาก เช่น พันธะอีเธอร์

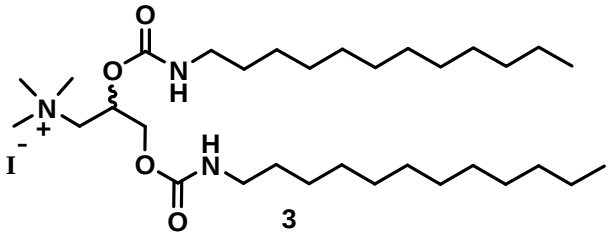
การสังเคราะห์เพื่อปรับเปลี่ยนส่วนต่างๆ ทำให้ได้ไขมันประจุบวกชนิดต่างๆที่มีประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ที่แตกต่างกัน ไขมันประจุบวก **1**–**6**[21,26-30] เป็นตัวอย่างของไขมันประจุบวกที่ใช้อะมิโนกรีเซอรอล (aminoglycerol) เป็นโครงสร้างหลัก ซึ่งไขมันประจุบวกที่ได้มีโครงสร้างของส่วนหางไม่มีขั้วเป็นแบบไม่สมมาตร ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะสังเคราะห์ไขมันประจุบวกที่มีส่วนหางไม่มีขั้วเป็นแบบสมมาตร การสังเคราะห์นี้จะใช้ di(hydroxyethyl)amino เป็นโครงสร้างหลัก ในการสังเคราะห์นี้จะทำการปรับเปลี่ยนส่วนหัวประจุบวกและส่วนไขมันส่วนหาง เพื่อให้ได้ไขมันประจุบวกมีความหลากหลายทางโครงสร้าง



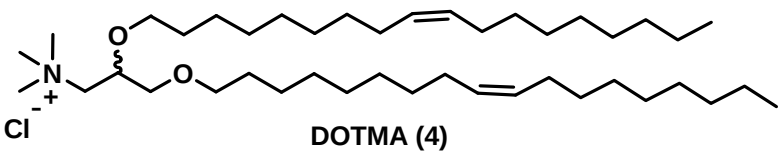
1



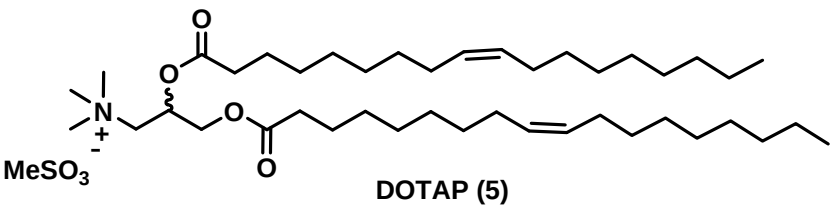
DMRIE (2)



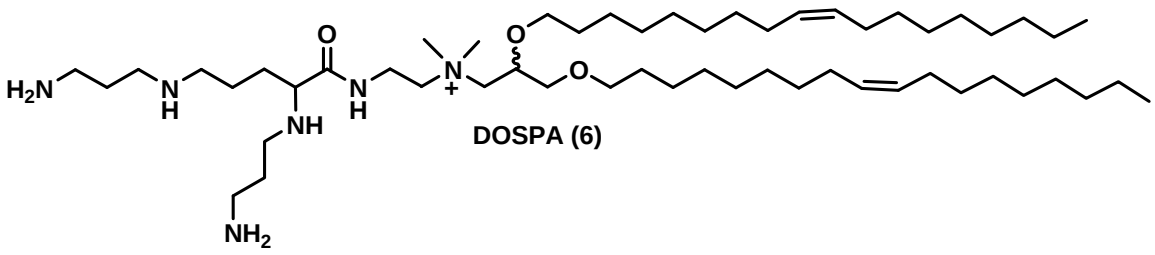
3



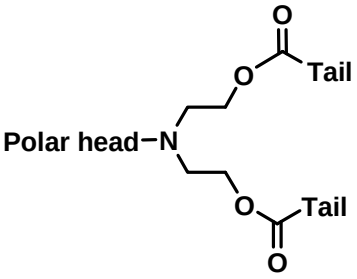
DOTMA (4)



DOTAP (5)



DOSPA (6)



di(hydroxyethyl)amino-based cationic lipid

เนื่องจากการพายีนเข้าสู่เซลล์ประกอบด้วยหลายขั้นตอน ดังนั้นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและฤทธิ์ทางชีวภาพจึงทำได้ยาก ไขมันประจุบวกเป็นสารที่มีขั้วสูง ทำให้การสังเคราะห์แบบธรรมดา ต้องใช้เวลามากในการสังเคราะห์สารแต่ละตัว การสังเคราะห์โดยใช้เทคนิค การสังเคราะห์บนวัฏภาคของแข็ง จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถใช้สังเคราะห์ไขมันประจุบวก ที่มีความหลากหลายทางโครงสร้างในเวลาอันสั้นได้ คณะผู้วิจัยจึงมีจุดประสงค์ที่จะใช้วิธีการสังเคราะห์บนวัฏภาคของแข็ง มาใช้สังเคราะห์สารไขมันประจุบวก เนื่องจากการสังเคราะห์บนวัฏภาคของแข็งเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูงในการสังเคราะห์สาร รวมทั้งลดขั้นตอนในการทำสารให้บริสุทธิ์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อสังเคราะห์สาร ไขมันประจุบวก (cationic lipids) ชนิดใหม่
2. เพื่อนำสารที่สังเคราะห์ได้มาทดสอบความสามารถในการจับ (bind) กับดีเอ็นเอ (DNA)
3. ทดสอบความสามารถของไขมันประจุบวกในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์
4. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่สังเคราะห์ได้
5. เพื่อเลือกไขมันประจุบวกที่มีประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ที่ดี มาทดสอบการนำส่งยาหรือสารออกฤทธิ์ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติหรือเอนาลอกไปยังเซลล์เป้าหมาย
6. เพื่อประเมินศักยภาพการนำไปพัฒนาใช้ในอนาคต

โครงการย่อยที่ 1
การสังเคราะห์ไขมันประจุบวกที่มี di(hydroxyethyl)amino เป็นโครงสร้างหลัก

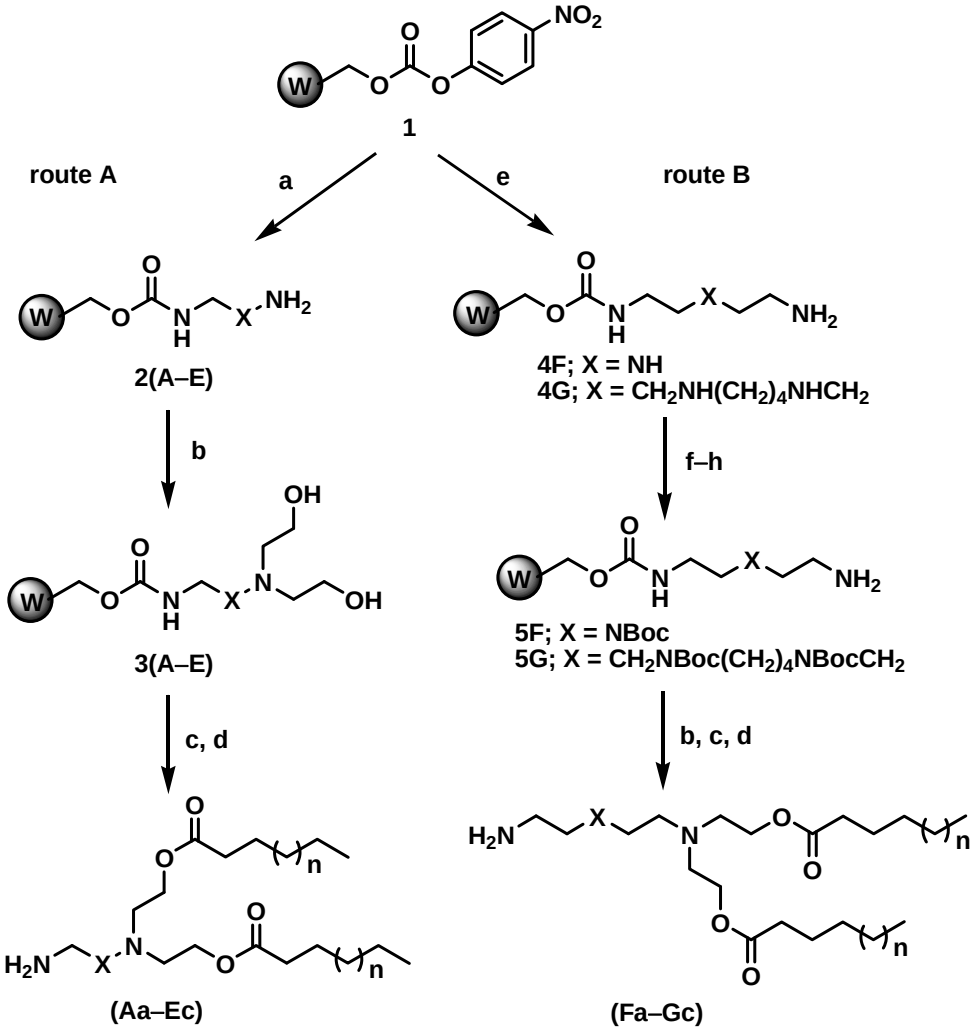
โครงการย่อยที่ 1

การสังเคราะห์ไขมันประจุบวกที่มี di(hydroxyethyl)amino เป็นโครงสร้างหลัก

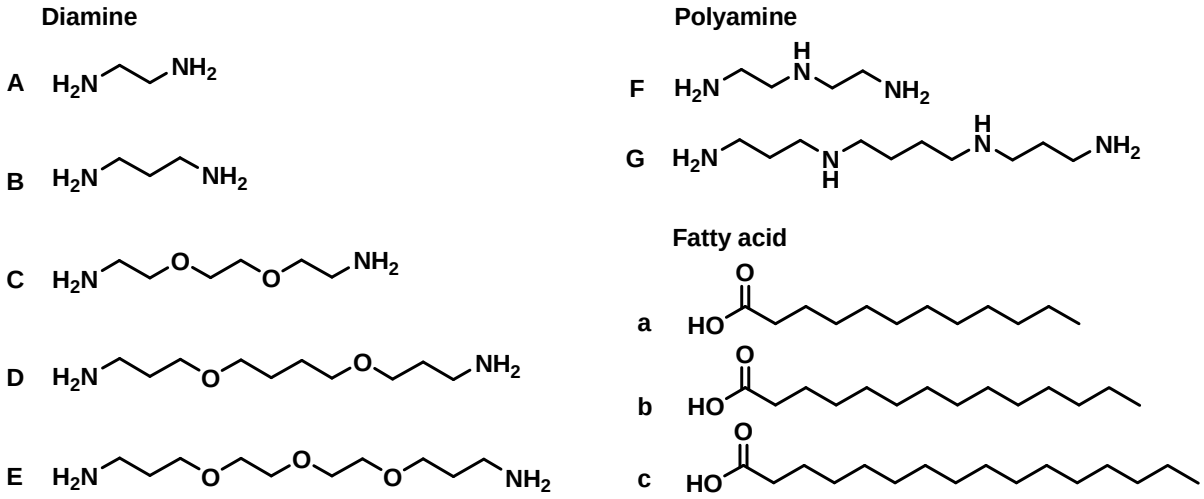
ผลการศึกษา

การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก Aa-Gc

การสังเคราะห์สารไขมันประจุบวก (cationic lipid) ที่มี di(hydroxyethyl)amino เป็นโครงสร้างหลักด้วยเทคนิคทาง solid phase synthesis แสดงดัง Scheme 1 การสังเคราะห์มีสองแนวทางขึ้นกับชนิดของ amine หรือ polyamine (รูปที่ 1) ที่ใช้ คือ แนวทางที่ 1 (route A) ใช้สังเคราะห์ไขมันประจุบวก **Aa**–**Ec** และแนวทางที่ 2 (route B) ใช้สังเคราะห์ไขมันประจุบวก **Fa**–**Gc**



Scheme 1.1. *Reagents and conditions*: a) diamines **A-E** (excess) (ดูรูปที่ 1.1), CH_2Cl_2; b) bromoethanol, DIEA, DMF; c) fatty acids **a**–**c** (ดูรูปที่ 1), DIC, CH_2Cl_2, DMF; d) 20% TFA, CH_2Cl_2; e) polyamines **F** and **G** (excess) (ดู รูปที่ 1.1), CH_2Cl_2; f) Dde-OH, CH_2Cl_2, MeOH; g) Boc_2O, pyridine, CH_2Cl_2; h) 2% N_2H_4, DMF.



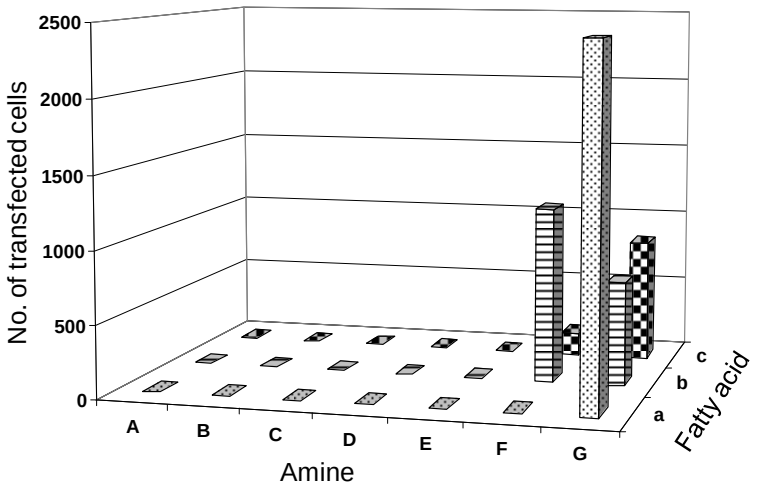
รูปที่ 1.1 โครงสร้างของ diamine, polyamine และ fatty acid ที่ใช้ใน Scheme 1

การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก **Aa**–**Ec** เริ่มจากนำ resin **1** มาทำปฏิกิริยากับ diamine **A**–**E** ที่มากเกินพอในตัวทำละลาย CH_2Cl_2 เป็นเวลา 16 ชั่วโมงได้ resin **2(A–E)** หลังจากการล้างตามปกติ สามารถยืนยันว่ามีหมู่เอมีนอิสระอีกด้านหนึ่งโดยการทดสอบด้วยสารทดสอบ ninhydrin[31] ซึ่งในที่นี้จะให้สารละลายสีน้ำเงินเข้ม นำ resin **2(A–E)** มาทำปฏิกิริยากับ bromoethanol โดยมี DIEA เป็นเบสได้ resin **3(A–E)** ทดสอบการเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ด้วยสารทดสอบ ninhydrin จะให้ผลเป็นลบ นำ resin ที่ได้มาล้างตามปกติ แบ่ง resin **3(A–E)** ออกเป็น 3 ส่วน แต่ละส่วนนำไปทำปฏิกิริยากับ long-chain fatty acid แต่ละชนิด (ดูรูปที่ 1.1) โดยใช้ diisopropylcarbodiimide (DIC) เป็น coupling reagent และใช้ N,N-dimethylaminopyridine (DMAP) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ล้าง resin ที่ได้สะอาดดีแล้ว นำมาทำปฏิกิริยากับ 20% TFA ในตัวทำละลาย CH_2Cl_2 นาน 2 ชั่วโมง หลังจากระเหยตัวทำละลายออกจะได้ผลิตภัณฑ์ **Aa**–**Ec**

การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก **Fa**–**Gc** (Scheme 1.1, route B) ทำเช่นเดียวกับการสังเคราะห์ไขมันประจุบวก **Aa**–**Ec** แต่ต้องเพิ่มขั้นตอนการใส่และการกำจัดหมู่ป้องกัน การสังเคราะห์เริ่มจากนำ resin **1** มาทำปฏิกิริยากับ polyamine **F** และ **G** ในตัวทำละลาย CH_2Cl_2 นาน 16 ชั่วโมง ได้ resin **4F** และ **4G** ซึ่งมีหมู่ amino ชนิด ปฐมภูมิ และ ทุติยภูมิ ทำการป้องกันหมู่ amino ชนิดปฐมภูมิด้วยหมู่ป้องกัน Dde[32] และหมู่ amino ชนิดทุติยภูมิด้วยหมู่ป้องกัน Boc หลังจากนั้นกำจัดหมู่ป้องกัน Dde ออกด้วย 2% N_2H_4 ได้ resin **5F** และ **5G** จากนั้นนำ resin **5F** และ **5G** มาทำปฏิกิริยากับ bromoethanol ต่อด้วยการทำ esterification หลังจาก cleavage ได้ผลิตภัณฑ์ **Fa**–**Gc** ตามต้องการ วิเคราะห์โครงสร้างของไขมันประจุบวกที่สังเคราะห์ได้ด้วย IR, NMR และ MS

การศึกษาการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของไขมันประจุบวก

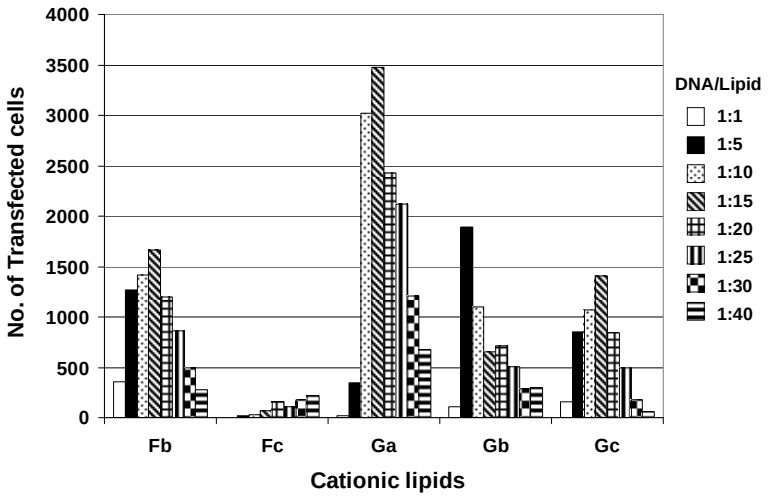
เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและฤทธิ์การพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ นำไขมันประจุบวก Aa-Gc ทดสอบประสิทธิ์ภาพในการพาดีเอ็นเอที่มี green fluorescence protein (GFP) เป็นยีนรายงานผล เข้าสู่ human cervical cancer (HeLa) เซลล์ นำไขมันประจุบวกมาเตรียมเป็นไลโปโซม โดยเตรียมแบบใช้และไม่ใช้ egg phosphatidylcholine (EPC) เป็นไขมันตัวช่วย อัตราส่วนของดีเอ็นเอต่อไลโปโซมโดยน้ำหนักที่ทดสอบเบื้องต้นคือ 1:20 ในการทดลองนี้ใช้ Lipofectamine™2000 เป็นสารเปรียบเทียบ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 2 จากผลการทดลองพบว่าไขมันประจุบวกที่ไม่ใช้ EPC เป็นไขมันตัวช่วย ไม่แสดงประสิทธิ์ในกการพาดีเอ็นเอเข้าสู่ซลล์ (ไม่ได้แสดงไว้ในรูปที่ 2) ไขมันประจุบวกที่มีไฮโดรคาร์บอนและอีเธอร์เป็น spacer (lipids **Aa**-**Ec**) ไม่มีประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ สำหรับไขมันประจุบวกที่สังเคราะห์จากพอลิเอมีน **F** และ **G** แสดงประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ จากการทดสอบเบื้องต้นสรุปว่าชนิดของเอมีนที่ใช้ในการสังเคราะห์ไขมันประจุบวกชนิดใหม่ที่มี di(hydroxyethyl)amino เป็นโครงสร้างหลักมีผลต่อประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์



รูปที่ 1.2 ประสิทธิภาพของไขมันประจุบวก Aa-Gc ในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์

เพื่อศึกษาหาอัตราส่วนระหว่างดีเอ็นเอและไขมันประจุบวกที่ทำให้มีประสิทธิ์ภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้สูงที่สุด จึงนำไขมันประจุบวก **Fb**-**Gc** มาผสมกับดีเอ็นเอที่อัตราส่วนต่างๆ โดยมีปริมาณดีเอ็นเอคงที่ (1 μg/well) และปรับเปลี่ยนอัตราส่วนของดีเอ็นเอต่อไลโปโซมจาก 1:1 ถึง 1:40 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3 ไขมันประจุบวก **Fb**, **Ga** และ **Gc** มีประสิทธิ์ภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ดีที่สุดที่อัตราส่วนของดีเอ็นเอต่อไลโปโซม 1:15 ในขณะที่อัตราส่วนของดีเอ็นเอต่อไลโปโซมที่ 1:5 ทำให้ไขมันประจุบวก **Gb** มีประสิทธิภาพดีที่สุด ไขมันประจุบวก **Ga** ซึ่งส่วนหางไม่มีขั้ว 12 คาร์บอน มีประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้ดีที่สุด (จำนวน transfected cell = 3480 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร) ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน Lipofectamine™2000 (จำนวน transfected cell = 3525 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร) เมื่อเปรียบเทียบ

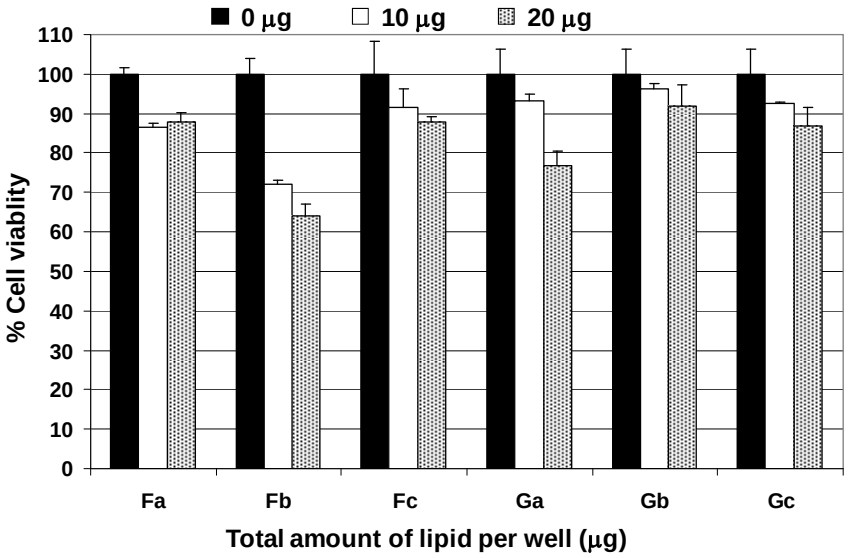
สารในกลุ่มเดียวกัน ไขมันประจุบวก **Gc** มีประสิทธิภาพต่ำที่สุด ผลการทดลองนี้ตรงกับผลการทดลองที่เคยมีรายงานไว้ คือไขมันประจุบวกที่ส่วนไม่มีขั้วมีจำนวนคาร์บอนสั้นกว่ามีประสิทธิดีกว่า[27,28]



รูปที่ 1.3 ผลของอัตราส่วนของดีเอ็นเอต่อไขมันประจุบวกที่มีต่อการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์

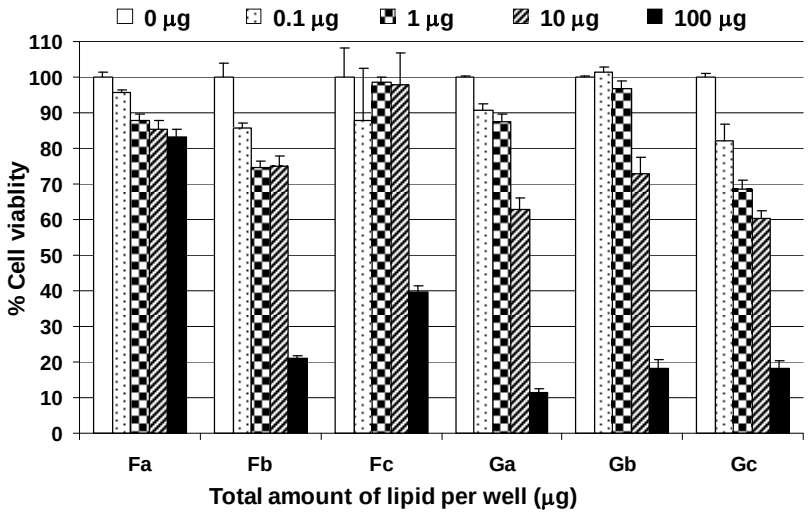
การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์

สิ่งที่ต้องคำนึงถึงในการศึกษาสารพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์คือความเป็นพิษต่อเซลล์ นำไขมันประจุบวก **Fa**-**Gc** ผสมกับดีเอ็นเอ และศึกษาความเป็นพิษกับเซลล์ HeLa โดยวิธี MTT ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4 ที่อัตราส่วนของดีเอ็นเอต่อไลโปโซม 1:20 มีจำนวน cell survival มากกว่า 75% ในขณะที่จำนวน cell survival มากกว่า 85% ที่อัตราส่วนของดีเอ็นเอต่อไลโปโซม 1:10 (ยกเว้น **Fb**) ดังนั้นไขมันประจุบวกที่มี di(hydroxyethyl)amino เป็นโครงสร้างหลักไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ในการใช้เป็นสารพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ เมื่อจำนวนคาร์บอนสั้นลงความเป็นพิษต่อเซลล์เพิ่มขึ้นเล็กน้อย[33] ในการศึกษานี้ไม่ได้ทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของ Lipofectamine^{TM}2000 แต่จากข้อมูลที่มีรายงานพบว่า Lipofectamine^{TM}2000 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่าไขมันประจุบวก[34-36] และ พอลิเมอร์ประจุบวก[37]



รูปที่ 1.4 ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารประกอบเชิงซ้อนของไลโปโซมและดีเอ็นเอ

ได้ทำการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของไลโปโซม ต่อ HeLa เซลล์ โดยไลโปโซมเตรียมจากไขมันประจุบวก **Fa**-**Bc** และ EPC ในอัตราส่วน 1:3 โดยโมล ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 1.5 และตารางที่ 1.1 จากผลการทดลองพบว่าค่า IC_{50} ของไลโปโซมมีค่าสูงกว่าปริมาณของไลโซมสำหรับใช้พาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ที่มีประสิทธิภาพสูง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไขมันประจุบวกที่มี di(hydroxyethyl)amino เป็นโครงสร้างหลักไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์และเหมาะสำหรับใช้ในการนำส่งดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์



รูปที่ 1.5 ความเป็นพิษต่อเซลล์ของไลโปโซม

ตารางที่ 1.1 ค่า IC_{50} ของไลโปโซมที่เตรียมจากไขมันประจุบวกและ EPC ต่อ HeLa เซลล์

ไลโปโซม	IC50 (μg per well)
Fa	420.9
Fb	50.3
Fc	82.0
Ga	32.3
Gb	46.4
Gc	29.3

วิธีการ

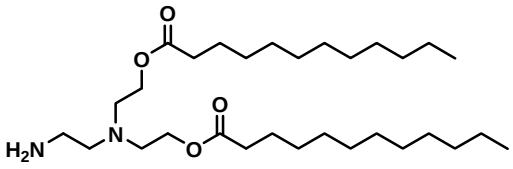
1. การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก Aa-Ec

นำ resin **1** (1 equiv) มาทำปฏิกิริยากับ diamine **A-E** (ดูรูปที่ 1.1) ที่มากเกินพอในตัวทำละลาย CH_2Cl_2 (10 mL) ทำปฏิกิริยาข้ามคืน ล้าง resin **2(A-E)** ที่ได้ด้วย CH_2Cl_2, DMF, MeOH, DMF และ CH_2Cl_2 (3 × 10 mL) ทำให้ resin **2(A-E)** แห้งภายใต้สุญญากาศ นำ resin **2(A-E)** ที่ได้มาทำปฏิกิริยากับ 2-bromoethanol ที่มากเกินพอ โดยมี DIEA (20 equiv) เป็นเบสในตัวทำละลาย DMF ทำปฏิกิริยาข้ามคืน ล้าง resin ที่ได้ด้วย CH_2Cl_2, DMF, MeOH, DMF และ CH_2Cl_2 (3 × 5 mL) ได้ resin **3(A-E)** แบ่ง resin **3(A-E)** ออกเป็น 3 ส่วน แต่ละส่วนไปทำปฏิกิริยากับสารละลายผสมของ fatty acid (4 equiv) (ดูรูปที่ 1.1) DIC (4 equiv) และ DMAP ในตัวทำละลายผสม CH_2Cl_2/DMF (4 : 1) ทำปฏิกิริยาข้ามคืน ล้าง resin ที่ได้ด้วย CH_2Cl_2, MeOH, DMF, MeOH and CH_2Cl_2 (3 × 3 mL) นำ resin ที่ล้างสะอาดแล้วมาเติม 20 % TFA ใน CH_2Cl_2 (1.5 ml) เขย่าสารผสมนาน 2 ชั่วโมง กรองและเก็บส่วนสารละลาย ล้าง resin ด้วย CH_2Cl_2 2 ครั้ง เก็บสารละลายที่ได้รวมกัน ระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยการผ่านก๊าซไนโตรเจน และระเหยซ้ำภายใต้ลดความดันนาน 2 ชั่วโมง ได้ไขมันประจุบวก **Aa-Ec**

2. การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก Fa–Gc

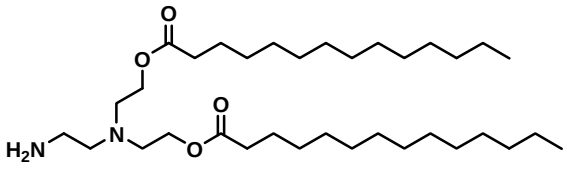
นำ resin **1** (1 equiv) มาทำปฏิกิริยากับ polyamine **F** และ **E** (ดูรูปที่ 1.1) ที่มากเกินพอในตัวทำละลาย CH_2Cl_2 (10 mL) ทำปฏิกิริยาข้ามคืน ล้าง resin **4F** และ **4G** ที่ได้ด้วย CH_2Cl_2, DMF, MeOH, DMF และ CH_2Cl_2 (3 × 10 mL) ทำให้ resin **4F** และ **4G** แห้งภายใต้สุญญากาศ นำ resin **4F** และ **4G** ที่ได้ มาทำปฏิกิริยากับ Dde-OH ที่มากเกินพอในตัวทำละลาย DMF (5 mL) เขย่าสารผสมข้ามคืน ล้าง resin ที่ได้จนสะอาด นำ resin ที่ได้ มาทำปฏิกิริยาต่อกับ di-*tert*-butyl dicarbonate (6 equiv) และ pyridine (20 equiv) ใน CH_2Cl_2 (5 mL) เขย่าปฏิกิริยาข้ามคืน ล้าง resin ที่ได้ด้วย CH_2Cl_2, MeOH และ CH_2Cl_2 (3 × 5 mL). หลังจากนั้นกำจัดหมู่

ป้องกัน Dde ออกโดยทำปฏิกิริยากับ 2% N_2H_4 ใน DMF (5 mL) นาน 30 นาทีเป็นจำนวน 2 รอบ ล้าง resin **5F** และ **5G** ที่ได้ด้วย CH_2Cl_2, DMF, MeOH, DMF และ CH_2Cl_2 (3 × 5 mL) นำ resin **5F** และ **5G** มาทำปฏิกิริยากับ 2-bromoethanol เช่นเดียวกับการเตรียมไขมันประจุบวก **Aa-Ec** ตามด้วยการทำปฏิกิริยา esterification และ cleavage ด้วย TFA ได้ไขมันประจุบวก **Fa-Gc** ตามต้องการ



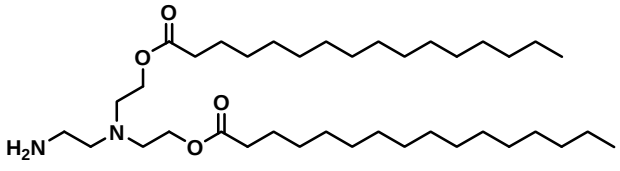
Aa

Lipid Aa Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 150.1 mg) 62.4 mg, 67%; IR ν_{max}: 3423, 2923, 2853, 1720, 1676, 1466, 1432, 1379, 1202, 1136, 837, 800 cm^{-1}; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0.85 (t, J = 6.7 Hz, 6H, 2 × CH_3-fatty acid), 1.23 (br s, 40H, skeleton CH_2-fatty acid), 1.54 (br s, 4H, 2 × $COCH_2CH_2$), 2.29 (t, 4H, 2 × $COCH_2CH_2$), 3.41–3.56 (m, 6H, $N(CH_2)_3$), 3.73 (br s, 2H, NH_2CH_2), 4.40 (br s, 4H, 2 × NCH_2CH_2O); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 14.0, 22.0, 24.5, 29.0, 29.3, 29.4, 29.6, 31.9, 33.6, 34.4, 51.5, 53.1, 57.7, 173.4; ESMS (+ve): *m/z* (% rel. abund.) 569 $[M + H]^+$ (100).



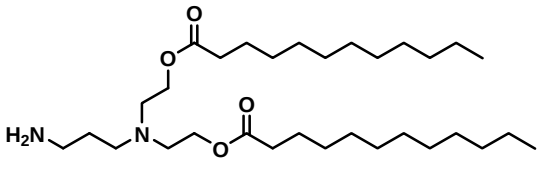
Ab

Lipid Ab Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 150.3 mg) 75.3 mg, 73%; IR ν_{max}: 3418, 2917, 2849, 1677, 1467, 1428, 1383, 1201, 1134, 838, 800, 723 cm^{-1}; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$,): δ 0.85 (t, J = 6.7 Hz, 6H, 2 × CH_3-fatty acid), 1.23 (br s, 48H, skeleton CH_2-fatty acid), 1.59 (br s, 4H, 2 × $COCH_2CH_2$), 2.29 (m, 4H, 2 × $COCH_2CH_2$), 3.43–3.56 (m, 6H, $N(CH_2)_3$), 3.73 (br s, 2H, NH_2CH_2), 4.41 (br s, 4H, 2 × NCH_2CH_2O); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. abund.) 625 $[M + H]^+$ (100).



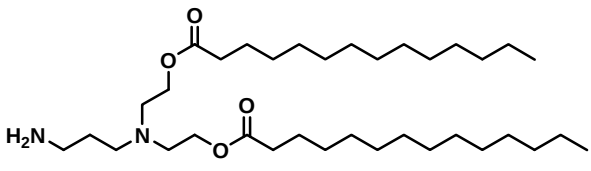
Ac

Lipid Ac Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 150.3 mg) 72.7 mg, 65%; IR ν_{max}: 3443, 2917, 2849, 1729, 1671, 1467, 1431, 1384, 1200, 1136, 838, 799, 721 cm^{-1}; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0.85 (t, J = 6.7 Hz, 6H, 2 × CH_3-fatty acid), 1.23 (br s, 56H, skeleton CH_2-fatty acid), 1.54 (m, 4H, 2 × $COCH_2CH_2$), 2.31 (m, 4H, 2 × $COCH_2CH_2$), 3.43–3.55 (br s, 6H, $N(CH_2)_3$), 3.72 (br s, 2H, NH_2CH_2), 4.41 (br s, 4H, 2 × NCH_2CH_2O); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. abund.) 681 $[M + H]^+$ (100).



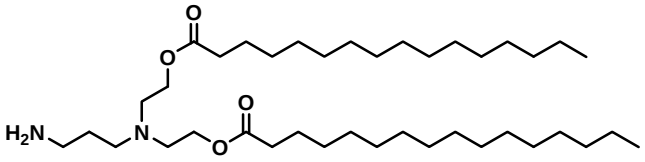
Ba

Lipid Ba Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 150.1 mg) 70.9 mg, 74% ; Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 150.1 mg) 62.4 mg, 67%; IR ν_{max}: 3416, 2924, 1678, 1466, 1431, 1381, 1292, 1203, 1136, 941, 838 cm^{-1}; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0.85 (t, 6H, J = 6.7 Hz, 2 × CH_3-fatty acid), 1.22 (br s, 40H, skeleton CH_2-fatty acid), 1.54 (br s, 4H, 2 × $COCH_2CH_2$), 2.27 (br s, 2H, $NH_2CH_2CH_2CH_2N$), 2.30 (m, 4H, 2 × $COCH_2CH_2$), 3.11 (br s, 2H, $NH_2CH_2CH_2CH_2N$), 3.40 (br s, 2H, $NH_2CH_2CH_2CH_2N$), 3.50 (br s, 4H, 2 × NCH_2CH_2O), 4.39 (br s, 4H, 2 × NCH_2CH_2O); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 14.0, 21.8, 22.6, 24.5, 29.0, 29.2, 29.3, 29.4, 29.6, 31.9, 33.6, 36.6, 52.6, 57.6, 173.7; ESMS (+ve): *m/z* (% rel. abund.) 583 $[M + H]^+$ (100).



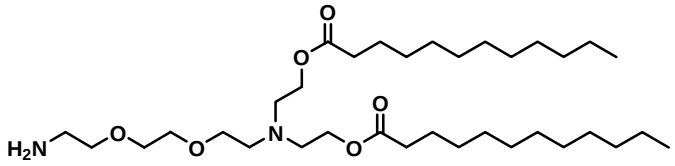
Bb

Lipid Bb Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 150.1 mg) 78.0 mg, 74%; IR ν_{max}: 3418, 2934, 2851, 1676, 1468, 1430, 1205, 1136, 836 cm^{-1}; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0.85 (t, J = 6.7 Hz, 6H, 2 × CH_3-fatty acid), 1.22 (br s, 48H, skeleton CH_2-fatty acid), 1.53 (br s, 4H, 2 × $COCH_2CH_2$), 2.22 (br s, 2H, $NH_2CH_2CH_2CH_2N$), 2.29 (m, 4H, 2 × $COCH_2CH_2$), 3.11 (br s, 2H, $NH_2CH_2CH_2CH_2N$), 3.40 (br s, 2H, $NH_2CH_2CH_2CH_2N$), 3.50 (br s, 4H, 2 × NCH_2CH_2O), 4.39 (br s, 4H, 2 × NCH_2CH_2O); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. abund.) 639 $[M + H]^+$ (100).



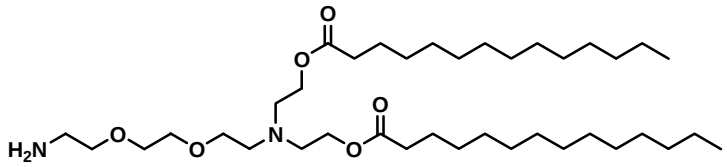
Bc

Lipid Bc Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 150.2 mg) 87.4 mg, 76%; IR ν_{max}: 3417, 2917, 2849, 1744, 1679, 1658, 1468, 1433, 1383, 1201, 1133, 941 cm^{-1}; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0.85 (t, J = 6.7 Hz, 6H, 2 × CH_3-fatty acid), 1.22 (br s, 56H, skeleton CH_2-fatty acid), 1.54 (br s, 4H, 2 × $COCH_2CH_2$), 2.22 (br s, 2H, $NH_2CH_2CH_2CH_2N$), 2.29 (m, 4H, 2 × $COCH_2CH_2$), 3.11 (br s, 2H, $NH_2CH_2CH_2CH_2N$), 3.40 (br s, 2H, $NH_2CH_2CH_2CH_2N$), 3.50 (br s, 4H, 2 × NCH_2CH_2O), 4.39 (br s, 4H, 2 × NCH_2CH_2O); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. abund.) 695 $[M + H]^+$ (100).



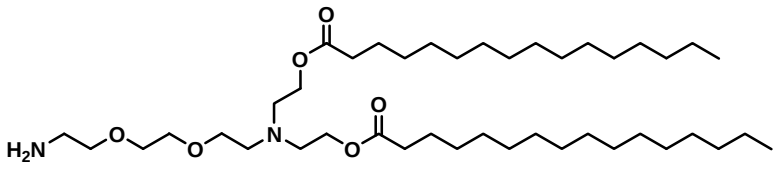
Ca

Lipid Ca Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 102.6 mg) 55.1 mg, 74%; IR ν_{max}: 3424, 2922, 2851, 1686, 1629, 1561, 1430, 1292, 1204 cm^{-1}; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0.84 (t, J = 6.5 Hz, 6H, 2 × CH_3-fatty acid), 1.22 (br s, 40H, skeleton CH_2-fatty acid), 1.55 (br s, 4H, 2 × $COCH_2CH_2$), 2.30 (m, 4H, 2 × $COCH_2CH_2$), 3.20 (br s, 2H, OCH_2CH_2N), 3.49 (br s, 2H, $NH_2CH_2CH_2O$), 3.59 (br s, 8H, 2 × NCH_2CH_2 and OCH_2CH_2O), 3.66 (m, 2H, OCH_2CH_2N), 3.81 (br s, 2H, $NH_2CH_2CH_2O$), 4.42 (br s, 4H, 2 × NCH_2CH_2O); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 14.0, 22.6, 24.5, 29.0, 29.1, 29.3, 29.4, 29.6, 31.8, 33.7, 39.9, 54.3, 53.4, 58.5, 64.5, 70.0, 173.9; ESMS (+ve): *m/z* (% rel. abund.) 823 $[M + H]^+$ (100).



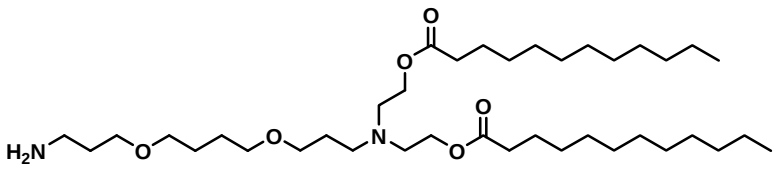
Cb

Lipid Cb Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 102.6 mg) 55.1 mg, 74%; IR ν_{max}: 3424, 2922, 2851, 1686, 1629, 1561, 1430, 1292, 1204 cm^{-1}; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0.84 (t, J = 6.8 Hz, 6H, 2 × CH_3-fatty acid), 1.22 (br s, 48H, skeleton CH_2-fatty acid), 1.54 (br s, 4H, 2 × $COCH_2CH_2$), 2.30 (m, 4H, 2 × $COCH_2CH_2$), 3.38 (br s, 2H, OCH_2CH_2N), 3.49 (br s, 2H, $H_2NCH_2CH_2O$), 3.59 (br s, 8H, 2 × NCH_2CH_2O and OCH_2CH_2O), 3.67 (br s, 2H, OCH_2CH_2N), 3.81 (br s, 2H, $NH_2CH_2CH_2O$), 4.40 (br s, 4H, 2 × NCH_2CH_2O); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. abund.) 713 $[M + H]^+$ (100).



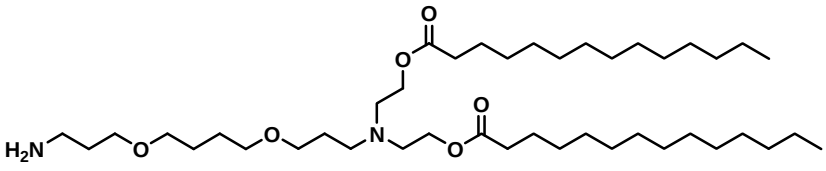
Cc

Lipid Cc Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 112.2 mg) 80.1 mg, 85%; IR ν_{max}: 3417, 2918, 2850, 1778, 1681, 1469, 1202 cm^{-1}; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0.84 (t, J = 6.3 Hz, 6H, 2 × CH_3-fatty acid), 1.22 (br s, 56H, skeleton CH_2-fatty acid), 1.55 (br s, 4H, 2 × $COCH_2CH_2$), 2.30 (m, 4H, 2 × $COCH_2CH_2$), 3.23 (br s, 2H, OCH_2CH_2N), 3.49 (br s, 2H, $NH_2CH_2CH_2O$), 3.60 (br s, 8H, 2 × NCH_2CH_2O and OCH_2CH_2O), 3.67 (m, 2H, OCH_2CH_2N), 3.80 (br s, 2H, $NH_2CH_2CH_2O$), 4.42 (br s, 4H, 2 × NCH_2CH_2O); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. abund.) 769 $[M + H]^+$ (100).



Da

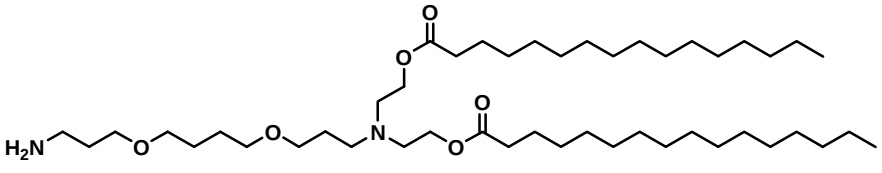
Lipid Da Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 122.0 mg) 66.9 mg, 80% ; Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 122.0 mg) 66.9 mg, 80%; IR ν_{max}: 3407, 2922, 2852, 1680, 1432, 1293, 1204, 1138 cm^{-1}; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0.84 (t, J = 6.8 Hz, 6H, 2 × CH_3-fatty acid), 1.22 (br s, 40H, skeleton CH_2-fatty acid), 1.54 (br s, 8H, 2 × $COCH_2CH_2$, $OCH_2CH_2CH_2CH_2O$), 1.93 (m, 4H, $H_2NCH_2CH_2CH_2O$ and $OCH_2CH_2CH_2N$), 2.30 (m, 4H, 2 × $COCH_2CH_2$), 3.20 (m, 4H, $H_2NCH_2CH_2CH_2O$ and $OCH_2CH_2CH_2N$), 3.42 (br s, 6H, $OCH_2CH_2CH_2CH_2O$ and $OCH_2CH_2CH_2N$), 3.53 (br s, 4H, 2 × NCH_2CH_2O), 3.62 (m, 2H, $H_2NCH_2CH_2CH_2O$), 4.40 (br s, 4H, 2 × NCH_2CH_2O); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 14.0, 22.6, 24.5, 24.7, 26.3, 29.0, 29.2, 29.3, 29.4, 29.6, 31.8, 33.7, 33.9, 40.1, 57.8, 68.6, 70.1, 71.2, 71.3, 173.5; ESMS (+ve): *m/z* (% rel. abund.) 713 $[M + H]^+$ (100).



Db

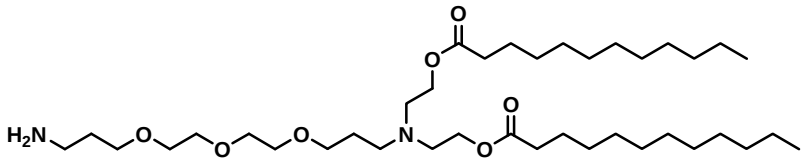
Lipid Db Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 113.8 mg) 72.9 mg, 76%; IR ν_{max}: 3424, 2918, 2851, 1746, 1676, 1468, 1382, 1202 cm^{-1}; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0.84 (t, J = 6.8 Hz, 6H, 2 × CH_3-fatty acid), 1.22 (br s, 48H, skeleton CH_2-fatty acid), 1.54 (br s, 8H, 2 × $COCH_2CH_2$, $OCH_2CH_2CH_2CH_2O$), 1.93 (m, 4H, $H_2NCH_2CH_2CH_2O$ and $OCH_2CH_2CH_2N$), 2.30 (m, 4H, 2 × $COCH_2CH_2$), 3.20 (m, 4H, $H_2NCH_2CH_2CH_2O$

and $OCH_2CH_2CH_2N$), 3.41 (br s, 6H, $OCH_2CH_2CH_2CH_2O$ and $OCH_2CH_2CH_2N$), 3.53 (br s, 4H, 2 × NCH_2CH_2O), 3.62 (m, 2H, $H_2NCH_2CH_2CH_2O$), 4.40 (br s, 4H, 2 × NCH_2CH_2O); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. abund.) 769 $[M + H]^+$ (100).



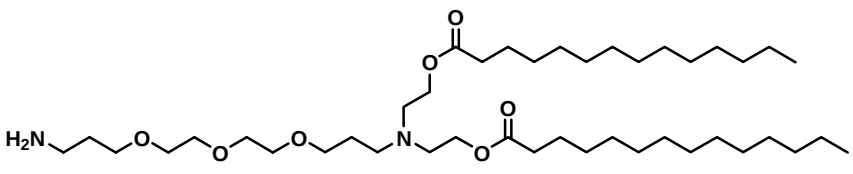
Dc

Lipid Dc Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 163.9 mg) 79.2 mg, 53%; IR ν_{max}: 3406, 2923, 2852, 1745, 1681, 1433, 1180 cm^{-1}; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0.84 (t, *J* = 6.8 Hz, 6H, 2 × CH_3-fatty acid), 1.22 (br s, 56H, skeleton CH_2-fatty acid), 1.54 (br s, 8H, 2 × $COCH_2CH_2$, $OCH_2CH_2CH_2CH_2O$), 1.93 (m, 4H, $H_2NCH_2CH_2CH_2O$ and $OCH_2CH_2CH_2N$), 2.30 (m, 4H, 2 × $COCH_2CH_2$), 3.20 (m, 4H, $H_2NCH_2CH_2CH_2O$ and $OCH_2CH_2CH_2N$), 3.42 (br s, 6H, $OCH_2CH_2CH_2CH_2O$ and $OCH_2CH_2CH_2N$), 3.54 (br s, 4H, 2 × NCH_2CH_2O), 3.62 (m, 2H, $H_2NCH_2CH_2CH_2O$), 4.40 (br s, 4H, 2 × NCH_2CH_2O); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. abund.) 825 $[M + H]^+$ (100).



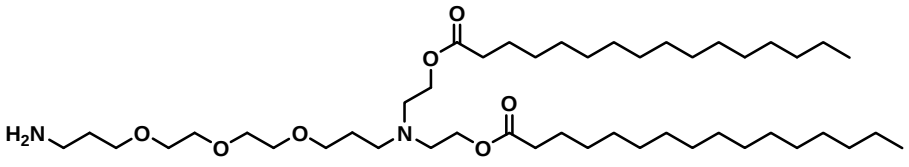
Ea

Lipid Ea Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 163.2 mg) 82.2 mg, 63%; IR ν_{max}: 3423, 2920, 2851, 1681, 1446, 1429, 1203, 1136 cm^{-1}; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0.84 (t, *J* = 6.5 Hz, 6H, 2 × CH_3-fatty acid), 1.22 (br s, 40H, skeleton CH_2-fatty acid), 1.55 (br s, 4H, 2 × $COCH_2CH_2$), 1.93 (m, 2H, $OCH_2CH_2CH_2N$), 2.01 (m, 2H, $NH_2CH_2CH_2CH_2O$), 2.32 (m, 4H, 2 × $COCH_2CH_2$), 3.20 (br s, 2H, $OCH_2CH_2CH_2N$), 3.39 (br s, 2H, $H_2NCH_2CH_2CH_2O$), 3.54–3.59 (br s, 12H, 2 × NCH_2CH_2O and $OCH_2CH_2OCH_2CH_2O$), 3.70 (m, 4H, $H_2NCH_2CH_2CH_2O$ and $OCH_2CH_2CH_2N$), 4.40 (br s, 4H, 2 × NCH_2CH_2O); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 14.1, 22.6, 24.7, 26.0, 29.0, 29.2, 29.3, 29.4, 29.6, 31.8, 33.7, 33.9, 39.9, 55.6, 55.8, 57.7, 57.8, 69.5, 69.7, 70.3, 173.3; ESMS (+ve): *m/z* (% rel. abund.) 769 $[M + H]^+$ (100).



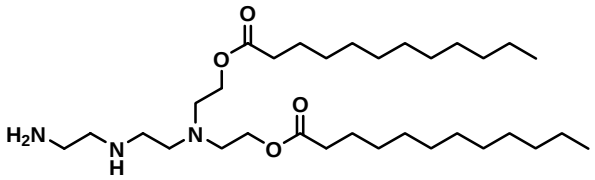
Eb

Lipid Eb Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 163.2 mg) 87.6 mg, 62% Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 163.2 mg) 87.6 mg, 62%; IR ν_{max}: 3417, 2920, 1745, 1681, 1446, 1354, 1203 cm^{-1}; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0.84 (t, J = 6.8 Hz, 6H, 2 × CH_3-fatty acid), 1.22 (br s, 48H, skeleton CH_2-fatty acid), 1.54 (br s, 4H, 2 × $COCH_2CH_2$), 1.93 (m, 2H, $OCH_2CH_2CH_2N$), 2.01 (m, 2H, $NH_2CH_2CH_2CH_2O$), 2.32 (m, 4H, 2 × $COCH_2CH_2$), 3.20 (br s, 2H, $OCH_2CH_2CH_2N$), 3.39 (br s, 2H, $H_2NCH_2CH_2CH_2O$), 3.54–3.59 (br s, 12H, 2 × NCH_2CH_2O and $OCH_2CH_2OCH_2CH_2O$), 3.68 (m, 4H, $H_2NCH_2CH_2CH_2O$ and $OCH_2CH_2CH_2N$), 4.40 (br s, 4H, 2 × NCH_2CH_2O); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. abund.) 825 $[M + H]^+$ (100).



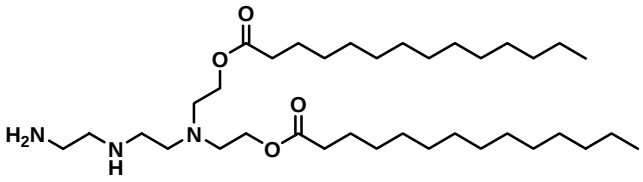
Ec

Lipid Ec Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 164.4 mg) 78.8 mg, 52%; IR ν_{max}: 3407, 2918, 2850, 1777, 1679, 1484, 1201, 1180, 1141 cm^{-1}; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0.84 (t, J = 6.8 Hz, 6H, 2 × CH_3-fatty acid), 1.22 (br s, 56H, skeleton CH_2-fatty acid), 1.54 (br s, 4H, 2 × $COCH_2CH_2$), 1.93 (m, 2H, $OCH_2CH_2CH_2N$), 2.00 (m, 2H, $NH_2CH_2CH_2CH_2O$), 2.32 (m, 4H, 2 × $COCH_2CH_2$), 3.20 (br s, 2H, $OCH_2CH_2CH_2N$), 3.39 (br s, 2H, $H_2NCH_2CH_2CH_2O$), 3.54–3.59 (br s, 12H, 2 × NCH_2CH_2O and $OCH_2CH_2OCH_2CH_2O$), 3.67 (m, 4H, $H_2NCH_2CH_2CH_2O$ and $OCH_2CH_2CH_2N$), 4.40 (br s, 4H, 2 × NCH_2CH_2O); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. abund.) 823 $[M + H]^+$ (100).



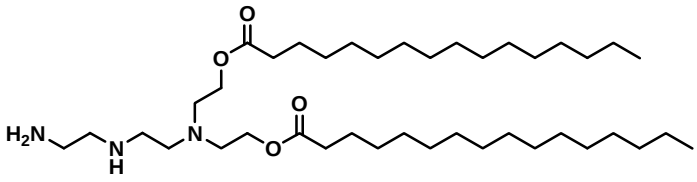
Fa

Lipid Fa Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 124.4 mg) 42.5 mg, 51%; IR: ν_{max} 3423, 2923, 2852, 1685, 1637, 1437, 1411, 1293, 1204, 1137 cm^{-1}; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0.84 (t, J = 6.7 Hz, 6H, 2 × CH_3-fatty acid), 1.22 (br s, 40H, skeleton CH_2-fatty acid), 1.53 (br s, 4H, 2 × $COCH_2CH_2$), 2.29 (m, 4H, 2 × $COCH_2CH_2$), 3.31–3.64 (br s, 10H, 2 × NCH_2CH_2N, $NH_2CH_2CH_2NH$, $NHCH_2CH_2N$ and $NHCH_2CH_2N$), 3.78 (br s, 2H, $NH_2CH_2CH_2NH$), 4.41 (br s, 4H, 2 × NCH_2CH_2O); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 14.0, 22.6, 24.5, 29.0, 29.2, 29.3, 29.4, 29.6, 31.9, 33.6, 33.8, 50.9, 53.2, 53.8, 57.7, 173.5; ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 612 $[M + H]^+$ (100).



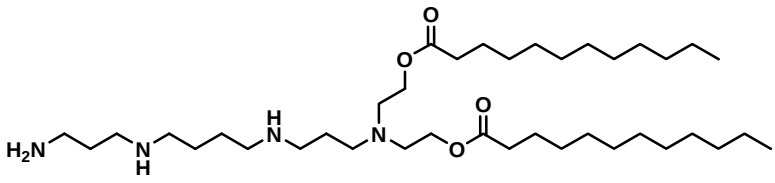
Fb

Lipid Fb Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 115.2 mg) 61.8 mg, 73%; IR: ν_{max} 3444, 2918, 1730, 1668, 1470, 1434, 1195, 1137 cm^{-1}; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0.85 (t, J = 6.7 Hz, 6H, 2 × CH_3-fatty acid), 1.22 (br s, 48H, skeleton CH_2-fatty acid), 1.53 (br s, 4H, 2 × $COCH_2CH_2$), 2.30 (4H, m, 2 × $COCH_2CH_2$), 3.41–3.71 (br s, 10H, 2 × NCH_2CH_2N, $NH_2CH_2CH_2NH$, $NHCH_2CH_2N$ and $NHCH_2CH_2N$), 3.95 (br s, 2H, $NH_2CH_2CH_2NH$), 4.40 (br s, 4H, 2 × NCH_2CH_2O); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 668 $[M + H]^+$ (100).



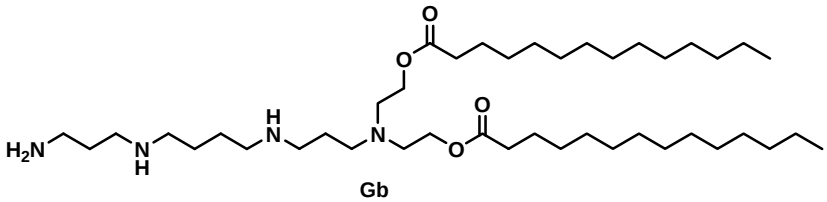
Fc

Lipid Fc Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 96.4 mg) 52.7 mg, 69%; IR: ν_{max} 3418, 2917, 2850, 1731, 1670, 1469, 1200, 1134 cm^{-1}; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0.85 (t, J = 6.5 Hz, 6H, 2 × CH_3-fatty acid), 1.22 (br s, 56H, skeleton CH_2-fatty acid), 1.54 (m, 4H, 2 × $COCH_2CH_2$), 2.28 (m, 4H, $COCH_2CH_2$), 3.46–3.73 (br s, 10H, 2 × NCH_2CH_2N, $NH_2CH_2CH_2NH$, $NHCH_2CH_2NH$ and $NHCH_2CH_2N$), 3.93 (br s, 2H, $NH_2CH_2CH_2NH$), 4.41 (br s, 4H, 2 × NCH_2CH_2O); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 724 $[M + H]^+$ (100).



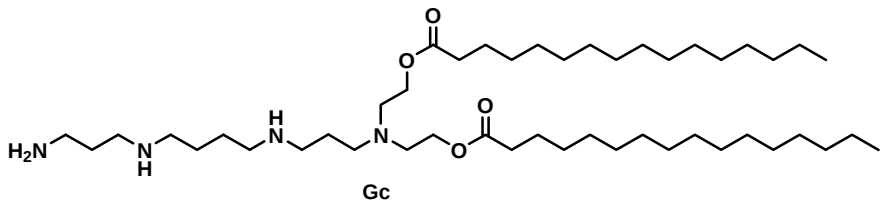
Ga

Lipid Ga Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 153.4 mg) 60.0 mg, 50% ; IR: ν_{max} 3425, 3038, 2921, 2851, 1667, 1469, 1427, 1201, 1136 cm^{-1}; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0.81 (t, J = 6.7 Hz, 6H, 2 × CH_3-fatty acid), 1.20 (br s, 40H, skeleton CH_2-fatty acid), 1.54 (br s, 4H, 2 × $COCH_2CH_2$), 1.74 (br s, 4H, $NHCH_2CH_2CH_2CH_2NH$), 2.08 (m, 4H, $NH_2CH_2CH_2CH_2NH$, $NHCH_2CH_2CH_2N$), 2.28 (m, 4H, 2 × $COCH_2CH_2$), 2.95–3.30 (m, 10H, $NH_2CH_2CH_2CH_2NH$, $NHCH_2CH_2CH_2CH_2N$ and $NHCH_2CH_2CH_2N$), 3.30 (br s, 2H, $NH_2CH_2CH_2CH_2NH$), 3.43 (br s, 4H, 2 × NCH_2CH_2O), 4.36 (br s, 4H, 2 × NCH_2CH_2O); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 13.9, 20.7, 22.6, 24.5, 29.0, 29.2, 29.4, 29.5, 30.0, 31.8, 33.6, 44.6, 45.7, 46.9, 51.5, 52.0, 57.9, 173.3; ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 711 $[M + H]^+$ (100).



Gb

Lipid Gb Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 152.4 mg) 44.2 mg, 34%; IR: ν_{max} 3442, 2918, 2851, 1627, 1468, 1430, 1202, 1136 cm^{-1}; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0.85 (t, J = 6.7 Hz, 6H, 2 × CH_3-fatty acid), 1.23 (br s, 48H, skeleton CH_2-fatty acid), 1.55 (br s, 4H, 2 × $COCH_2CH_2$), 1.71 (br s, 4H, $NHCH_2CH_2CH_2CH_2NH$), 2.07 (m, 4H, $NH_2CH_2CH_2CH_2NH$, $NHCH_2CH_2CH_2N$), 2.29 (m, 4H, 2 × $COCH_2CH_2$), 3.02–3.47 (m, 12H, $NH_2CH_2CH_2CH_2NH$, $NHCH_2CH_2CH_2CH_2NH$ and $NHCH_2CH_2CH_2H$), 3.50 (br s, 4H, 2 × NCH_2CH_2O), 4.38 (br s, 4H, 2 × NCH_2CH_2O); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 767 $[M + H]^+$ (100).



Gc

Lipid Gc Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 152.2 mg) 57.4 mg, 42% ; IR: ν_{max} 3435, 2918, 2850, 1671, 1469, 1202, 1136 cm^1; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0.80 (t, J = 6.7 Hz, 6H, 2 × CH_3-fatty acid), 1.18 (br s, 56H, skeleton CH_2-fatty acid), 1.52 (br s, 4H, 2 × $COCH_2CH_2$), 1.72 (br s, 4H, $NHCH_2CH_2CH_2CH_2NH$), 2.02 (br s, 4H, $NH_2CH_2CH_2CH_2NH$, $NHCH_2CH_2CH_2N$), 2.26 (m, 4H, 2 × $COCH_2CH_2$), 2.97–3.42 (m, 12H, $NH_2CH_2CH_2CH_2NH$, $NHCH_2CH_2CH_2CH_2NH$ and $NHCH_2CH_2CH_2N$), 3.62 (br s, 4H, 2 × NCH_2CH_2O), 4.35 (br s, 4H, 2 × NCH_2CH_2O); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 823 $[M + H]^+$ (100).

3. การเตรียมไลโปโซมและสารประกอบเชิงซ้อนไลโปโซมและดีเอ็นเอ

ไลโปโซมเตรียมจากสารผสมของไขมันประจุบวกและEPC ในอัตราส่วนต่อโมล 1:3 โดยใช้วิธี sonication กล่าวคือผสมไขมันประจุบวกและEPC ในตัวทำละลายอินทรีย์ ($CHCl_3$ และ MeOH) ระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกโดยใช้แก๊สไนโตรเจน นำฟิล์มสารที่ได้ไปใส่ใน desiccators ข้ามคืน นำฟิล์มสารมาทำให้ชื้นด้วย Tris buffer (pH 7.4) และ sonicate ประมาณ 30 นาที ได้ไลโปโซม นำไลโปโซมที่เตรียมได้มาผสมกับดีเอ็นเอในอัตราส่วนตามต้องการ ปิเปตขึ้นและลงที่อุณหภูมิห้อง ตั้งไว้ 30 นาทีก่อนการใช้งาน

4. การศึกษาการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์

เตรียม HeLa เซลล์ ($2x10^4$ เซลล์ต่อหลุม) ใน complete medium (MEM ประกอบด้วย 10% fetal bovine serum, supplemented with 1 % L-glutamine, 1% non-essential amino acids solution, 100 U/mL penicillin and 100 μg/mL streptomycin) บ่มที่ 37 C และ 5% CO_2 ก่อนการทดลอง 1 วัน ในวันทำการทดลองทิ้ง medium แล้วใส่สารประกอบเชิงซ้อนไลโปโซม-ดีเอ็นเอ ใน medium ที่ไม่มี serum บ่ม 24 ชม นำเซลล์มาล้างด้วย PBS buffer (pH 7.4) และใส่ complete medium แทน วิเคราะห์ประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์โดยนับจำนวนเซลล์ที่ปรากฏการเรืองแสงสีเขียวด้วยกล้อง fluorescence microscope (excitation filter 480/40 and emission filter 535/50).

5. การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์

ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT เตรียม HeLa เซลล์ ($8x10^3$ เซลล์ต่อหลุม) ใน complete medium บ่มที่ 37 C และ 5% CO_2 ก่อนการทดลอง 1 วัน ทิ้ง medium แล้วใส่สารประกอบเชิงซ้อนไลโปโซม-ดีเอ็นเอ ใน medium ที่ไม่มี serum บ่ม 24 ชม นำเซลล์มาล้างด้วย PBS buffer (pH 7.4) และใส่ medium ที่มี MTT (1 mg/mL) บ่ม 4 ชม หลังจาก 4 ชม ใส่ DMSO เพื่อละลายผลึก formazan ที่เกิดขึ้นจากเซลล์ที่รอดชีวิต วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader

สรุปผลการศึกษาและวิจารณ์ผล

จากการสังเคราะห์ไขมันประจุบวกด้วยเทคนิคการสังเคราะห์บนวัฏภาคของแข็ง เบื้องต้นสามารถสังเคราะห์สารได้ทั้งหมด 21 ชนิด การหาเอกลักษณ์ของสารดังกล่าวอาศัยข้อมูลทาง IR ^{1}H NMR และ MS สเปกโทรสโกปี จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าไขมันประจุบวก 5 ชนิดคือ **Fb-Gc** แสดงประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ ไขมันประจุบวก **Ga** แสดงประสิทธิ์ภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้ดีที่สุด ซึ่งมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับสารเกรดการค้า Lipofectamine^{TM}2000 นอกจากนี้ไขมันประจุบวกชนิดนี้ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์

เอกสารอ้างอิง

1. Intody, Z.; Perkins, B.D.; Wilson, J.H.; Wensel, T.G. *Nucleic Acids Res*. **2000**, 28, 4283–4290.
2. Faria, M.; Wood, C.D.; Perrouault, L.; Nelson, J.S.; Winter, A.; White, M.R.H.; Hélène, C.; Giovannangeli, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 3862–3867.
3. Tayor, R.W.; Chinnery, P.F.; Turnbull, D.M.; Lightowlers, R.N. *Nat. Genet*. **1997**, 15, 212–215.

4. Wang, G.; Xu, X.; Pace, B.; Dean, D.A. ; Glazer, P.M. ; Chan, P. ; Goodman, S.R.; Shokolenko, I. *Nucleic Acids Res*. **1999**, 2806–2813.

5. Xu, X.; Glazer, P.M.; Wang, G. *Gene* **2000**, 242, 219–228.

6. Bates, P.J.; Kahlon, J.B.; Thomas, S.D.; Trent, J.O.; Miller, D.M. *J. Biol. Chem*. **1999**, 274, 26369–26377.

7. Bennett, C.F. *Biochem. Phar*. **1998**, 55, 9–19.

8. Hélène, C.; Toulmé, J.J. *Biochim. Biophys Acta* **1990**, 1049, 99–125.

9. Khuri, F.R.; Kurie, J.M. *Clin. Cancer Res*. **2000**, 6, 1607–1610.

10. Crooke, S.T. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*. **1998**, 8, 7–8.

11. Cole-strauss, A.; Yoon, K.; Xiang, Y.; Byrne, B.C.; Rice, M.C.; Gryn, J.; Holloman, W.K.; Kmiec, E.B. *Science* **1996**, 273, 1386–1389.

12. Staley, J.P.; Guthrie, C. *Cell* **1998**, 92, 315–326.

13. Liu, X.; Jiang, Q.; Mansfield, S.G.; Puttaraju, M.; Zhang, Y.; Zhou, W.; Cohn, J.A.; Garcia-Blanco, M.A.; Mitchell, L.G.; Engelhardt, J.F. *Nat. Biotechnol*. **2002**, 20, 47–52.

14. Chao, H.; Mansfield, S.G.; Bartel, R.C.; Hiriyanna, S.; Mitchekk, L.G. Garcia-Blanco, M.A.; Walsh, C.E. *Nat. Med*. **2003**, 9, 1015–1019.

15. Amado, R.G.; Chen, I.S.Y. *Biomedicine* **1999**, 285, 674–676.

16. Somia, N.; Verma, I.M. *Nat. Rev. Genet*. **2000**, 1, 91–99.

17. Felgner, P.L. *Adv. Drug. Delivery. Rev*. **1990**, 5, 163–187.

18. Harland, R.; Weintraub, H. *J. Cell Biol*. **1985**, 101, 1094–1099.

19. Heiser, W.C. *Methods Mol. Biol*. **2000**, 130, 117–134.

20. Schenborn, E.T.; Goiffon, V. *Methods Mol. Biol*. **2000**, 130, 135–145.

21. Miller, A.D. *Angew. Chem. Int. Ed*. **1998**, 37, 1768–1785.

22. Sharma, A.; Sharma, U.S. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *Int. J. Pharm.* **1997**, 154 123–140.

23. Malam, Y.; Loizidou, M.; Seifalian, A.M. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. *Trends Pharmacol*. *Sci*. **2009**, 30, 592–599.

24. Martin, F.; Boulikas, T. The challenge of liposomes in gene therapy. *Gene Ther. Mol. Biol.* **1998**, 1, 173–214.

25. Gotal, P.; Gotal, K.; Gurusamy, S.; Kumar, V.; Singh, A.; Katare, O.P.; Mishra, D.N. Liposomal drug delivery systems – Clinical applications. *Acta Pharm*. **2005**, 55 1–25.

26. P.L. Felgner, T.R. Gadex, M. Holm, R. Roman, H.W. Chan, M. Wenz, J.P. Northrop, G.M. Ringold, M. Danielsen, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987) 7413–7417.

27. B. Yingyongnarongkul, W. Radchatawedchakoon, A. Krajarng, R. Watanapokasin, A. Suksamrarn, Bioorg. Med. Chem. 17 (2009) 176–188.

28. D. Liu, W. Qiao, Z. Li, X. Cui, K. Li, L. Yu, K. Yan, L. Zhu, L. Cheng. Carbamate-linked cationic lipids for gene delivery, Bioorg. Med. Chem. 16 (2008) 995–1005.

29. G. Gebeyehu, J.A. Jessee, V.C. Ciccarone, P. Hawley-Nelson, A. Chytil, U.S. Patent 5,334,761, 1994.

30. L. Stamatatos, R. Leventis, M.J. Zuckermann, J.R. Silvius, Biochemistry 27 (1988) 3917–3925.

31. Kaiser, E.; Colescot, R.; Bossinge, C.; Cook, P. *Anal. Biochem*. **1970**, *34*, 595–596.

32. I. A. Nash, B. W. Bycroft, W. C. Chan, *Tetrahedron Lett*. **1996**, *37*, 2625–2628.

33. H.M. Ghonaim, O.A.A. Ahmed, C. Pourzand, I.S. Blagbrough, Mol. Pharmaceutics 5 (2008) 1111–1121.

34. Y. Obata, D. Suzuki, S. Takeoka, Bioconjugate Chem. 19 (2008) 1055−1063.

35. R.S. Shirazi, K.K.Ewert, C. Leal, R.N. Majzoub, N.F. Bouxsein, C.R. Safinya, Biochim. Biophys. Acta 1808 (2011) 2156−2155.

36. Q.-F. Zhang, W.-H. Yang, W.-J. Yi, J. Zhang, J. Ren, T.-Y. Lou, W. Zhu, X.-Q. Yu, Bioorg. Med. Chem. Lett. 21 (2011) 7045−7049.

37. S.-H. Huh, H.-J. Do, H.-Y. Lim, D.-K. Kim, S.-J. Choi, H. Song, N.-H. Kim, J.-K. Park, W.-K. Chang, H.-M. Chung, J.-H. Kim, *Biologicals* 35 (2007) 165−171.

โครงการย่อยที่ 2
การสังเคราะห์ไขมันประจุบวกที่มีคอเลสเตอรอลเป็นโครงสร้างหลักสำหรับนำส่งเคอร์คูมินเข้าสู่เซลล์

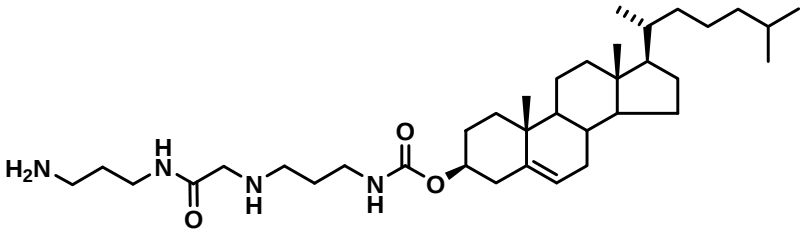
โครงการย่อยที่ 2

การสังเคราะห์ไขมันประจุบวกที่มีคอเลสเตอรอลเป็นโครงสร้างหลักสำหรับนำส่งเคอร์คูมินเข้าสู่เซลล์

ผลการศึกษา

ในปัจจุบัน ระบบนำส่งยาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ได้รับความสนใจในการศึกษาวิจัย ซึ่งประกอบด้วย พอลิเมอริกไมเซลล์ (polymeric micelles) และ พอลิเมอริกเวสิเคิล (polymeric vesicles)[1-3] เดนไดรเมอร์ (dendrimers)[4,5] ไลโปโซม (liposomes)[6,7] ไมเซลล์ (micelles)[7] และ นาโนเจล (nanogels)[8,9] จากระบบนำส่งที่กล่าวมา ไลโปโซมจัดเป็นระบบนำส่งชนิดหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสามารถประยุกต์การใช้ได้หลากหลายในการนำส่งยารวมถึงการนำส่งยีนด้วย[10-12] ได้มีการศึกษาการใช้ไลโปโซมประจุบวก (cationic liposomes) ในการนำส่งยาเนื่องจากไลโปโซมประจุบวกสามารถสามารถสะสมในเซลล์เนื้องอกได้[13] นอกจากนี้ ไลโปโซมประจุบวกยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเข้าเซลล์และเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพของยาที่ถูกห่อหุ้ม ซึ่งผลดังกล่าวเกิดจากความสามารถของไลโปโซมประจุบวกเกิดอันตรกิริยากับประจุลบของผนังเซลล์ ซึ่งเหนี่ยวนำให้เกิดเอนโดไซโตซิส (endocytosis)[14] ทำให้ยาเข้าสู่เซลล์ได้

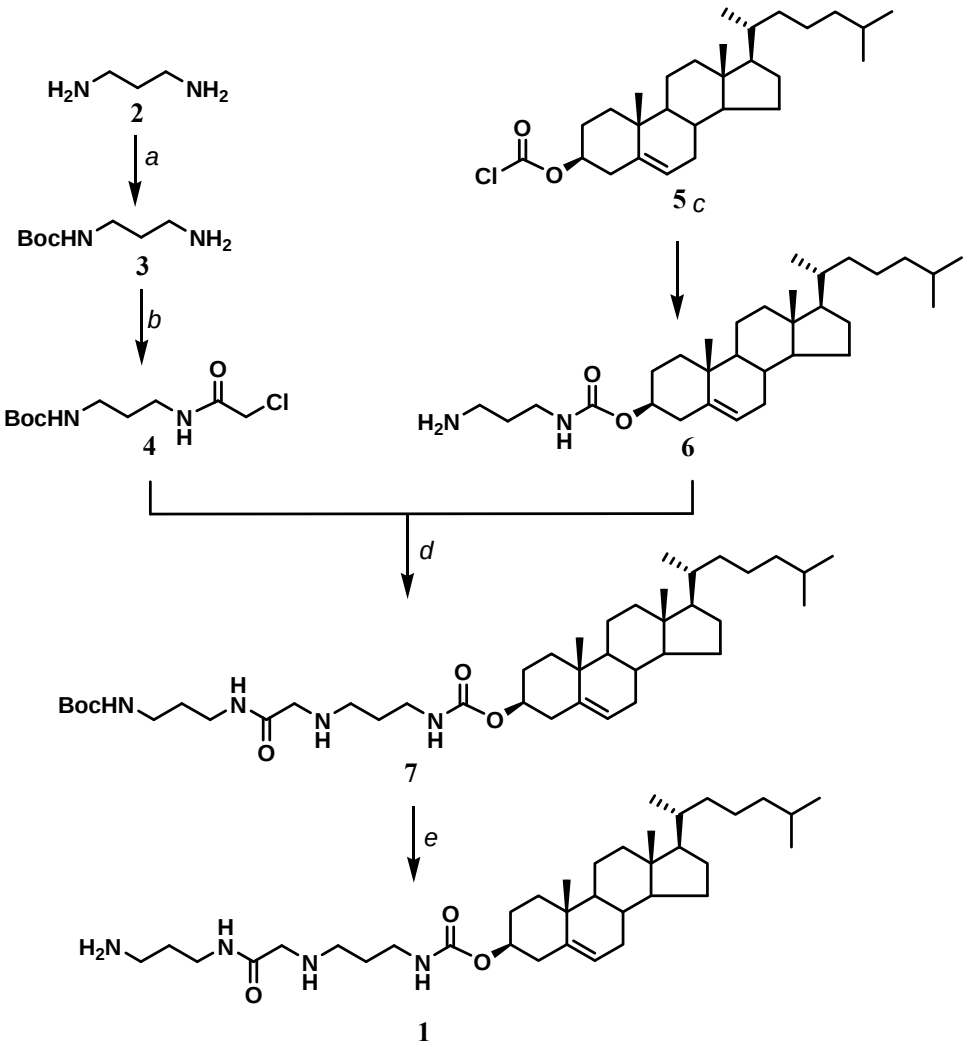
ได้มีรายงานการใช้ไลโปโซมประจุบวกที่มีคอเลสเตอรอลเป็นโครงสร้างหลักในการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์เลี้ยงลูกด้วยนม[15-20] คอลเสเตอรอลเป็นที่นิยมใช้เป็นส่วนไขมันไม่มีขั้วเนื่องจากทำให้ได้ไลโปโซมที่มีความเสถียร และมีความเป็นพิษต่ำต่อเซลล์ทดสอบ[21] ดังนั้นในการวิจัยนี้ ได้ออกแบบไขมันประจุบวกที่มีคอเลสเตอรอลเป็นโครงสร้างหลัก (โครงสร้างที่ 1) ซึ่งสามารถใช้เตรียมไลโปโซมประจุบวกสำหรับนำส่งดีเอ็นเอหรือนำส่งยาที่ไม่มีขั้วได้ จากโครงสร้างของสารไขมันประจุบวกดังกล่าวยังสามารถเชื่อมต่อกับตัวยาด้วยพันธะเคมีได้



Cationic lipid (1)

การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก **1** แสดงใน Scheme 2.1 เริ่มจากการเตรียม *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-1,3-diaminopropane (**3**) โดยใช้วิธีการสังเคราะห์แบบเจือจาง[22] หลังจากนั้นนำสาร **3** ไปทำปฏิกิริยาต่อกับ chloroacetyl chloride ได้สารประกอบเอไมด์ **4** ในการเตรียมสาร **4** โดยทำปฏิกิริยา 2 ขั้นตอน ได้เปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ 72% นำสาร **4** มาเชื่อมต่อกับสาร **6** ได้สารผลิตภัณฑ์ **7** (72%) โดยที่สาร **6** เตรียมจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง cholesteryl chloroformate (**5**) และ 1,3-diainopropane (**2**) ในขั้นตอนสุดท้าย ทำการกำจัดหมู่

ป้องกัน Boc ออกโดยนำสาร **7** มาทำปฏิกิริยากับ 20% TFA ในตัวทำละลาย CH_2Cl_2 ได้ผลิตภัณฑ์ **1** (93%) วิเคราะห์โครงสร้างของสาร **1** ด้วยเทคนิค IR NMR และ MS

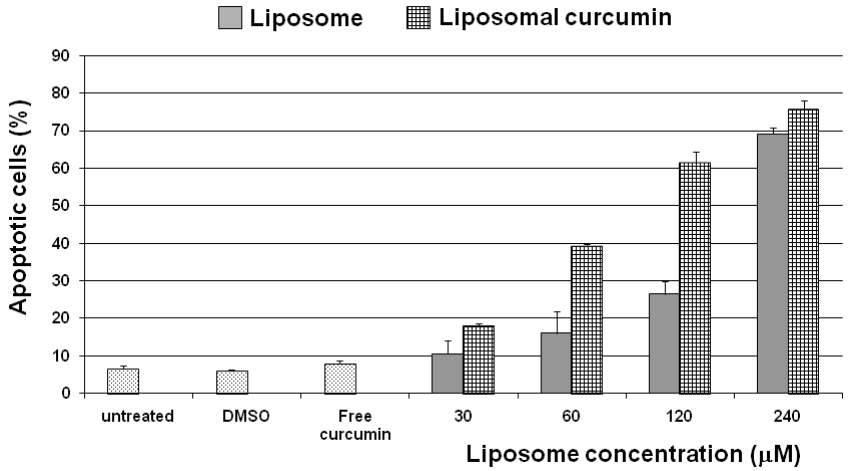


Scheme 2.1. การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก **1**. *Reagents and conditions*: (a) Boc_2O, CH_2Cl_2, rt., 89%; (b) chloroacetyl chloride, pyridine, 0°C, 81%; (c) 1,3-diaminopropane, CH_2Cl_2, rt., 97%; (d) Et_3N, EtOH, reflux, 72%; (e) TFA, CH_2Cl_2, 93%.

หลังจากเตรียมไขมันประจุบวก **1** ได้แล้ว ทำการศึกษาผลของไขมันประจุบวกต่อการกักเก็บสารและการพาสารเข้าสู่เซลล์มะเร็ง โดยเลือกเคอร์คูมิน (Curcumin) เป็นสารที่ใช้ในการศึกษาเริ่มต้น เคอร์คูมินเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ[23] ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ[24-26] ฤทธิ์ต้านมะเร็ง[23,24,27,28] และฤทธิ์ต้านเชื้อเอชไอวี (HIV)[29,30] อย่างไรก็ตาม เคอร์คูมินไม่ได้รับการพัฒนาไปเป็นยาได้เนื่องจากเคอร์คูมินมีชีวปริมาณออกฤทธิ์ (bioavailability) ต่ำ อย่างไรก็ตาม ได้มีการศึกษาการใช้ไลโปโซมในการเพิ่มชีวปริมาณออกฤทธิ์และเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพของเคอร์คูมิน[31-33] สิ่งสำคัญประการหนึ่งของระบบนำส่งชนิดไลโปโซมคือประสิทธิภาพในการกักเก็บสาร ในการทดลองนี้การเตรียมการกักเก็บเคอร์คูมินในไลโปโซมโดยใช้

วิธีการเตรียมแบบฟิล์มบาง (thin-film)[34] ซึ่งไลโปโซมเตรียมจากสารผสมของไขมันประจุบวก **1** และ DOPE ในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก และอัตราส่วนโดยน้ำหนักของเคอร์คูมินต่อไลโปโซมเท่ากับ 1:20 จากการวิเคราะห์พบว่าเคอร์คูมินถูกกักเก็บในไลโปโซม 68% ทั้งนี้เคอร์คูมินเป็นสารมีขั้วต่ำ ดังนั้นเคอร์คูมินถูกกักเก็บในส่วนไม่มีขั้วของไลโปโซม ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับตัวยาชนิดมีขั้วต่ำชนิดอื่น[34,35]

นำเคอร์คูมินที่ถูกกักเก็บในไลโปโซมมาทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ 5 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งปากมดลูก (cervical epithelial adenocarcinoma, HeLa) เซลล์มะเร็งปอด (lung epithelial adenocarcinoma, A549) เซลล์มะเร็งตับ (liver hepatocellular carcinoma, HepG2) และ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว 2 ชนิด (erythromyeloblastoid leukemia, K562 และ T cell lymphoblastic leukaemia, 1301) ในการทดลองเบื้องต้น ทำการหาอัตราส่วนระหว่าง เคอร์คูมินและไลโปโซมที่เหมาะสม ได้ทำการเตรียมส่วนผสมของเคอร์คูมินต่อไลโปโซม โดยน้ำหนัก ที่อัตราส่วน 1:5, 1:10, 1:20, 1:40 และ 1:80 โดยให้เคอร์คูมินมีความเข้มข้นคงที่ ๆ 10.8 μM และทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HeLa นอกจากนี้ได้ทำการทดสอบความเป็นพิษของไลโปโซมเทียบด้วย ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 2.1 ไลโปโซมที่ความเข้มข้นสูงแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ กล่าวคือ สารผสมเคอร์คูมินต่อไลโปโซมที่อัตราส่วน 1:80 แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบเทียบเท่ากับไลโปโซมในปริมาณเดียวกัน สารผสมเคอร์คูมินต่อไลโปโซมที่อัตราส่วน 1:20 ทำให้เซลล์ทดสอบตายไป 60% ในขณะที่ไลโปโซมในปริมาณเดียวกัน ซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากับ 120 μM ทำให้เซลล์ทดสอบตายไปเพียง 25% ดังนั้นจึงเลือกใช้ สารผสมเคอร์คูมินต่อไลโปโซมที่อัตราส่วน 1:20 ในการทดลองถัดไป



รูปที่ 2.1 ความเป็นพิษต่อเซลล์ HeLa ของ ไลโปโซม เคอร์คูมิน และ เคอร์คูมินที่กักเก็บในไลโปโซม

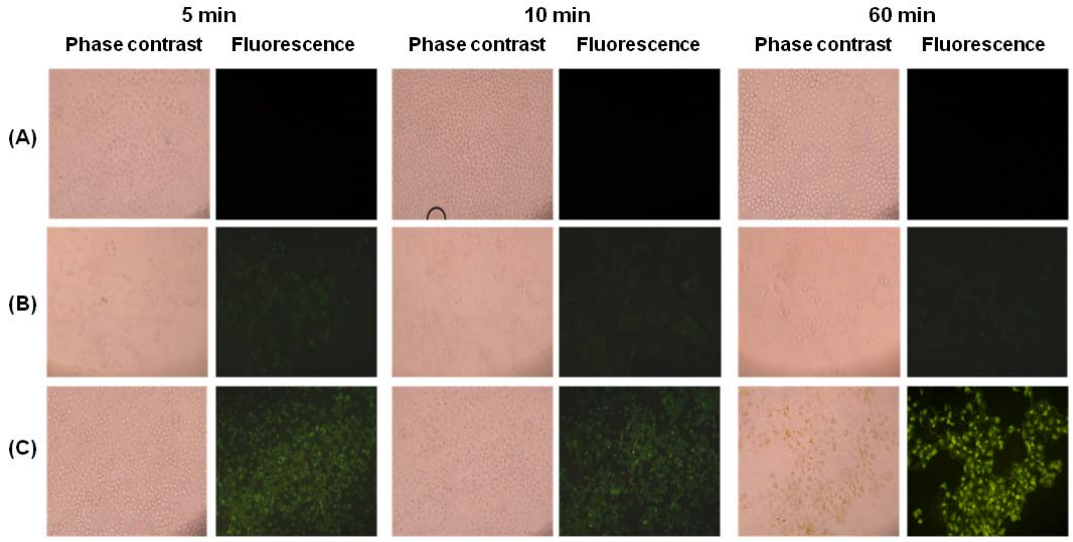
ได้มีรายงานว่าไลโปโซมแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ชนิดต่าง ๆ[36,37] ดังนั้นจำเป็นต้องทดสอบความเป็นพิษของไลโปโซม ต่อเซลล์ทดสอบทั้ง 5 ชนิด ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 2.1 ไลโปโซมแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ทดลองต่ำ โดยมีค่า ED_{50} เท่ากับ 180, 210, 105, 165 และ 90 μM ต่อเซลล์ HeLa, A549,

HepG2, K562 และ 1301 นอกจากนี้ได้นำไลโปโซมมาศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติด้วย ซึ่งพบว่าไลโปโซมไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 600 μM จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ไลโปโซมชนิดนี้เหมาะสำหรับใช้เป็นระบบนำส่งยาได้ ได้มีการรายงานถึงการเพิ่มความเป็นพิษของสารทดสอบโดยการใช้ไลโปโซมเกรดการค้าต่อเซลล์ต่าง ๆ[31-33,38] ดังนั้นจึงทำการทดสอบการเพิ่มประสิทธิภาพของเคอร์คูมินต่อความเป็นพิษของเซลล์โดยใช้ไลโปโซมที่สังเคราะห์ขึ้น จากผลการทดลองพบว่า ความเป็นพิษของเคอร์คูมิน และเคอร์คูมินที่ถูกกักเก็บในไลโปโซม ขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ที่ทดสอบ (ตารางที่ 2.1) ได้มีรายงานว่าเคอร์คูมินไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ดี[39] นอกจากนี้เมื่อมนุษย์รับประทานเคอร์คูมิน 8 กรัมต่อวันเป็นระยะเวลา 3 เดือน[40] หรือให้หนูกินเคอร์คูมินปริมาณ 5 กรัมต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม[41] จะไม่แสดงความเป็นพิษ จากการทดลองพบว่าเคอร์คูมินแสดงความเป็นพิษที่ต่ำกว่าเคอร์คูมินที่ถูกกักเก็บในไลโปโซม ทั้งนี้เคอร์คูมินแสดงความเป็นพิษต่ำ เนื่องจากการเข้าเซลล์ต่ำและสลายตัวได้ง่าย สำหรับเคอร์คูมินที่กักเก็บในไลโปโซมแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ A549, HepG2 และ K562 ได้ดีกว่าเคอร์คูมิน 5-8 เท่า และแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ HeLa และ 1301 ได้ดีกว่า 2-3 เท่า

ตารางที่ 2.1 ความเป็นพิษต่อเซลล์ ของ ไลโปโซม เคอร์คูมิน และ เคอร์คูมินที่กักเก็บในไลโปโซม

Tested preparation	ED_{50} (μM)				
	HeLa	A549	HepG2	K562	1310
Free curcumin	17	50	30	20	8
Liposomal curcumin	8	10	4	2.5	3.1
Empty liposomes	180	210	105	165	90

ผลการศึกษาการเข้าสู่เซลล์ HeLa ของเคอร์คูมิน และเคอร์คูมินที่กักเก็บในไลโปโซมแสดงในรูปที่ 2.2 จากผลการทดลองพบว่า ไลโปโซมช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเข้าสู่เซลล์ของเคอร์คูมิน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากประจุบวกของไลโปโซมสามารถเกิดอันตระกิริยากับผนังเซลล์ที่เป็นประจุลบและเหนี่ยวนำให้ไลโปโซมเข้าสู่เซลล์ได้ จากผลการทดลองพบว่าเคอร์คูมินที่ถูกกักเก็บในไลโปโซมสามารถเข้าสู่เซลล์ได้ภายใน 5 นาที เมื่อเวลามากขึ้นความเข้มแสงของเซลล์ที่เกิดจากเคอร์คูมินยิ่งเพิ่มมากขึ้น นอกจากไลโปโซมช่วยในการเข้าสู่เซลล์ของไลโปโซมแล้ว ยังช่วยเพิ่มความเสถียรของเคอร์คูมินในเซลล์อีกด้วย เคอร์คูมินก็สามารถเข้าเซลล์ได้ภายใน 5 นาที แต่ความเข้มของแสงน้อยกว่า และจะไม่ปรากฏแสงหลังจาก 20 นาที ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก เคอร์คูมินได้สลายตัวไปหมดแล้ว ซึ่งเป็นข้อสรุปได้ว่าไลโปโซมสามารถเพิ่มความเสถียรของเคอร์คูมินได้



รูปที่ 2.2. Fluorescence microscopy images of HeLa cells incubated for 5, 10 and 60 min at 37°C. Row (A): PBS; row (B): 40 μM curcumin, and row (C): 40 μM liposome-encapsulated curcumin.

วิธีการ

1. การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก 1

การเตรียม *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-1,3-diaminopropane (3) นำ Di-*tert*-butyl dicarbonate (5.9 g, 0.0269 mol) ละลายใน CH_2Cl_2 (50 ml) และค่อยๆหยดลงในสารละลาย 1,3-diaminopropane (**2**) (10 g, 0.134 mol) ในตัวทำละลาย CH_2Cl_2 (200 ml) คนสารละลายข้ามคืน ระเหยตัวทำละลายออกให้เหลือตัวทำละลายประมาณ 100 ml นำสารที่ได้ใส่ลงในกรวยสกัด เติมน้ำ (100 ml) เขย่า แยกชั้นอินทรีย์เก็บไว้ นำชั้นน้ำมาสกัดซ้ำด้วย CH_2Cl_2 (100 ml) รวมชั้นสารละลายอินทรีย์เข้าด้วยกัน ดูดน้ำออกด้วย Na_2SO_4 ระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ลดความดัน นำสารที่ได้ไปแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ CH_2Cl_2-MeOH เป็นตัวทำละลาย โดยค่อยๆ เพิ่มปริมาณของ MeOH ได้สารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ (4.2 g, 89%). ข้อมูลทางสเปกโตรสโกปีของสารดังกล่าวตรงกับค่าที่รายงานไว้[42]

การสังเคราะห์ *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*N*′-(chloroacetyl)-1,3-diaminopropane (4) นำ *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-1,3-diaminopropane (**3**) (1.88 g, 0.0108 mol) มาละลายใน dry pyridine และคนที่อุณหภูมิ 0^{o}C นาน 10 นาที เติม chloroacetyl chloride (1.46 g, 0.0129 mol) คนปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 12 ชั่วโมง เทปฏิกิริยาลงในน้ำเย็น (100 ml) สกัดด้วย EtOAc (3×50 ml) นำสารสกัดที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย . คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ CH_2Cl_2-MeOH เป็นตัวทำละลาย โดยค่อยๆ เพิ่มปริมาณของ MeOH ได้สารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ (2.21 g, 81%) ได้สารเป็นผลึกสีขาวมีจุดหลอมเหลว 43–45°C

IR (KBr): ν_{max} 3359, 3197, 2956, 2923, 2852, 1660, 1640, 1553, 1468, 1411, 1173, 1137, 702 cm^{-1}; ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1.30 (9 H, s, CH_3-Boc), 1.53 (2 H, quint, *J* 6.0 Hz, H-2), 3.01 (2 H, br. d, *J* 5.4 Hz, H-1), 3.20 (2 H, q, *J* 5.5 Hz, H-3), 3.90 (2 H, s, H-4), 5.27 (1 H, br. s, NHCOO), 7.40 (1 H, br. s, NHCO); ^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) 28.1 (CH_3-Boc), 29.4 (C-2), 36.4 (C-1), 37.0 (C-3), 42.2 (C-5), 79.1 (C-Boc), 156.5 (NHCOO), 166.7 (NHCO); MS (ES^+): *m/z* 273.7 ($[M + Na]^+$, 100%); HR-TOFMS (ESI^+): *m/z* 273.0982 $[M + Na]^+$; calcd for $C_{10}H_{19}N_2O_3$ + Na, 273.0976.

การสังเคราะห์ 3β-Cholest-5-en-3-yl-*N*-(3-aminopropyl)carbamate (6) ค่อยๆหยดสารละลาย cholesteryl chloroformate (**5**) (6.1 g, 0.013 mol) ในตัวทำละลาน CH_2Cl_2 (50 ml) ลงในสารละลาย 1,3-diaminopropane (11 g, 0.14 mol) ในตัวทำละลาย CH_2Cl_2 (200 ml) คนสารละลายข้ามคืน เติมน้ำ (200 ml) ลงในปฏิกิริยา และสกัดด้วย CH_2Cl_2 (3×50 ml) นำสารสกัดที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ CH_2Cl_2-MeOH เป็นตัวทำละลาย โดยค่อยๆ เพิ่มปริมาณของ MeOH ได้สารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ (6.1 g, 97%)

IR (KBr): ν_{max} 3422, 2926, 2852, 1685, 1466, 1382, 1122, 1045 cm^{-1}; ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 0.62 (3 H, s, Me-Chol), 0.81 (6 H, d, *J* 6.5 Hz, Me-Chol), 0.86 (6 H, d, *J* 6.5 Hz, Me-Chol), 0.88–1.50 (21 H, m, CH-Chol), 1.57 (2 H, quint, *J* 6.4 Hz, H-2'), 1.6–2.3 (7 H, m, CH-Chol), 2.72 (2 H, t, *J* 6.5 Hz, H-3'), 3.20 (2 H, br. d, *J* 5.0 Hz, H-1'), 4.42 (1 H, br. s, CH-Chol), 5.19 (1 H, br. s, NHCO), 5.34 (1 H, br. s, CH-Chol); ^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) 11.7, 18.6, 19.2, 20.9, 22.4, 22.7, 23.7, 24.1, 27.9, 28.10, 28.14, 31.7, 31.8, 33.0, 35.7, 36.0, 36.4, 36.9, 38.5, 38.7, 39.4, 39.6, 42.2, 49.9, 56.0, 56.5, 74.0, 122.3, 139.7, 156.2; MS (ES^+): *m/z* 487.4 ($[M + H]^+$, 100%); HR-TOFMS (ESI^+): *m/z* 487.4278 $[M + H]^+$; calcd for $C_{31}H_{54}N_2O_2$ + H, 487.4258.

การสังเคราะห์สาร 7 นำสารละลายผสมของสาร **4** (0.367 g, 146 mmol) สาร **6** (0.715 g, 146 mmol) และ Et_3N (0.61 ml, 0.044 mol) ในตัวทำละลาย EtOH (10 ml) มา refluxed นาน 6 ชั่วโมง เมื่อปฏิกิริยาเกดิสมบูรณ์ นำปฏิกิริยามาสกัดด้วย EtOAc (3×100 ml) นำสารสกัดที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ CH_2Cl_2-MeOH เป็นตัวทำละลาย โดยค่อยๆ เพิ่มปริมาณของ MeOH ได้สารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ (0.735 g, 72%)

IR (KBr): ν_{max} 3364, 2928, 2852, 1720, 1689, 1660, 1545, 1527, 1461, 1366, 1272, 1253, 1174 cm^{-1}; ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 0.63 (3 H, s, Me-Chol), 0.82 (6 H, d, *J* 6.5 Hz, Me-Chol), 0.87 (6 H, d, *J* 6.5 Hz, Me-Chol), 0.96 (3 H, s, CH-Chol), 1.00–1.31 (10 H, m, CH-Chol), 1.39 (9 H, s, CH_3-Boc), 1.44–1.52 (9 H, m, CH-Chol), 1.61 (2 H, t, *J* 6.0 Hz, H-2), 1.70 (2 H, quint, *J* 6.4 Hz, H-2'), 1.79–2.29 (7 H, m, CH-Chol), 2.65 (2 H, t, *J* 6.4 Hz, H-3'), 3.11 (2 H, br. d, *J* 6.0 Hz, H-1'), 3.25–3.30 (6 H, m, H-1, H-3, H-4), 4.43 (1 H, br. s, CH-Chol), 5.06 (1 H, br. s, NH), 5.13 (1 H, br. s, NH), 5.34 (1 H, br. s, CH-Chol), 7.65 (1 H, br. s,

NH); ^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) 11.8, 18.6, 19.2, 20.9, 21.4, 22.5, 22.7, 23.7, 24.2, 27.9, 28.12, 28.18, 28.3, 29.4, 29.9, 31.8, 35.7, 36.1, 36.5, 36.9, 37.1, 38.1, 38.5, 39.4, 39.6, 42.2, 46.7, 49.9, 51.8, 56.0, 56.6, 74.3, 79.2, 122.5, 139.7, 156.4, 170.9, 175.7; MS (ES^+): *m/z* 701.5 ($[M + H]^+$, 100%); HR-TOFMS (ESI^+): *m/z* 701.5577 $[M + H]^+$; calcd for $C_{41}H_{72}N_4O_5$ + H, 701.5575.

การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก 1 นำสารละลายสาร **7** (0.20 g, 0.285 mmol) ในตัวทำละลาย CH_2Cl_2 (5 ml) มาเติม trifluoroacetic acid (1.0 ml) คนปฏิกิริยานาน 10 นาที กำจัดสารละลายออกโดยใช้ก๊าซไนโตรเจน ได้สารผลิตภัณฑ์ตามต้องการ (0.16 g, 93%)

IR (KBr): ν_{max} 3395, 2929, 2852, 1715, 1679, 1554, 1519, 1462, 1202, 1135 cm^{-1}; ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 0.65 (3 H, s, Me-Chol), 0.84 (6 H, d, *J* 6.0 Hz, Me-Chol), 0.87 (6 H, d, *J* 5.4 Hz, Me-Chol), 0.97 (3 H, s, CH-Chol), 1.02−1.52 (20 H, m, CH-Chol), 1.83−1.97 (10 H, m, H-2, H2′, CH-Chol), 2.25 (2 H, br. s, CH-Chol), 2.94 (2 H, br. s, H-3'), 3.08 (2 H, br. s, H-3), 3.20 (2 H, br. s, H-1), 3.30 (2 H, br. s, H-1'), 3.79 (2 H, br. s, H-5), 4.36 (1 H, br. s, CH-Chol), 5.31 (1 H, br. s, CH-Chol); ^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) 11.8, 18.7, 19.1, 21.0, 22.5, 22.7, 23.9, 24.2, 26.4, 27.8, 28.0, 28.2, 31.8, 35.8, 36.2, 36.5, 36.8, 37.4, 38.2, 39.5, 39.7, 42.3, 49.9, 56.2, 56.6, 114.0, 116.9, 122.8, 139.4, 158.0, 166.3; MS (ES^+): *m/z* 601.5 ($[M + H]^+$, 100%); HR-TOFMS (ESI^+): *m/z* 601.5089 $[M + H]^+$; calcd for $C_{36}H_{64}N_4O_3$+H, 601.5051.

2. การเตรียม liposome-encapsulated curcumin Bilayer lipids for liposomes were cationic lipid **1** and dioleoyl-L-α-phosphatidylethanolamine (DOPE) taken equivalent weight ratio; different total lipid/curcumin ratios were used. An appropriate quantity of curcumin dissolved in EtOH (1 μg/μl) and lipid in $CHCl_3$ (1 μg/μl) were mixed in Eppendrof tube, organic solvents were evaporated under a stream of nitrogen and residue was dried under high vacuum for 2 h. The resulting thin film was hydrated with phosphate-buffer saline (PBS, pH 7.4, 20 μl) at room temperature. The mixture was vortexed for 30 s and sonicated for 20 min; concentration of curcumin in each case was the same. The resulting liposomal curcumin was used immediately. Free curcumin was prepared by dissolving in DMSO and the final concentration of DMSO was 0.5% (v/v).

3. การหา Curcumin encapsulation efficiency The amount of curcumin incorporated in liposome was determined using HPLC using Waters Model 515 liquid chromatograph. Cationic lipid (**1**) and DOPE were mixed in the ratio of 1 : 1 (w/w) in $CHCl_3$. The known amount of curcumin in EtOH was added to the lipid solution in the weight ratio of 1 : 20 (drug/lipid). The organic solvents were evaporated under a stream of nitrogen and further dried under high vacuum for 2 h. The resulting thin film was hydrated with PBS at

room temperature. The mixture was vortexed for 30 s and sonicated for 20 min. The supernatant containing liposomal-curcumin complex was separated from insoluble un-encapsulated curcumin by centrifugation at 3000 rpm for 5 min on Eppendrof miniSpin. The curcumin pellet obtained was washed twice with water, dissolved in CH_2Cl_2 and assayed by HPLC (Waters Model 515 device, Model 2487 UV detector, 250×4.60 mm column, luna 5μ silica Phenomenex, CH_2Cl_2/ MeOH, 90/10, v/v).

4. Cell cultures HeLa cells were cultured in growth medium, consisting of S-MEM, 5% horse serum, 5% fetal bovine serum, 1% L-glutamine and 1% gentamicin-kanamycin. A549 and HepG2 cells were cultured in D-MEM with 10% fetal bovine serum, 1% L-glutamine and 1% penicillin-streptomycin. K562 and 1301 cells were cultured in RPMI1640 media with 10% fetal bovine serum, 1% L-glutamine and 1% penicillin-streptomycin. HEK293 cells were cultured in MEM supplemented with 10% fetal bovine serum. Cells were incubated at 37°C, 5% CO_2. 1×10^5 attached cells (HeLa, A549 and HepG2) and 5×10^5 suspension cells (K562 and 1301) were plated in 500 μl of growth medium in 24-well plate so these cells would be 80−90% confluent at the time of testing.

5. Cell uptake studies HeLa cells were seeded in 24-well plates at a seeding density of 1×10^5 cells per well in 500 μl of growth medium and were allowed to attach for 24 h. For the studies of concentration-dependent uptake, cells were treated with 40 μM of liposomal curcumin or curcumin and were incubated for 5, 10, 20 and 60 min. Each time point, the medium was removed and the cells were washed three times with PBS and visualized using an Nikon ECLIPSE TE 300 microscope (λ_{ex} = 460−490 and λ_{em} = 510−520 nm).

6. Cytotoxicity assays In 24-well plates, 100,000 cells were plated per well and allowed to grow overnight. Curcumin at final concentrations of 5, 10, 20, 40 and 80 μM and liposomal curcumin at final curcumin concentration of 1.25, 2.5, 5, 10, 20, and 40 μM was added in wells (in triplicate) and incubated at 37°C in CO_2 incubator for 6 h. The medium was removed and the cells were washed thrice with PBS buffer before being changed to complete medium. The cells were incubated at 37°C in CO_2 incubator for 48 h prior to testing for apoptosis by staining with propidium iodide and Annexin V-FITC and then detected by flow cytometer.[43] Data (Table 2.1) show the mean of at least three independent experiments ± SD.

เอกสารอ้างอิง

1. Torchilin, V.P., *Pharm. Res*., 2007, vol. 24, pp. 1–16.
2. Savic, R., Luo, L., Eisenberg, A., and Maysinger, D., *Science*, 2003, vol. 300, pp. 615–618.

3. Peer, D., Karp, J.M., Hong, S., Farokhzad, O.C., Margalit, R., and Langer, R., *Nat. Nanotechnol.*, 2007, vol. 2, pp. 751–760.
4. Gillies, E.R., and Frechet, J.M.J., *Drug Discov. Today*, 2005, vol. 10, pp. 35–43.
5. Svenson, S., *Eur. J. Pharm. Biopharm*., 2009, vol. 71, pp. 445–462.
6. Gregoriadis, G., *J. Drug Targeting*, 2008, vol. 16, pp. 520–524.
7. Cukierman, E., and Khan, D.R., *Biochem. Pharmacol*., 2010, vol. 80, pp. 762–770.
8. Vinogradov, S.V., Zeman, A.D., Batrakova, E.V., and Kabanov, A.V., *J. Control. Release*, 2005, vol. 107, pp. 143–157.
9. Oh, J.K., Siegwart, D.J., Lee, H.I., Sherwood, G., Peteanu, L., Hollinger, J.O., Kataoka, K., and Matyjaszewski, K., *J. Am. Chem. Soc*., 2007, vol. 129, pp. 5939–5945.
10. Torchilin, V.P., *Nat. Rev*., 2005, vol. 4, pp. 145–160.
11. Torchilin, V.P., *Adv. Drug Deliv. Rev*., 2006, vol. 58, pp. 1532–1555.
12. Chonn, A., and Cullis, P.R., *Adv. Drug Deliv. Rev*., 1998, vol. 30, pp. 73–83.
13. Wu, J., Lee, A., Lu, Y., and Lee, R.J., *Int. J. Pharm*., 2007, vol. 337, pp. 329–335.
14. Dass, C.R., *Int. J. Pharm*., 2003, vol. 267, pp. 1–12.
15. Kearns, M.D., Donkor, A.-M., and Savva, M., *Mol. Pharm*., 2008, vol. 5, pp.128–139.
16. Bajaj, A., Kondaiah, P., and Bhattacharya, S., *Bioconjugate Chem*., 2007, vol. 18, pp. 1537–1546.
17. Moradpour, D., Schauer, J.I., Zurawski, V.R., Wands, J.R., and Boutin, R.H., *Biochem. Biophy. Res. Commun*., 1996, vol. 221, pp. 82–88.
18. Vigneron, J.-P., Oudrhiri, N., Fauquet, M., Vergely, L., Bradley, J.-C., Basseville, M., Lehn, P., and Lehn, J.-M., *Proc. Natl. Acad. Sci*., *USA*, 1996, vol. 93, pp. 9682–9686.
19. Lee, E.R., Marshall, J., Siegel, C.S., Jiang, C., Yew, N.S., Nichols, M.R., Nietupski, J.B., Ziegler, R.J., Lane, M.B., Wang, K.X., Wan, N.C., Scheule, R.K., Harris, D.J., Smith, A.E., and Chen, S.H., *Hum. Gene Ther*., 1996, vol. 7, pp. 1701–1717.
20. Radchatawedchakoon, W., Watanapokasin, R., Krajarng, A., and Yingyongnarongkul, B., *Bioorg. Med. Chem*., 2010, vol. 18, pp. 330–342.
21. Yeagle P.L., *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, vol. 822, pp. 267–287.
22. Unciti-Broceta, A., Diezmann, F., Ou-Yang, C.Y., Fara, M.A., and Bradley, M., *Bioorg. Med. Chem*., 2009, vol. 17, pp. 959–966.
23. Chan, M.M.-Y., Huang, H.-I., Fenton, M.R., and Fong, D., *Biochem. Pharmacol*., 1998, vol. 55, pp. 1955–1962.

24. Ruby, A.J., Kuttan, G., Dinesh Babu, K., Rajasekharan, K.N., and Kuttan, R., *Cancer Lett*., 1995, vol. 94, pp. 79–83.

25. Sugiyama, Y., Kawakishi, S., and Osawa, T., *Biochem. Pharmacol*., 1996, vol. 52, pp. 519–525.

26. Grinberg, L.N., Shalev, O., Tonnesen, H.H., and Rachmilewitz, E.A., *Int. J. Pharm*., 1996, vol. 132, pp. 251–257.

27. Kuttan, R., Bhanumathy, P., Nirmala, K., and George, M.C., *Cancer Lett*., 1985, vol. 29, pp. 197–202.

28. Inano, H., Onoda, M., Inafuku, N., Kubota, M., Kamada, Y., Osawa, T., Kobayashi, H., and Wakabayashi, K., *Carcinogenesis*, 2000, vol. 21, pp. 1835–1841.

29. Jordan, W.C., and Drew, C.R., *J. Natl. Med*. *Assoc*., 1996, vol. 88, pp. 333.

30. Mazumder, A., Raghavan, K., Weinstein, J., Kohn, K.W., and Pommier, Y., *Biochem. Pharmacol*., 1995, vol. 49, pp. 1165–1170.

31. Li, L., Braiteh, F.S., and Kurzrock R., *Cancer*, 2005, vol. 104, pp. 1322–1331.

32. Thangapazham, R.L., Puri, A., Tele, S., Blumenthal, R., and Maheshwari, R.K., *Int. J. Oncol*., 2008, vol. 32, pp. 1119–1123.

33. Chen, C., Johnston, T.D., Jeon, H., Gedaly, R., McHugh, P.P., Burke, T.G., and Ranjan, D., *Int. J. Pharmaceu*., 2009, vol. 366, pp. 133–139.

34. Thangapazham, R.L., Puri, A., Tele, S., Blumenthal, R., and Maheswari, R.K., *Int. J. Oncol*., 2008, vol. 32, pp. 1119–1123.

35. Rane, S., and Prabhakar, B*., Int. J. PharmTech. Res*., 2009, vol. 1, pp. 914–917.

36. Berrocal, M.C., Bujan, J., Garcia-Honduvilla, N., and Abeger, A., *Drug Deliv*., 2000, vol. 7, pp. 37–44.

37. Smistad, G., Jacobsen, J., and Sande, S.A., *Int. J. Pharm*., 2007, vol. 330, pp. 14–22.

38. Jung, S.H., Jung, S.H., Seong, H., Cho, S.H., Jeong, K.-S., and Shin, B.C., *Int. J. Pharm*., 2009, vol. 382, pp. 254–261.

39. Anitha, A., Maya, S., Deepa, N., Chennazhi, K.P., Nair, S.V., Tamura, H., and Jayakumar, R., *Carbohydrate Pol*., 2011, vol. 83, pp. 452–461.

40. Cheng, A.L., Hsu, C.H., Lin, J.K., Hsu, M.M., Ho, Y.F., Shen, T.S., Ko, J.Y., Lin, J.T., Lin, B.R., Ming-Shiang, W., Yu, H.S., Jee, S.H., Chen, G.S., Chen, C.A., Lai, M.K., Pu, Y.S., Pan, M.H., Wang, Y.J., Tsai, C.C., and Hsieh, C.Y., *Anticancer Res*., 2001, vol. 21, pp. 2895–2900.

41. Wahlstrom, B., and Blennow, G., *Acta Pharmacol. Toxicol*., 1978, vol. 43, pp. 86–92.

42. Boturyn, D., Boudali, A., Constant, J.-F., Defrancq, E., and Lhomme, J., *Tetrahedron*, 1997, vol. 53, pp. 5485–5492.

43. Wanitchakool, P., Jariyawat, S., Suksen, K., Soorukram, D., Tuchinda, P., and Piyachaturawat, P., *Eur. J. Pharmacol*. 2012, vol. 696, pp. 34–42.

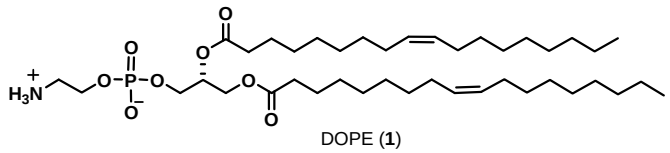
โครงการย่อยที่ 3
ผลของสารผสมไขมันประจุบวกที่มีต่อประสิทธิภาพในการ พาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์

โครงการย่อยที่ 3

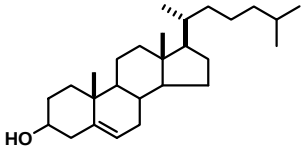
ผลของสารผสมไขมันประจุบวกที่มีต่อประสิทธิภาพในการ พาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์

ผลการศึกษา

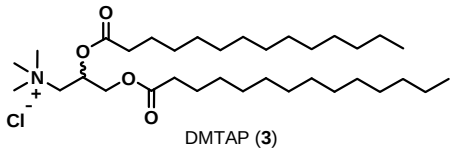
ไขมันประจุบวกเป็นระบบนำส่งชนิดไม่ใช่ไวรัส (non-viral vector) เป็นระบบนำส่งที่มีผู้ให้ความสนใจศึกษากันอย่างกว้างขวาง ทั้งนี้เนื่องจากไขมันประจุบวกสามารถเตรียมได้ง่าย ไม่มีความเป็นพิษกับเซลล์ สามารถนำส่งดีเอ็นเอ และยาทั้งมีขั้วและไม่มีขั้วเข้าไปในเซลล์ได้ อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของไขมันประจุบวกในการเข้าสู่เซลล์ยังต่ำอยู่ เมื่อเทียบกับระบบนำส่งที่ใช้ไวรัส (viral vector) แต่เนื่องจากปัญหาของระบบนำส่งประเภทไวรัส ยังประสบปัญหาสำคัญที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน จึงได้มีการศึกษาระบบนำส่งชนิดไม่ใช่ไวรัส โดยเฉพาะไขมันประจุบวก เพื่อให้มีประสิทธิภาพที่สูงขึ้น โดยนักวิจัยเน้นหลักไปทางการสังเคราะห์ไขมันประจุบวกชนิดใหม่ ๆ เพื่อให้มีประสิทธิภาพที่สูงขึ้น การเพิ่มประสิทธิภาพในการเข้าสู่เซลล์ของไขมันประจุบวกทำได้โดยการผสมไขมันตัวช่วย (helper lipid) เช่น DOPE (**1**) หรือ cholesterol (**2**) นอกจากนี้ได้มีการศึกษาการใช้ไขมันประจุบวกตั้งแต่สองนิดมาผสมกันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ เช่น ในการผสมระหว่าง DMTAP (**3**) และ DOTAP (**4**)[1] ซึ่งไขมันประจุบวกทั้งสองชนิด มีส่วนหัวมีขั้วและโครงสร้างหลักที่เหมือนกัน แต่แตกต่างตรงความยาวของส่วนไขมันไม่มีขั้ว จากการทดลองพบว่าประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อไขมันประจุบวกผสมมีปริมาณของ DOTAP (**2**) ที่เพิ่มขึ้น นอกจากกนี้การใช้ไขมันประจุบวก 4 ชนิดคือ DOTAP (**4**), DOPC (**5**), DC-Chol (**6**) และ DOPE (**1**) มีประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้ดีกว่าการใช้สารผสมของ DOTAP (**4**) กับ DOPC (**5**) และสารผสมของ DC-Chol (**6**) กับ DOPE (**1**)[2]



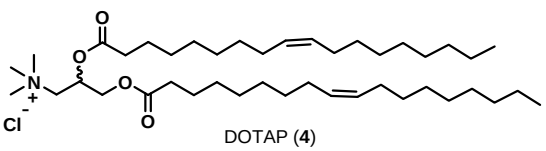
DOPE (**1**)



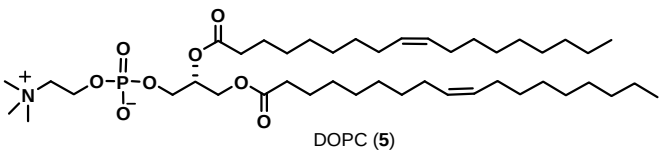
Cholesterol (**2**)



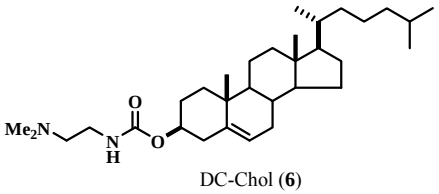
DMTAP (**3**)



DOTAP (**4**)

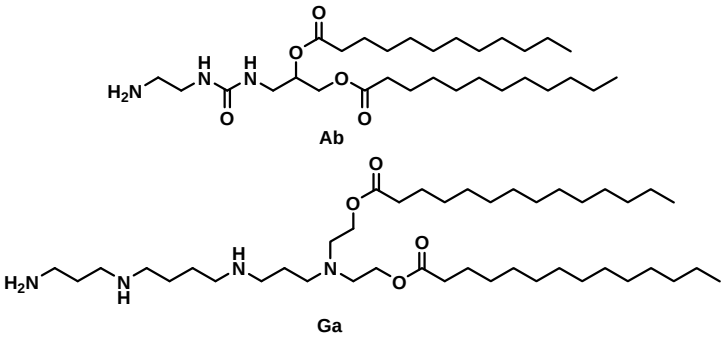


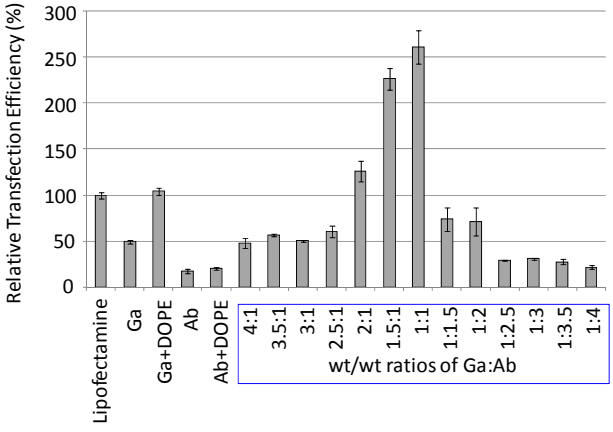
DOPC (**5**)



DC-Chol (**6**)

เมื่อไม่นานมานี้ ได้รายงานการสังเคราะห์และศึกษาประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของไขมันประจุบวกที่มีโครงสร้างหลักต่างกันสองชนิดคือ **Ab**[3] และ **Ga**[4] โดยที่ **Ab** มี aminoglycerol เป็นโครงสร้างหลัก ในขณะที่ **Ga** มี dihydroxyethyl amino เป็นโครงสร้างหลัก ซึ่งสารสั้งสองมีประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้ดี เพื่อศึกษาผลของการใช้ไขมันประจุบวกผสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ นำไขมันประจุบวก **Ab** และ **Ga** มาผสมกันที่อัตราส่วนโดยน้ำหนักต่าง ๆ และทดสอบประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ HEK293 ในการทดลองนี้ใช้ดีเอ็นเอที่มี β-galactosidase เป็นโปรตีนรายงานผล ใช้อัตราส่วนผสมของดีเอ็นเอต่อไลโปโซมต่อน้ำหนักที่ 1:20 และใช้ Lipofectamine™ 2000 เป็นสารสารมาตรฐาน ผลการทดลองแสดงใน**รูปที่ 3.1** จากการทดลองพบว่า ไขมันประจุบวกผสม Ab และ Ga มีประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ดีท่สุดที่อัตราส่วน 1:1 และมีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้ไขมันประจุบวกของแต่ละชนิดเดี่ยว ๆ การใช้ DOPE เป็นไขมันตัวช่วย ไม่ได้เพิ่มประสิทธิภาพของไขมันประจุบวกที่ใช้ทดสอบมากนัก นอกจากนี้ ไขมันประจุบวกผสม **Ab** และ **Ga** มีประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ HEK293 ได้ดีกว่าสารมาตรฐาน Lipofectamine™ 2000 มากกว่า 2 เท่า

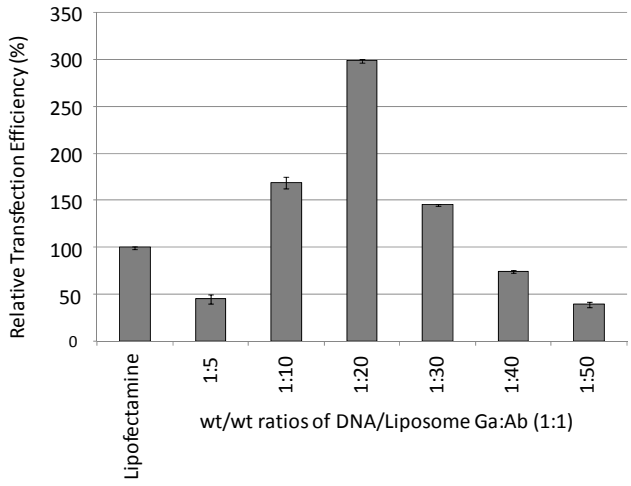




รูปที่ 3.1 ผลของอัตราส่วนของไขมันประจุบวก **Ab** และ **Ga** ต่อประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์

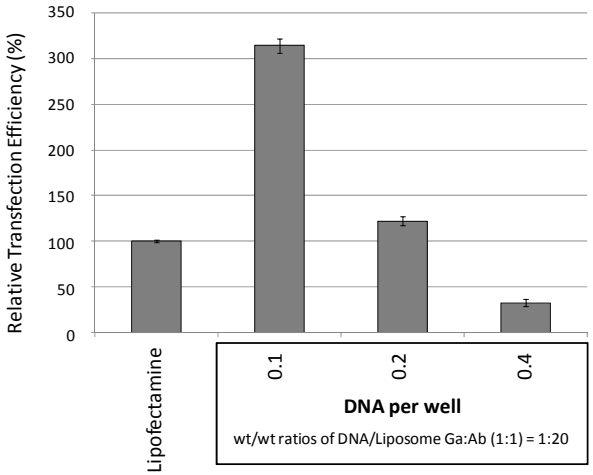
เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ที่ดีที่สุดของไลโปโซมผสม **Ab** และ **Ga** จึงทำการศึกษาผลของอัตราส่วนของดีเอ็นเอต่อไลโปโซมที่มีต่อประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ ใน

การทดลองนี้เตรียมอัตราส่วนของดีเอ็นอต่อไลโปโซมผสม ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนักจาก 1:5 ถึง 1:50 ผลการทดลองแสดงดัง**รูปที่ 3.2** ประสิทธิภาพของไขมันประจุบวกผสมเพิ่มขึ้น จนมีประสิทธิภาพในการนำส่งดีเอ็นเอดีที่สุดที่อัตราส่วนของดีเอ็นเอต่อไลโปโซม 1:20 หลังจากนั้นประสิทธิภาพก็จะลดลง ที่อัตราส่วนดีเอ็นเอต่อไลโปโซมที่สูงขึ้นอาจมีผลทำให้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ จึงทำให้ประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ลดลง



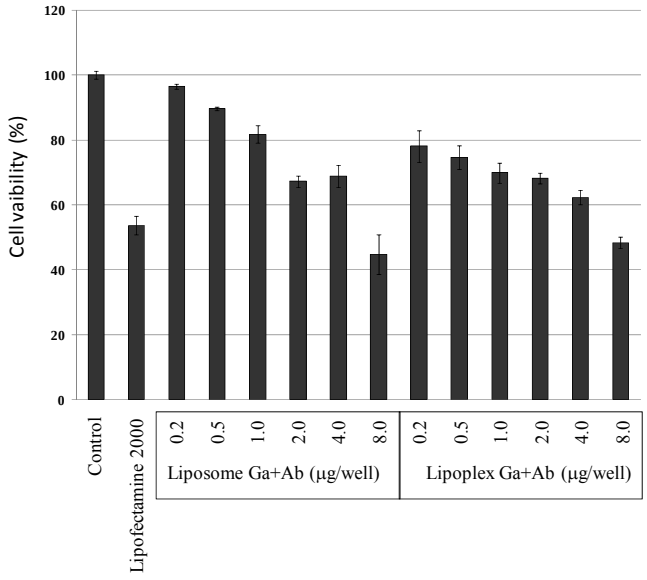
รูปที่ 3.2 ผลของอัตราส่วนของดีเอ็นเอ และไลโปโซมผสม **Ab** และ **Ga** ต่อประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์

เพื่อศึกษาปริมาณดีเอ็นเอต่อประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ นำดีเอ็นเอมาผสมกับไลโปโซมที่เตรียมจากไขมันประจุบวกผสม **Ab** และ **Ga** ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนักคงที่ ๆ 1:20 และปรับเปลี่ยนปริมาณดีเอ็นเอ 0.1, 0.2 และ 0.4 μg ต่อ well และทำการทดสอบกับเซลล์ HEK293 ผลการทดลองแสดงดัง **รูปที่ 3.3** จากผลการทดลองพบ ว่าปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้ดีที่สุด คือ 0.1 μg ต่อ well เมื่อปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นส่งผลให้ประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ลดลง ทั้งนี้เป็นเพราะว่า การใช้ปริมาณดีเอ็นเอที่สูงขึ้นปริมาณของไลโปโซมที่ใช้ก็สูงขึ้นตาม ซึ่งสงผลให้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งผลนี้สอดคล้องกับการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ใน**รูปที่ 3.4**



รูปที่ 3.3 ผลของปริมาณดีเอ็นเอต่อประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์

ความเป็นพิษต่อเซลล์ของระบบนำส่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการนำไปประยุกต์ใช้ เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำไลโปโซมผสม **Ab** และ **Ga** ไปประยุกต์ใช้เป็นระบบนำส่งยา จึงจำเป็นต้องศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ ในการทดลองนี้ทำการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ HEK293 ของไลโปโซม และไลโปเพล็กซ์ (ไลโปโซมผสมดีเอ็นเอ) โดยใช้วิธี MTT assay การทดลองนี้ได้ศึกษาความเป็นพิษของสารมาตรฐาน Lipofectamine™ 2000 เพื่อเปรียบเทียบ ผลการทดลองแสดงดัง**รูปที่ 3.4** จากผลการทดลองพบว่า ทั้งไลโปโซมและไลโปเพล็กซ์มีความเป็นพิษต่อเซลล์สูงขึ้นเมื่อปริมาณไขมันประจุบวกผสม **Ab** และ **Ga** มากขึ้น ปริมาณไขมันประจุบวกที่มีประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้ดีที่สุดมีค่าเทียบเท่ากับ 2 μg ต่อ well ที่ความเข้มข้นนี้มีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิต (cell viability) ประมาณ 70 % ซึ่งพบว่ามีความเป็นพิษที่น้อยกว่าสารมาตรฐาน Lipofectamine™ 2000 (cell viability ~ 55%) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำไลโปโซมที่เตรียมจากไขมันประจุบวกผสม **Ab** และ **Ga** ไปศึกษาเพื่อเป็นระบบนำส่งยาต่อไป



รูปที่ 3.4 ความเป็นพิษต่อเซลล์ของไขมันประจุบวกผสม **Ab** และ **Ga**

ขนาดและประจุของไลโปโซมมีส่วนสำคัญประการหนึ่งต่อประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ ไลโปโซมที่มีขนาดเล็กมีประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้ดี ดังนั้นจึงนำเอาไลโปโซมที่เตรียมจากไขมันประจุบวก **Ga**, **Ab** และ **Ga** ผสม **Ab** มาวิเคราะห์หาขนาดและประจุด้วยเครื่อง nanosizer ผลที่ได้แสดงดัง**ตารางที่ 3.1** จากผลการทดลองพบว่า ไขมันประจุบวก **Ga** ซึ่งมี spermine เป็นส่วนหัวมีขั้ว เมื่อเตรียมเป็นไลโปโซม จะมีขนาด 54.8 ± 16.7 nm และมีค่า Zeta potential เท่ากับ 49.35 ± 4.75 mV ในขณะที่ไขมันประจุบวก **Ab** ซึ่งมี amine เป็นส่วนหัวมีขั้ว เมื่อเตรียมเป็นไลโปโซม จะมีขนาด 589.6 ± 81.6 nm และมีค่า Zeta potential เท่ากับ 13.08 ± 1.73 mV ไลโปโซม **Ga** มีค่า Zeta potential มากกว่าไลโปโซม **Ab** เนื่องมาจากส่วนหัวมีขั้วของ **Ga** เป็นแบบ polycationic เมื่อเทียบผลประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ (**รูปที่ 3.1**) จะเห็นว่าไลโปโซม **Ga** มีประสิทธิภาพดีกว่าไลโปโซม **Ab** เมื่อเตรียมไลโปโซมจากสารผสม **Ga** และ **Ab** พบว่า ขนาดของไลโปโซมมีค่าเท่ากับ 116.9 ± 17.6 และมีค่า Zeta potential เท่ากับ 41.46 ± 1.48 mV จะเห็นว่าขนาดของไลโปโซมมีขนาดเล็ก แต่ยังคงมีค่า Zeta potential ที่สูง ทั้งนี้ค่า Zeta potential ของไลโปโซมที่สูงส่งผลให้การจับกับดีเอ็นเอ และเกิดอันตรกิริยากับผนังเซลล์ได้ดี จึงส่งผลให้ประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้ดีด้วย

ตารางที่ 3.1 Particle size และ Zeta potential ของไลโปโซม **Ga**, **Ab** และ ไลปโซม **Ga** ผสม **Ab**

Liposome	Particle size (nm ± SD)	Zeta potential (mV ± SD)
Ga	54.8 ± 16.7	49.35 ± 4.75
Ab	589.6 ± 81.6	13.08 ± 1.73
Ga + **Ab**	116.9 ± 17.6	41.46 ± 1.48

วิธีการ

1. การเตรียมไลโปโซมและสารประกอบเชิงซ้อนไลโปโซมและดีเอ็นเอ

ไลโปโซมเตรียมจากสารผสมของไขมันประจุบวก **Ga**, **Ab** และ **Ga** ผสม **Ab** โดยใช้วิธี sonication กล่าวคือนำไขมันประจุบวกละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ ($CHCl_3$ และ MeOH) ระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกโดยใช้แก๊สไนโตรเจน นำฟิล์มสารที่ได้ไปใส่ใน desiccators ข้ามคืน นำฟิล์มสารมาทำให้ชื้นด้วย PBS buffer (pH 7.4) และ sonicate ประมาณ 30 นาที ได้ไลโปโซม นำไลโปโซมที่เตรียมได้มาผสมกับดีเอ็นเอในอัตราส่วนตามต้องการ ปิเปตขึ้นและลงที่อุณหภูมิห้อง ตั้งไว้ 30 นาทีก่อนการใช้งาน

ไลโปโซมผสม **Ga** และ **Ab** เตรียมโดยละลาย **Ga** และ **Ab** ในตัวทำละลายอินทรีย์ ($CHCl_3$ และ MeOH) ปิเปตสารละลาย **Ga** และ **Ab** มาผสมกันในอัตราส่วนโดยน้ำหนักต่าง ๆ นำสารละลายผสม **Ga** และ

Ab ระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกโดยใช้แก๊สไนโตรเจน นำฟิล์มสารที่ได้ไปใส่ใน desiccators ข้ามคืน นำฟิล์มสารมาทำให้ชื้นด้วย PBS buffer (pH 7.4) และ sonicate ประมาณ 30 นาที ได้ไลโปโซม

2. การศึกษาการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์

เตรียม HEK293 เซลล์ ($2x10^4$ เซลล์ต่อหลุม) ใน complete medium (MEM ประกอบด้วย 10% fetal bovine serum, supplemented with 1 % L-glutamine, 1% non-essential amino acids solution, 100 U/mL penicillin and 100 μg/mL streptomycin) บ่มที่ 37 C และ 5% CO_2 ก่อนการทดลอง 1 วัน ในวันทำการทดลองทิ้ง medium แล้วใส่สารประกอบเชิงซ้อนไลโปโซม-ดีเอ็นเอ ใน medium ที่ไม่มี serum บ่ม 24 ชม นำเซลล์มาล้างด้วย PBS buffer (pH 7.4) และใส่ complete medium แทน วิเคราะห์ประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์โดยนับจำนวนเซลล์ที่ปรากฏการเรืองแสงสีเขียวด้วยกล้อง fluorescence microscope (excitation filter 480/40 and emission filter 535/50).

3. การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์

ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT เตรียม HEK293 เซลล์ ($8x10^3$ เซลล์ต่อหลุม) ใน complete medium บ่มที่ 37 C และ 5% CO_2 ก่อนการทดลอง 1 วัน ทิ้ง medium แล้วใส่สารประกอบเชิงซ้อนไลโปโซม-ดีเอ็นเอ ใน medium ที่ไม่มี serum บ่ม 24 ชม นำเซลล์มาล้างด้วย PBS buffer (pH 7.4) และใส่ medium ที่มี MTT (1 mg/mL) บ่ม 4 ชม หลังจาก 4 ชม ใส่ DMSO เพื่อละลายผลึก formazan ที่เกิดขึ้นจากเซลล์ที่รอดชีวิต วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader

สรุปผลการศึกษาและวิจารณ์ผล

จากการศึกษาผลของสารผสมไขมันประจุบวกต่อประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ พบว่าไลโปโซมผสม **Ga** และ **Ab** สามารถออกฤทธิ์เสริมกัน ซึ่งมีประสิทธิภาพดีกว่าสารเกรดการค้า Lipofectamine™2000 มากกว่า 3 เท่า ไลโปโซมผสม Ga และ Ab มีประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้ดีกว่าไลโปโซมที่เตรียมจาก **Ga** และ **Ab** เดี่ยว ๆ ถึง 6 และ 17 เท่า ตามลำดับ นอกจากนี้ไขมันประจุบวกผสมนี้มีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่าสารมาตรฐาน Lipofectamine™ 2000

เอกสารอ้างอิง

1. Wang, L. and MacDonald R.C. *Mol. Pharm.* 2007, vol. 4, pp. 615–623.
2. Caracciolo, G., Pozzi, D., Caminiti, R., Montani, M., Amici, A. and Amenitsch, H. *Appl. Phys. Lett.* 2006, vol. 89, pp. 2339031–2339033.

3. Yingyongnarongkul, B., Radchatawedchakoon, W., Krajarng, A., Watanapokasin, R., and Suksamrarn, A. *Bioorg. Med. Chem*. 2009, vol. 17, pp. 176-188.

4. Paecharoenchai, O., Niyomtham, N., Apirakaramwong, A., Ngawhirunpat, T., Rojanarata, T., Yingyongnarongkul, B., and Opanasopit, P. *AAPS Pharm. Sci. Tech*. 2013, vol. 13, pp. 1302-1308.

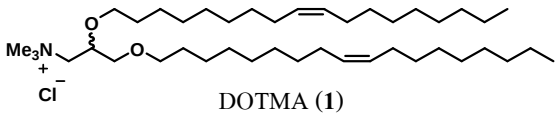
โครงการย่อยที่ 4
การสังเคราะห์และประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของไขมันประจุบวกที่มีโครงสร้างส่วนกลางที่หลากหลาย

โครงการย่อยที่ 4

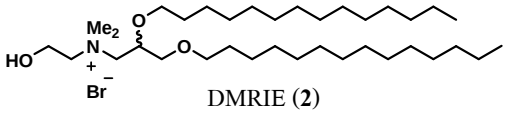
การสังเคราะห์และประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของไขมันประจุบวกที่มีโครงสร้างส่วนกลางที่หลากหลาย

ผลการศึกษา

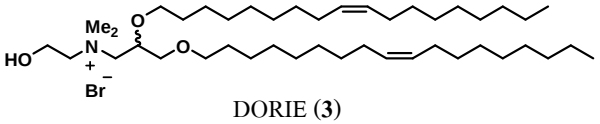
ไขมันประจุบวกเป็นระบบนำส่งชนิดไม่ใช่ไวรัส (non-viral vector) เป็นระบบนำส่งที่มีผู้ให้ความสนใจศึกษากันอย่างกว้างขวาง ทั้งนี้เนื่องจากไขมันประจุบวกสามารถเตรียมได้ง่าย ไม่มีความเป็นพิษกับเซลล์ สามารถนำส่งดีเอ็นเอ และยาทั้งมีขั้วและไม่มีขั้วเข้าไปในเซลล์ได้ ไขมันประจุบวกส่วนใหญ่ มีส่วนหัวมีขั้วที่มีประจุบวกหนึ่งหรือหลายประจุ และมี aminoglycerol เป็นโครงสร้างส่วนกลาง ตัวอย่างเช่น DOTMA (**1**),[1] DMRIE (**2**),[2] DORIE (**3**),[2] DOTAP (**4**)[3] และ DOSPA (**5**)[4] นอกจากนี้ยังมีรายงานไขมันประจุบวกที่มีโครงสร้าง aminoglycerol เป็นโครงสร้างส่วนกลางอีกหลายชนิดที่มีรายงานการสังเคราะห์และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ[5]



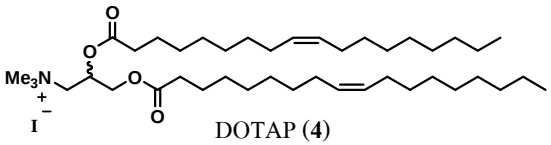
DOTMA (**1**)



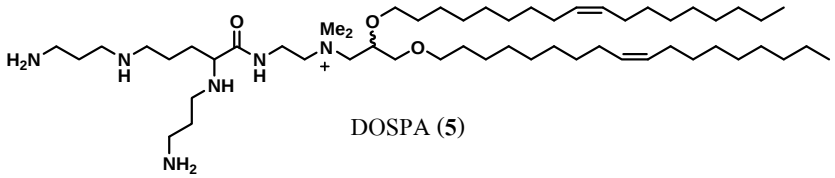
DMRIE (**2**)



DORIE (**3**)



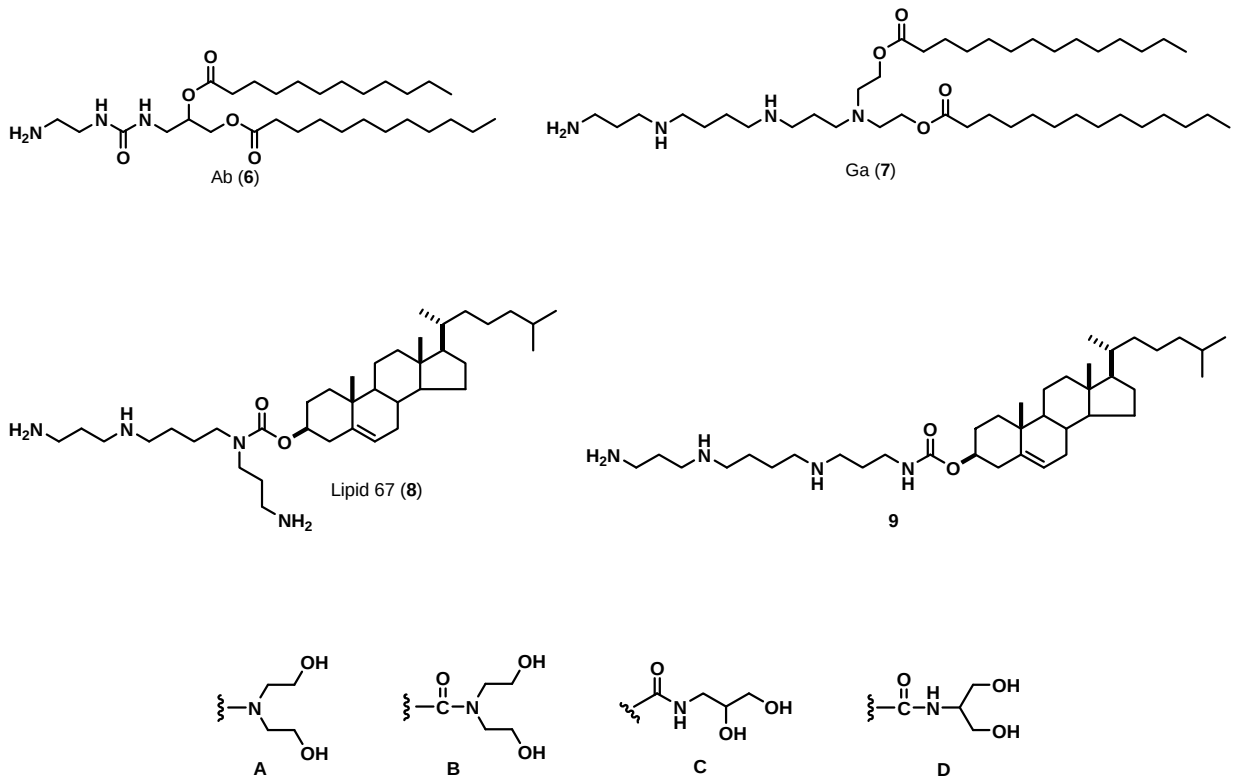
DOTAP (**4**)



DOSPA (**5**)

เมื่อไม่นานมานี้ ได้รายงานการสังเคราะห์และศึกษาประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของไขมันประจุบวกที่มีโครงสร้างหลักต่างกันสองชนิดคือ **Ab** (**6**)[6] และ **Ga** (**7**)[7] โดยที่ **Ab** มี aminoglycerol เป็นโครงสร้างหลัก ในขณะที่ **Ga** มี dihydroxyethyl amino เป็นโครงสร้างหลัก ซึ่งสารสั้งสองมีประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้ดี อย่างไรก็ตาม สารทั้งสองมีส่วนหัวมีขั้วที่ต่างกัน ส่วนหัวมีขั้วเป็นส่วนสำคัญอย่างหนึ่งสำหรับทำให้ไลโปโซมมีประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้ดี พอลีเอมีน โดยเฉพาะการใช้ spermine เป็นส่วนหัวมีขั้วในการสังเคราะห์ไขมันประจุบวกที่มีคอเลสเตอรอลเป็นส่วนไม่มีขั้ว เช่น lipid 67

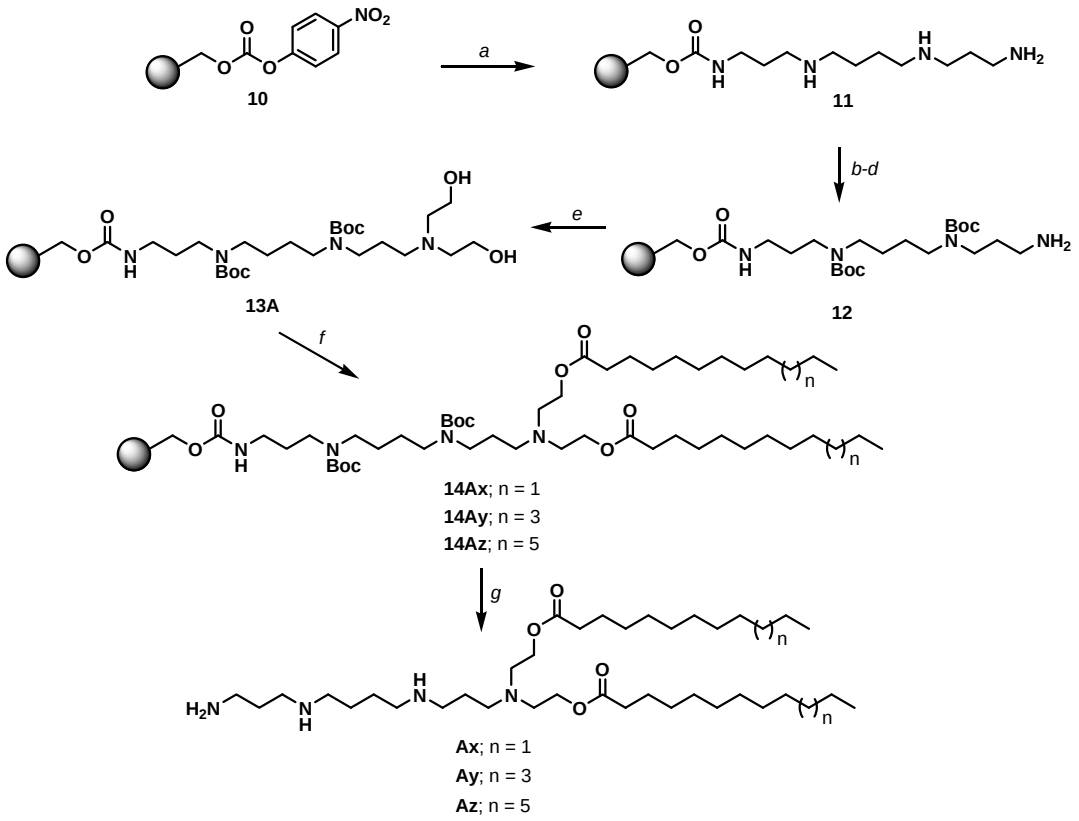
(**8**)[8] และ **9**[9] แต่จากการศึกษาไม่พบว่ามีการรายงานการใช้ spermine ในการสังเคราะห์ไขมันประจุบวกที่มีสายโซ่ไฮโดรคาร์บอนเป็นส่วนไม่มีขั้วมาก่อน ดังนั้นในการวิจัยนี้ทำการสังเคราะห์ไขมันประจุบวกที่มี spermine เป็นส่วนหัวมีขั้ว และใช้กรดไขมันที่มีความยาวคาร์บอน 12, 14 และ 16 อะตอม และทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างหลักเป็น di(hydroxyethyl)amino (**A**), carbonyl-di(hydroxyethyl)amino (**B**), aminoglycerol (**C**) และ 2-amino-1,3-propaindiol (**D**)



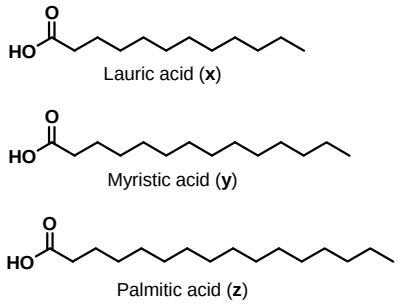
รูปที่ 4.1 โครงสร้างหลักที่ใช้ในการสังเคราะห์ไขมันประจุบวก

การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก Ax-Dz

การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก Ax-Dz แสดงใน Scheme 4.1 และ 4.2 โดยเริ่มจากนำ resin **10**[10] มาทำปฏิกิริยากับ spermine ที่มากเกินพอในตัวทำละลายผสม CH_2Cl_2/DMF ได้สาร **11** ทำการป้องกันหมู่เอมีนชนิดปฐมภูมิด้วยหมู่ Dde-OH และป้องกันหมู่เอมีนชนิดทุติยะภูมิด้วยหมู่ Boc หลังจากนั้นกำจัดหมู่ป้องกัน Dde ออกด้วย 2% N_2H_4/DMF ได้สาร **12** ทำการเปลี่ยนหมู่เอมีนชนิดปฐมภูมิของสาร **12** ให้ได้โครงสร้างหลัก di(hydroxyethyl)amino ด้วย 2-bromoethanol ในสภาวะเบส (DIPEA) ในตัวทำละลาย DMF ได้สาร **13** นำสาร **13** ที่ได้มาทำปฏิกิริยากับกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนต่าง ๆ (รูปที่ 2) โดยใช้ DIC เป็นสาร coupling ได้สาร **14** นำสาร **14** ไปทำปฏิกิริยากับ 20% TFA/CH_2Cl_2 หลังจากระเหยตัวทำละลายออกได้สาร **Ax-Az** ตามต้องการ

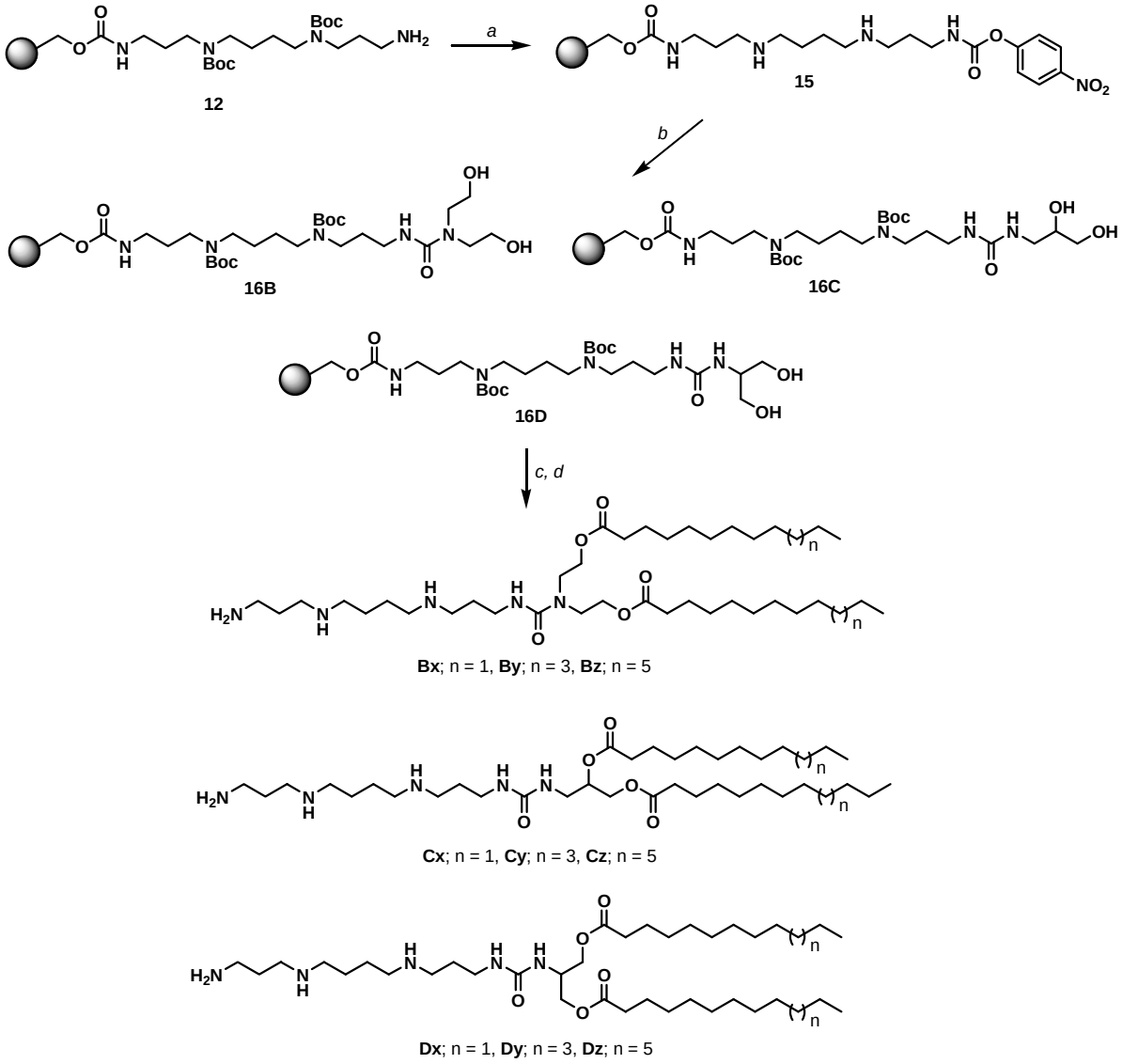


Scheme 4.1. *Reagents and conditions*: a) spermine (excess) CH_2Cl_2:DMF; b) 2-acetyl-5,5-dimethyl-cyclohexan-1,3-dione, CH_2Cl_2; c) Boc_2O, pyridine, CH_2Cl_2; d) 2% N_2H_4, DMF; e) 2-bromoethanol, DIPEA, DMF; f) fatty acids **x-z** (รูปที่ 4.2), DIC, CH_2Cl_2, DMF; g) 20% TFA, CH_2Cl_2.



รูปที่ 4.2 กรดไขมันที่ใช้ในการสังเคราะห์ไขมันประจุบวก

การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก Bx-Dz แสดงดัง Scheme 4.2 โดยนำสาร **12** ซึ่งมี spermine ที่ใส่หมู่ป้องกันไว้แล้ว มาทำปฏิกิริยากับ 4-nitrophenyl chloroformate โดยมีเบส pyridine ได้สาร **15** นำสาร **15** มาทำปฏิกิริยากับเอมีนชนิดต่าง ๆ ได้สาร **16B**, **16C** และ **16D** ซึ่งมีโครงสร้างหลัก carbonyl-di(hydroxyethyl)amino, aminoglycerol และ 2-amino-1,3-propaindiol ตามลำดับ นำสาร **16B-16D** ทำปฏิกิริยากับกรดไขมันชนิดต่าง ๆ (รูปที่ 4.2) หลังจากนั้นทำ)กิกิริยาต่อกับ 20% TFA/CH_2Cl_2 ได้สาร **Bx-Dz**

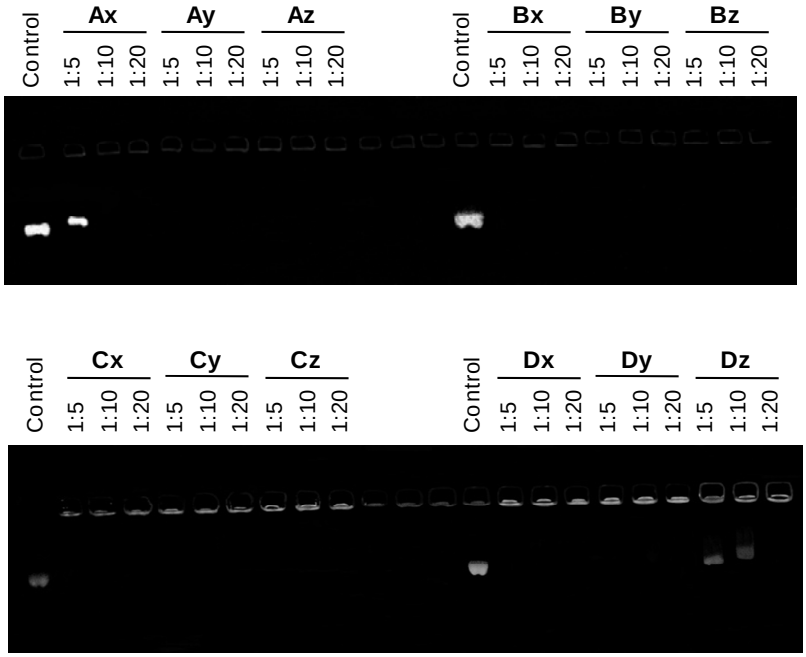


Scheme 4.2. *Reagents and conditions*: a) *p*-nitrophenyl chlorofornate, CH_2Cl_2, pyridine; b) bis(2-hydroxyethyl)amine (for **16B**) or 1-amino-2,3-propanediol (for **16C**) or 2-amino-1,3-propanediol (for **16D**) (excess); c) fatty acids **x-z** (ดูรูปที่ 2) , DIC, CH_2Cl_2, DMF; d) 20% TFA, CH_2Cl_2.

การศึกษาการจับดีเอ็นเอของไขมันประจุบวก Ax-Dz

นำสารสังเคราะห์ไขมันประจุบวกที่มีโครงสร้างหลักต่างกันมาศึกษาประสิทธิภาพในการจับ (bind) ดีเอ็นเอ ในการทดลองนี้ใช้วิธีการทางอิเล็กโตรโฟเรซีส เพื่อดูการหน่วงการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ ในการศึกษานี้เตรียมดีเอ็นเอต่อไลโปโซมในอัตราส่วน 1:5, 1:10 และ 1:20 โดยน้ำหนัก ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.3 พบว่า ไขมันประจุบวกทุกสารสามารถจับกับดีเอ็นเอได้ดี ยกเว้นไขมันประจุบวก **Ax** และ **Dz** จับกับดีเอ็นเอได้บางส่วนที่อัตราส่วนดีเอ็นเอต่อไลโปโซม 1:5 ในการศึกษาเบื้องต้นนี้สรุปได้ว่าโครงสร้างหลักที่ต่างกันไม่

ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการจับกับดีเอ็นเอ การที่สารสังเคราะห์ดังกล่าวจับกับดีเอ็นเอได้ดีอาจมีผลมาจากการใช้ spermine เป็นส่วนหัวมีขั้ว

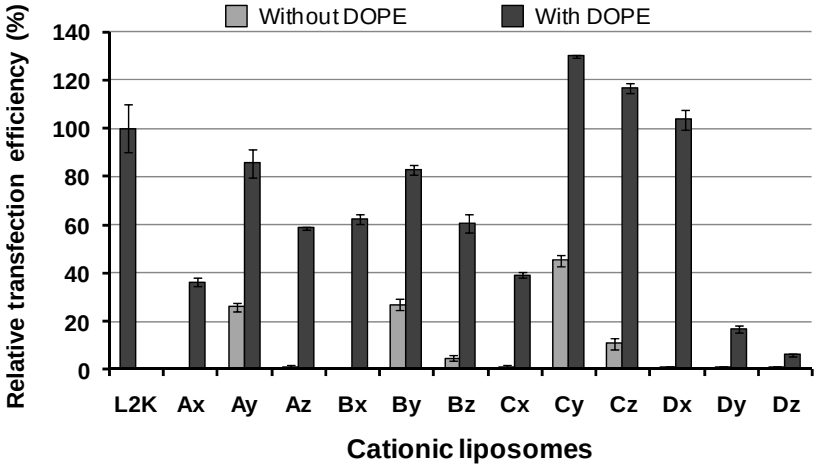


รูปที่ 4.3 การทดสอบการหน่วงการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอของไขมันประจุบวก Ax-**Dz**

การศึกษาการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของไขมันประจุบวก Ax-Dz

ในการศึกษาประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของไขมันประจุบวก **Ax-Dz** ในเบื้องต้นศึกษาผลของไขมันตัวช่วยต่อประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่ HeLa เซลล์ โดยเตรียมไลโปโซมจากไขมันประจุบวก และไขมันประจุบวกผสม DOPE ในอัตรา 1:1 (โดยน้ำหนัก) ใช้อัตราส่วนดีเอ็นเอต่อไลโปโซม 1:20 (โดยน้ำหนัก) และปริมาณดีเอ็นเอ 0.1 μg ต่อหลุม ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.4 จากผลการทดลองพบว่าไขมันประจุบวกเกือบทั้งหมดจำเป็นต้องใช้ไขมันตัวช่วย ในการเพิ่มประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ ไขมันประจุบวก **Cy**, **Cz** และ **Dx** มีประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้ดีกว่าสารมาตรฐาน Lipofectamine^{TM} 2000 (L2K) และยังพบว่าไขมันปจะจุบวก **Ay** และ **By** มีประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้ดี แต่ก็ยังมีประสิทธิภาพต่ำกว่าไขมันประจุบวก **Cy**, **Cz** และ **Dx** จากผลการทดลองทำให้ทราบว่าโครงสร้างส่วนกลางของไขมันประจุบวกมีผลต่อประสิทธิ์ภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ ไขมันประจุบวกที่มี aminoglycerol (ไขมันประจุบวก **Cy** และ **Cz**) เป็นโครงสร้างส่วนกลางมีประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอได้ดีที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าความยาวของสายโซ่ของส่วนไม่มีขั้วก็มีความจำเป็นต่อการมีประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เช่นกัน ซึ่งพบว่าไขมันประจุบวกที่มีโครงสร้างส่วนกลางเหมือนกันมีประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ดีที่สุดเมื่อมี myristic acid (14 คาร์บอน) เป็นส่วนไม่มีขั้ว ยกเว้นไขมันประจุบวก **Dx**

ซึ่งมี 2-amino-1,3-propanediol เป็นโครงสร้างส่วนกลาง มีประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอดีที่สุดเมื่อมีส่วนไม่มีขั้วยาว 12 คาร์บอน

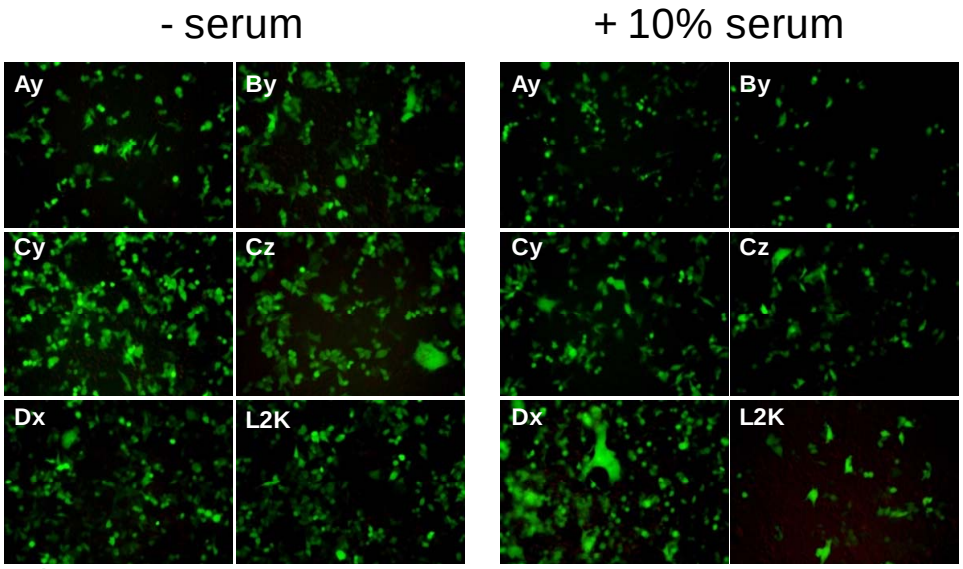


รูปที่ 4.4 ผลของไขมันตัวช่วยต่อการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของประจุบวก **Ax**-Dz

ผลของซีรัมต่อประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์

ปัจจัยหนึ่งที่เป็นตัวบ่งชี้ว่าสามารถนำไขมันประจุบวกไปศึกษาการใช้เป็นระบบนำส่งยาคือ ผลของ serum ต่อประสิทธิภาพการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ ซึ่งไขมันประจุบวกส่วนมากมีประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ต่ำลงเมื่อทำการทดลองในสภาวะที่มีซีรัม ดังนั้นเพื่อทำการศึกษาผลของโครงสร้างส่วนกลางต่อประสิทธิภาพในกาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ในสภาวะที่มีซีรัม นำไขมันประจุบวก **Ay**, **By**, **Cy**, **Cz** และ **Dx** มาศึกษาประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่ HeLa เซลล์ โดยการทดลองนี้จะใช้สภาวะที่มีปริมาณของ serum 10% และใช้ Lipofectamine™ 2000 เป็นสารมาตรฐาน เพื่อทำการศึกษาให้เห็นถึงจำนวนเซลล์ที่แท้จริงในการรับดีเอ็นเอ ในการทดลองนี้ใช้ดีเอ็นเอที่มี green fluorescence protein (GFP) เป็นโปรตีนแสดงผล โดยทำการทดลองเทียบกับสารมาตรฐาน Lipofectamine™ 2000 (L2K) ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.5

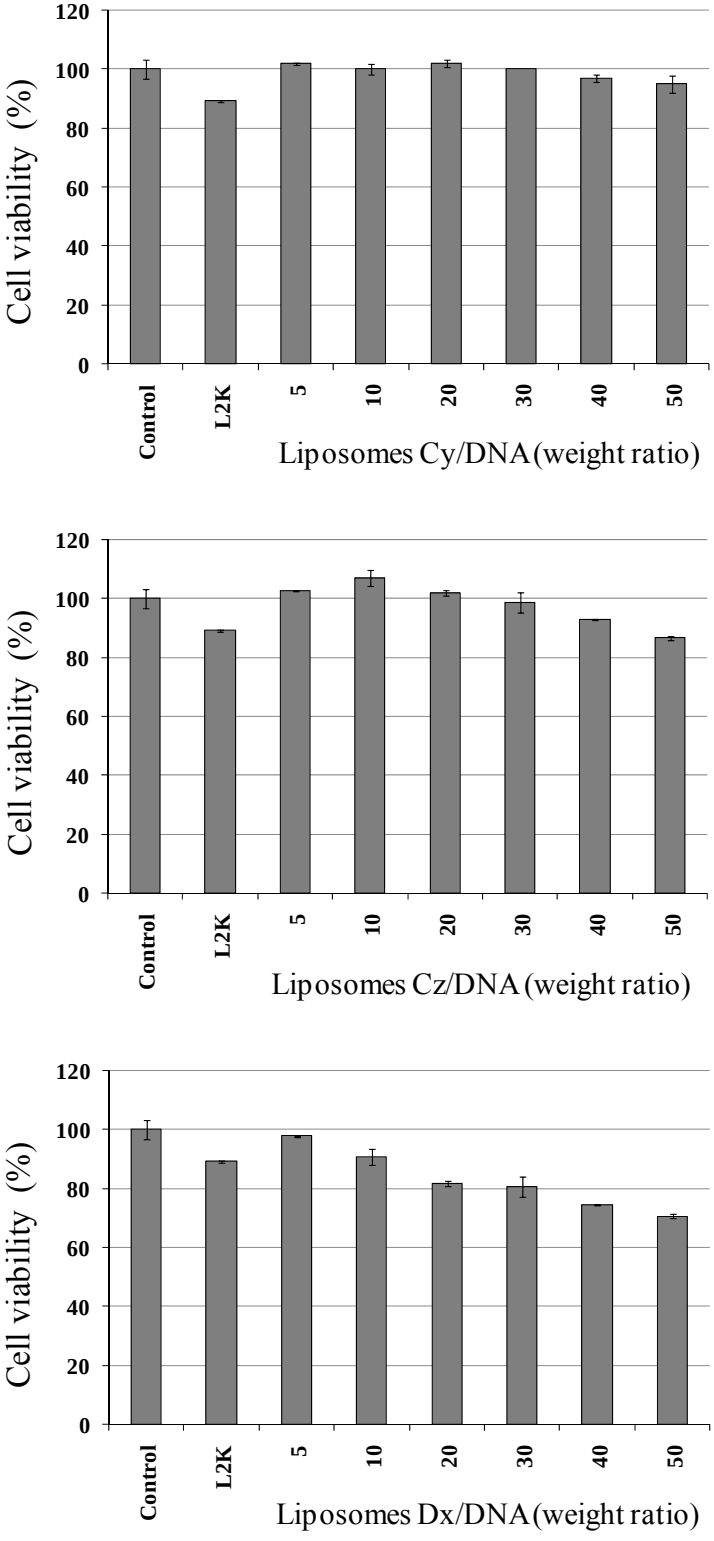
จากผลการทดลองพบว่า ไขมันประจุบวก **Cy** และ **Cz** มีประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่ HeLa เซลล์ในสภาวะไม่มีซีรัม ได้ดีเทียบเท่าสารมาตรฐาน Lipofectamine™ 2000 เป็นที่น่าสนใจว่า ไขมันประจุบวก **Dx** ซึ่งมี 2-amino-1,3-propanediol โครงสร้างส่วนกลาง มีประสิทธิภาพสูงขึ้นในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ HeLa ในสภาวะที่มีซีรัม 10% ในขณะที่ไขมันประจุบวก **Cy**, **Cz** และ Lipofectamine™ 2000 มีประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ที่ต่ำลง โดยเฉพาะสารมาตรฐาน Lipofectamine™ 2000 มีประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ที่ต่ำลงมาก



รูปที่ 4.5 ผลของซีรัมต่อประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของไขมันประจุบวก

ความเป็นพิษต่อเซลล์ของไขมันปรจุบวก

ความเป็นพิษของระบบนำส่งเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่จำเป็นต้องศึกษาการนำไปพัฒนาใช้ ดังนั้นจึงทำการทดสอบความเป็นพิษของไขมันประจุบวก **Cy**, **Cz**, **Dx** และ Lipofectamine™ 2000 โดยใช้วิธี MTT และทดสอบกับเซลล์ HeLa การทดลองนี้ใช้สภาวะในการทดลองเช่นเดียวกับการทดสอบประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ กล่าวคือ ใช้ปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 0.1 μg/well และทำการทดลองที่อัตราส่วนโดยน้ำหนักของไลโปโซมต่อดีเอ็นเอตั้งแต่ 5-50 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.6 จากการทดลองพบว่าไขมันประจุบวก **Cy** และ **Cz** ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบ โดยเทียบกับผลการทดสอบการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ที่อัตราส่วน ไลโปโซมต่อดีเอ็นเอ เท่ากับ 20 ปริมาณเซลล์อยู่รอด (cell viability) ประมาณ 100 % ในขณะที่ ไลโปโซม **Dx** มีปริมาณเซลล์อยู่รอดที่ 80% ซึ่งถือว่ามีความเป็นพิษต่ำ สารมาตรฐาน Lipofectamine™ 2000 (L2K) ซึ่งมีปริมาณเซลล์อยู่รอด 90% เมื่อเพิ่มปริมาณไลโปโซมมากขึ้น (weight ratio 30-50) พบว่าไขมันประจุบวก **Cy** และ **Cz** ยังมีปริมาณเซลล์อยู่รอดที่มากกว่า 85% ในขณะที่ปริมาณเซลล์อยู่รอดประมาณ 75% เมื่อทดสอบด้วยไลโปโซม **Dx** ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำไลโปโซมที่เตรียมจากไขมันประจุบวก **Cy**, **Cz** และ**Dx** ไปศึกษาเพื่อเป็นระบบนำส่งยาต่อไป



รูปที่ 4.6 ความเป็นพิษต่อเซลล์ HeLa ของไขมันประจุบวก

วิธีการ

1. การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก Ax-Az

นำสารละลาย spermine (0.328 g. 1.62 mmole) ในตัวทำละลาย CH_2Cl_2/DMF (8:2, 10 มล.) เติมลงใน resin **10** เขย่าสารผสมที่ได้ข้ามคืน กรอง และล้าง resin ด้วยตัวทำละลาย CH_2Cl_2, DMF, MeOH, DMF และ CH_2Cl_2 (จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 5 มล.) ได้ resin **11** นำสารละลาย Dde-OH (0.295 g, 1.62 mmole) ในตัวทำละลาย CH_2Cl_2 (5 มล.) เติมลงไปใน resin **11** เขย่าสารผสมที่ได้ข้ามคืน กรอง และล้าง resin ด้วยตัวทำละลายข้างต้น นำ resin ที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ลดความดัน อย่างน้อง 2 ชม. เติมสารละลาย Boc_2O (0.531 g, 2.43 mmole) ในตัวทำละลาย CH_2Cl_2 ลงใน resin ข้างต้น เขย่าสารผสมที่ได้ข้ามคืน กรอง และล้าง resin ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม นำ resin ที่ล้างสะอาดแล้วมาเติม 2% N_2H_4 ในตัวทำละลาย DMF เขย่าปฏิกิริยานาน 30 นาที ล้าง resin ด้วย CH_2Cl_2 และ DMF นำ resin ที่ได้มาทำปฏิกิริยากับ 2% N_2H_4 ในตัวทำละลาย ซ้ำนาน 30 นาที ล้าง resin ที่ได้ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์จนสะอาดได้ resin **12** นำ resin **12** มาเติมสารละลาย 2-bromoethanol ที่มากเกินพอในตัวทำละลาย DMF เขย่าสารผสมข้ามคืน นำ resin ที่ได้ล้างด้วยตัวทำละลายข้างต้น ได้ resin **13A**

แบ่ง resin **13A** ออกเป็น 3 ส่วน แต่ละส่วนนำมาทำปฏิกิริยากับกรดไขมัน **x** หรือ **y** หรือ **z** (6 equiv) (รูปที่ 2) และ DIC (6 equiv) ในตัวทำละลาย CH_2Cl_2/DMF (2:1) เขย่าสารผสมข้ามคืน ล้าง resin ที่ได้ให้สะอาดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ได้ resin 14Ax-14Az นำ resin ที่ได้ไประเหยตัวทำละลายภายใต้สุญญากาศนาน 2 ชม. นำ resin **14Ax-14Az** มาเติม 20% TFA/CH_2Cl_2 (1.5 มล.) เขย่าปฏิกิริยานาน 2 ชม. กรอง และเก็บส่วนสารละลาย ล้าง resin ด้วย CH_2Cl_2 (2 มล.) เก็บสารละลายไปรวมกับส่วนแรก ระเหยตัวทำละลายออกด้วยแก๊สไนโตรเจน ได้สาร **Ax-Az** นำสารทำได้ไประเหยออกภายใต้ลดความดัน 2 ชม.

2. การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก Bx-Dz

ละลาย 4-nitrophenyl chloroformate (1.215 g, 6.03 mmole) ในตัวทำละลาย CH_2Cl_2 (12 มล.) เติมสารละลายที่ได้ลงใน resin **12** ค่อย ๆ เติม pyridine (1 มล.) เขย่าปฏิกิริยานาน 6 ชม. กรอง resin **15** ที่ได้ และล้างด้วยตัวทำละลาย CH_2Cl_2, MeOH และ CH_2Cl_2 (3 x 15 มล.) นำ resin 15 ระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ลดความดัน แบ่ง resin **15** ออกเป็น 3 ส่วน (ส่วนละ 0.350 g, 0.469 mmole) นำส่วนที่ 1 ไปทำปฏิกิริยากับ bis(hydroxyethyl)amine (20 equiv) ส่วนที่ 2 ไปทำปฏิกิริยากับ 3-amino1,2-propanediol (20 equiv) และส่วนที่ 3 ไปทำปฏิกิริยากับ 2-amino-1,3-propaindiol (20 equiv) ในตัวทำละลาย CH_2Cl_2/DMF (5 มล.) เขย่าปฏิกิริยาข้ามคืน กรอง และ ล้างปฏิกิริยาด้วย CH_2Cl_2, DMF, MeOH, DMF and CH_2Cl_2 (3 × 5 มล.) ระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ลดความดัน 2 ชม. ได้ resin **16B-16D**

แบ่ง resin **16B-16D** แต่ละสารออกเป็น 3 ส่วน (ส่วนละ 100 mg, 0.134 mmole) นำแต่ละส่วนไปทำปฏิกิริยากับกรดไขมัน (รูปที่ 2) (6 equiv) โดยใช้ DIC (6 equiv) เป็นสารตัวเชื่อม และ DMAP เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในตัวทำละลาย CH_2Cl_2/DMF (2:1, 1.5 มล.) เขย่าปฏิกิริยาข้ามคืน กรองและล้าง resin ที่ได้ด้วย

CH_2Cl_2, MeOH, DMF, MeOH และ CH_2Cl_2 (3 × 3 มล.) ระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ลดความดัน 2 ชม. นำ resin ที่ได้มาทำปฏิกิริยากับ 20% TFA/CH_2Cl_2 (1.5 มล.) เขย่าปฏิกิริยานาน 2 ชม. กรอง และเก็บส่วนสารละลาย ล้าง resin ด้วย CH_2Cl_2 (2 มล.) เก็บสารละลายไปรวมกับส่วนแรก ระเหยตัวทำละลายออกด้วยแก๊สไนโตรเจน ได้สาร **Bx-Dz** นำสารทำได้ไประเหยออกภายใต้ลดความดัน 2 ชม.

3. การเตรียมไลโปโซม

ไลโปโซมเตรียมจากไขมันประจุบวก นำไขมันประจุบวก **Ax-Dz** ละลายในเอทานอล ระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกโดยใช้แก๊สไนโตรเจนทำให้เกิดฟิล์มบาง นำฟิล์มสารที่ได้ระเหยตัวละลายออกภายใต้ลดความดันอย่างน้อย 2 ชม. นำฟิล์มสารมาทำให้ชื้นด้วย PBS buffer (pH 7.4) โดยเตรียมให้มีความเข้มข้น 1 μg/μl และ sonicate ประมาณ 30 นาที ได้ไลโปโซมที่ไม่มีส่วนผสมของ DOPE

ไลโปโซมเตรียมจากไขมันประจุบวกผสม DOPE นำไขมันประจุบวก **Ax-Dz** ละลายในเอทานอล และละลายไขมันตัวช่วย (helper lipid) ละลายใน CH_2Cl_2 ปิเปตสารละลายไขมันประจุบวกและสารละลายไขมันตัวช่วย มาผสมกันในอัตราส่วนโดยน้ำหนักต่าง ๆ นำสารละลายผสมที่ได้มาระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกโดยใช้แก๊สไนโตรเจน นำฟิล์มสารที่ได้ไปใส่ใน desiccators ข้ามคืน นำฟิล์มบางของสารมาทำให้ชื้นด้วย PBS buffer (pH 7.4) และ sonicate ประมาณ 30 นาที ได้ไลโปโซมที่มี DOPE เป็นส่วนผสม

4. การเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนไลโปโซมและดีเอ็นเอ

ปิเปตดีเอ็นเอ (0.1 μg/μL) ที่มี β-galactosidase เป็นเอ็นไซม์แสดงผล ลงใน Eppendrof ปิเปตไลโปโซม (1 μg/μL) ปริมาณที่ต้องการลงไปผสมกับดีเอ็นเอ ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที เติม PBS buffer (pH 7.4) ลงไปในสารผสมให้มีความเข้มข้นดีเอ็นเอ 0.1 μg/10 μL

5. การศึกษาการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์

เตรียม HeLa เซลล์ ($1x10^4$ เซลล์ต่อหลุม) ใน complete medium (MEM ประกอบด้วย 10% fetal bovine serum, supplemented with 1 % L-glutamine, 1% non-essential amino acids solution, 100 U/mL penicillin and 100 μg/mL streptomycin) บ่มที่ 37 C และ 5% CO_2 ก่อนการทดลอง 1 วัน ในวันทำการทดลองทิ้ง medium แล้วใส่สารประกอบเชิงซ้อนไลโปโซม-ดีเอ็นเอ ใน medium ที่ไม่มี serum บ่ม 24 ชม นำเซลล์มาล้างด้วย PBS buffer (pH 7.4) และใส่ complete medium แทน วิเคราะห์ประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์โดยนับจำนวนเซลล์ที่ปรากฏการเรืองแสงสีเขียวด้วยกล้อง fluorescence microscope (excitation filter 480/40 and emission filter 535/50).

6. การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์

ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT เตรียม HeLa เซลล์ ($1x10^4$ เซลล์ต่อหลุม) ใน complete medium บ่มที่ 37 C และ 5% CO_2 ก่อนการทดลอง 1 วัน ทิ้ง medium แล้วใส่สารประกอบเชิงซ้อนไลโปโซม-ดีเอ็นเอ ใน medium ที่ไม่มี serum บ่ม 24 ชม นำเซลล์มาล้างด้วย PBS buffer (pH 7.4) และใส่ medium ที่มี MTT (1 mg/mL) บ่ม 4 ชม หลังจาก 4 ชม ใส่ DMSO เพื่อละลายผลึก formazan ที่เกิดขึ้นจากเซลล์ที่รอดชีวิต วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader

สรุปผลการศึกษาและวิจารณ์ผล

จากการศึกษาผลของโครงสร้างส่วนกลางของไขมันประจุบวกต่อประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ พบว่าไขมันประจุบวกที่มีโครงสร้างส่วนกลางทั้งสี่ชนิดจำเป็นต้องใช้ไขมันตัวช่วย (DOPE) เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอได้สูง ไขมันประจุบวก **Cy** และ **Cz** ซึ่งมี aminoglycerol เป็นโครงสร้างส่วนกลางมีประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้ดีในสภาวะไม่มีซีรัม ในขณะที่ไขมันประจุบวก **Dx** ซึ่งมี 2-amino-1,3-propanediol เป็นโครงสร้างส่วนกลางมีประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้ดีในสภาวะมีซีรัม และมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าสารมาตรฐาน Lipofectamine^{TM} 2000 ไขมันประจุบวกทั้งสามชนิดนี้ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์

เอกสารอ้างอิง

1. Felgner, P.L., Gadex, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M., Danielsen, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 7413–7417.
2. Felgner, J. H., Kumar, R., Sridhar, C. N., Wheeler, C. J., Tsai, Y. J., Border, R., Ramsey, P., Martin, M., Felgner. P. L. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 2550-2561.
3. Leventis, R., Silvius, J.R. Biochim. Biophys. Acta 1990, 1023, 124-132.
4. Gebeyehu, G., Jessee, J. A., Ciccarone, V. C., Hawley-Nelson, P., Chytil, A. U.S. Patent 5,334,761, 1994.
5. Zhi, D., Zhang, S., Cui, S., Zhao, Y., Wang, Y., Zhao, D. *Bioconjugate Chem*. **2013**, *24*, 847-519.
6. Yingyongnarongkul, B., Radchatawedchakoon, W., Krajarng, A., Watanapokasin, R., and Suksamrarn, A. *Bioorg. Med. Chem*. 2009, vol. 17, pp. 176-188.
7. Paecharoenchai, O., Niyomtham, N., Apirakaramwong, A., Ngawhirunpat, T., Rojanarata, T., Yingyongnarongkul, B., and Opanasopit, P. *AAPS Pharm. Sci. Tech*. 2013, vol. 13, pp. 1302-1308.
8. Lee, E.R., Marshall, J., Siegel, C.S., Jiang, C., Yew, N.S., Nichols, M.R., Nietupski, J.B., Ziegler, R.J., Lane, M.B., Wang, K.X., Wan, N.C., Scheule, R.K., Harris, D.J., Smith, A.E., Cheng, S.H. *Hum. Gene Ther.* **1996**, *7*, 1701-1717.

9. Cooper, R.G., Etheridge, C.J., Stewart, L., Marshall, J., Rudginsky, S., Cheng, S.H., Miller, A.D. *Chem. Eur. J*. **1998**, *4*, 137-151.

10. Yingyongnarongkul, B., Apiratikul, N., Aroonrerk, N., Suksamrarn, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **2006**, 16, 5870-5873.

ภาคผนวก

ผลงานวิจัย

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

1. Apiratikul, N.; Yingyongnarongkul, B.; Assavalapsakul, W. Highly efficient double stranded RNA transfection of penaeid shrimp using cationic liposomes. *Aquaculture Res.* **2012**, 1-7, doi:10.1111/j.1365-2109.2012.03209.x. (Impact factor (2013) = 1.320)
2. Apiratikul, N.; Penglong, T.; Suksen, K.; Svasti, S.; Chairoungdua, A.; Yingyongnarongkul B. In Vitro Delivery of Curcumin with Cholesterol-based Cationic Liposomes. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2013**, *39,* 497-503. (Impact factor (2013) = 0.623)
3. Paecharoenchai, O.; Niyomtham, N.; Leksantikul, L.; Ngawhirunpat, T.; Rojanarata, T.; Yingyongnarongkul, B.; Opanasopit1, P. Nonionic Surfactant Vesicles Composed of Novel Spermine-Derivative Cationic Lipids as an Effective Gene Carrier In Vitro. AAPS PharmSciTech 2014, DOI: 10.1208/s12249-014-0095-x. (Impact factor (2013) = 1.776)
4. Niyomtham, N.; Apiratikul, N.; Chanchang, K.; Opanasopit, P.; Yingyongnarongkul, B. Synergistic Effect of Cationic Lipids with Different Polarhead, Core Structures and Lipophihc Tails on Gene Transfection Efficiency. Bio. Pharm. Bull. 2014, in press. (Impact factor (2012) = 1.778)

Aquaculture Research

Aquaculture Research, 2012, 1–7 doi: 10.1111/j.1365-2109.2012.03209.x

Highly efficient double-stranded RNA transfection of penaeid shrimp using cationic liposomes

Nuttapon Apiratikul[1], Boon-ek Yingyongnarongkul[1] & Wanchai Assavalapsakul[2]

[1]Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Bangkok, Thailand

[2]Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

Correspondence: W Assavalapsakul, Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phyathai Rd, Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand. E-mail: wanchai.a@chula.ac.th

Abstract

Yellow head virus (YHV) is a viral pathogen of shrimp that has caused high economic loss in the Thai shrimp farming industry, and the RNA interference mechanism has potential as a virus control strategy, as previous studies have shown that injection of virus specific double-stranded RNA (dsRNA) can inhibit viral replication in shrimp. However, to date, complete inhibition viral replication has not been achieved. This study sought to determine whether cationic liposomes mixed with an antiviral dsRNA (YHV-Pro-dsRNA) were able to enhance protection against YHV. The results showed that injection of a YHV-Pro-dsRNA/cationic liposome complex markedly increased protection against YHV as compared with naked YHV-Pro-dsRNA, suggesting that cationic liposomes enhance the uptake of protective dsRNA into shrimp cells.

Keywords: yellow head virus, shrimp, double-stranded RNA, cationic liposome, RNA interference

Introduction

Yellow head virus (YHV) is an enveloped virus containing an approximately 27 kb positive single stranded RNA genome (Tang & Lightner 1998) that can infect many species of penaeid shrimp (Flegel 1997). Upon infection shrimps show signs of yellowing of the cepharothorax area and general bleaching of body colour (Boonyaratpalin, Supamattaya, Kasornchandra, Direkbusaracom, Aekpanithanpong & Chantanachooklin 1993), and shrimps die some 2–4 days post infection. Over the last few years, YHV has had a major impact on shrimp aquaculture in Thailand, causing significant economic loss (Limsuwan *et al.* 2008; Senapin, Thaowbut, Gangnonngiw, Chuchird, Sriurairatana & Flegel 2010) and prompting investigation into strategies to prevent, control or treat infection with YHV.

RNA interference (RNAi) is an efficient and specific gene silencing mechanism activated during development that additionally functions as a defence mechanism in various organisms (Hannon 2002), and a number of studies have used RNAi as a therapeutic tool against viral infection of plants, humans and animals (Schwind, Zwiebel, Itaya, Ding, Wang, Krczal & Wassenegger 2009; Hunter, Ellis, Vanengelsdorp, Hayes, Westervelt, Glick, Williams, Sela, Maori, Pettis, Cox-Foster & Paldi 2010; Chen, Wang, He, Song, Wu, Gao, Liu, He, Yang, Chen, Wang, Li, Li, Kaplan & Zhong 2011; Gish, Satishchandran, Young & Pachuk 2011; Jahan, Khaliq, Samreen, Ijaz, Khan, Ahmad, Ashfaq & Hassan 2011; Ma, Song, Wu, Jiang, Li, Zhu & Wen 2011). In penaeid shrimp, double-stranded RNA (dsRNA) injection has been shown to activate the RNAi pathway and results have shown that dsRNAs directed against specific viral sequences can interrupt or inhibit viral replication (Robalino, Bartlett, Shepard, Prior, Jaramillo, Scura, Chapman, Gross, Browdy & Warr 2005; Yodmuang, Tirasophon, Roshorm, Chinnirunvong & Panyim 2006; Tirasophon, Yodmuang, Chinnirunvong, Plongthongkum & Panyim 2007; Shekhar & Lu 2009), and this methodology has been used to cure naturally infected shrimp (Attasart, Kaewkhaw, Chimwai, Kongphom &

© 2012 Blackwell Publishing Ltd

Panyim 2011). However, to date the methodology has utilized the injection of naked dsRNAs into shrimp which may not be a particularly effective methodology in ensuring delivery of the dsRNA construct to cells, resulting in less than optimal protection or cure.

A number of biomaterials including cationic liposomes have been used to deliver either drugs or nucleic acids through the circulatory system to target cells while protecting the bioactive molecule from enzymatic degradation (Iwanaga, Ono, Narioka, Morimoto, Kakemi, Yamashita, Nango & Oku 1997; Mohammed, Westonb, Coombes, Fitzgerald & Perrie 2004; Mavichak, Takano, Kondo, Hirono, Wada, Hatai, Hatai, Inagawa, Takahashi, Yoshimura, Kiyono, Yuki & Aoki 2010). Cationic liposomes are small artificial spherically shaped vesicles with membranes composed of phospholipid bilayers. They can be made from natural nontoxic phospholipids and cholesterol with one or multiple concentric bilayers capable of encapsulating hydrophilic and hydrophobic molecules. A special characteristic of cationic liposomes that makes them suitable for biomolecule delivery is that they allow both water-soluble and water-insoluble materials to be encapsulated together with water-soluble materials being entrapped in the aqueous core, whereas water-insoluble and oil soluble hydrophobic molecules reside within the lipid bilayer (Wang, Wang, Chen & Shin 2009; Yang, Jin, Jiang, Li, Di, Ni & Fu 2011). In contrast to neutral or positively charged liposomes, cationic liposomes efficiently interact with negatively charged molecules (such as nucleic acids, including plasmids, messenger RNAs and synthetic oligonucleotides, as well as proteins and peptides), mainly through electrostatic interactions. These complexes are formed by incubation of both components and this process does not require an encapsulation step which has limited the development of classical liposomes as carriers (Lonez, Vandenbranden & Ruysschaert 2008). Electrostatic interactions between the positively charged cationic lipid complex and negatively charged cell membranes significantly improve uptake by cells, leading to improved nucleic acid delivery (Felgner, Gadek, Holm, Roman, Chan, Wenz, Northrop, Ringold & Danielsen 1987; Elouahabi & Ruysschaert 2005; Karmali & Chaudhuri 2007). This study therefore sought to determine whether encapsulation of dsRNA in cationic liposomes enhanced delivery of dsRNA to penaeid shrimp.

Materials and methods

Preparation of cationic liposomes [(*N*′-(3-aminopropyl)-*N*-(3′-(carbamoyl cholesteryl) propyl)-glycine amide; AmGly-Chol]

Catioinc lipid was synthesized by reacting 1,3-diaminopropane with Boc_2O using the high dilution method to give *N*-(tert-butoxycarbonyl)-1,3-diaminopropane. Condensation of *N*-(tert-butoxycarbonyl)-1,3-diaminopropane with chloroacetyl chloride in the presence of pyridine base at 0°C gave *N*-(tert-butoxycarbonyl)-*N*′-(chloroacetyl)-1,3-diaminopropane. 3β-Cholest-5-en-3-yl-*N*-(3-aminopropyl) carbamate was also prepared using the same methodology as for *N*-(tert-butoxycarbonyl)-1,3-diaminopropane. Alkylation of 3β-Cholest-5-en-3-yl-*N*-(3-aminopropyl) carbamate with *N*-(tert-butoxycarbonyl)-*N*′-(chloroacetyl)-1,3-diaminopropane to give a monoalkylated product which was achieved by refluxing in EtOH and in the presence of Et_3N. Finally, the Boc protecting group of the monoalkylated product was removed by treating with TFA in CH_2Cl_2 to produce cationic lipids with a good yield. A total of 1 mg of cationic lipid (AmGly-Chol) was dissolved in 1 mL of $CHCl_3$ in an Eppendorf tube. The organic solvent was evaporated under a stream of nitrogen and further dried under high vacuum for 24 h. When required, the resultant thin film of AmGly-Chol was hydrated with buffer containing 150 mM NaCl at room temperature and the mixture vortexed for 30 s and sonicated for 20 min.

Double-stranded RNA production and dsRNA-cationic liposome complex production

A recombinant clone expressing the stem loop of the YHV-protease (Pro) RNA was used to produce YHV-Pro-dsRNA as previously described (Yodmuang *et al.* 2006). Briefly, a single colony of the recombinant clone was cultured at 37°C in 2x YT medium containing 100 μg mL^{-1} of Ampicillin and 12.5 μg mL^{-1} of Tetracyclin until an OD_{600} of 0.4 was reached after which IPTG was added to a final concentration of 0.4 mM and cells incubated for a further 4 h. The bacterial cells (10 OD_{600}) were pelleted by centrifugation and resuspended in phosphate-buffered saline containing 0.1% (w/v) SDS. The sample was boiled for 2 min and immediately cooled on ice. To destroy single stranded RNA from the bacterial host and in the

 © 2012 Blackwell Publishing Ltd,

loop region of the stem loop of the YHV-Pro, RNase A buffer (300 mM sodium acetate, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0) and 1 μg RNase A was added and samples incubated for 30 min at 37°C. The double-stranded RNAs were extracted using the TRI Reagent (Molecular Research Center) according to manufacturer's protocol. Finally, the dsRNA was dissolved in 150 mM NaCl. The dsRNA concentration was determined using spectrophotometry at OD_{260}, and samples were stored at −80°C until use. dsRNA/cationic liposome complexes were prepared by mixing 20 μg of cationic liposome with 1 μg dsRNA and incubated at room temperature for 30 min.

Transmission electron microscopy

A total of 10 μL of cationic liposomes or dsRNA/cationic liposome solution was dropped onto formvar grids and samples were left to stand at room temperature for 1 min. Excess water was removed by touching the edge of the droplet to the edge of a filter paper, leaving a thin aqueous film on the grid. Subsequently 10 μL of a solution of 2% (w/v) potassium phosphotungstate (PTA) was applied to the grid and left it stand for 1 min with excess solution removed as stated earlier. The negatively stained cationic liposomes were allowed to dry overnight in a desiccator. The samples were subsequently observed under a transmission electron microscope operated at 200 kV.

Yellow head virus stock

YHV titre was determined using primary lymphoid organ cell culture of *Penaeus monodon* as described elsewhere (Assavalapsakul, Smith & Panyim 2003). The YHV stock used in this study had a titre of 2×10^9 $TCID_{50}$ mL^{-1}. The diluted YHV stock (10^4 $TCID_{50}$ mL^{-1}) was used to inject into shrimp a dose that caused shrimp to die 3–4 days post infection.

Shrimp culture

Healthy Pacific white shrimps (*Litopenaeus vannamei*) (3 g) were purchased from commercial farms in Thailand. The shrimps were cultured in 80 L tanks containing artificial seawater at 10 ppt salinity with aeration. The shrimps were acclimated for 2–3 days at 28 ± 1°C before use in the experiments.

dsRNA/cationic liposome complex injection, YHV challenge and RT-PCR analysis

Healthy Pacific white shrimps (8 or 10 shrimps per group) were co-injected with 50 μL mixture of 10^4 $TCID_{50}$ mL^{-1} of YHV and either cationic liposome, YHV-Pro-dsRNA or YHV-Pro-dsRNA/cationic liposome complex. The ratio of cationic liposomes: YHV-Pro-dsRNA (μg μg^{-1}) used was 20:1. Based on the amount of dsRNA, 2.5 μg of dsRNA per gramme shrimp was used for shrimp injection in all treatments. Injection was into the haemolymph through the arthrodial membrane of the fifth walking leg by means of a 1 mL syringe with a 29 gauge needle. Negative control shrimps were injected with either 150 mM NaCl or cationic liposomes in 150 mM NaCl. Following injection, shrimp mortality was recorded daily for 2 weeks. To evaluate YHV presence in shrimps, gill tissues were collected from individual shrimp for RNA extraction and RT-PCR analysis as previously described (Assavalapsakul, Chinnirunvong & Panyim 2009). Briefly, two to three pieces of gills from individual shrimp were collected and used to extract RNA using TRI Reagent (Molecular Research Center). One microgram of total RNA was used for cDNA synthesis using Impromp II reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA) with oligo dT_{18} primer as described by the manufacture. Multiplex PCR was performed to amplify YHV genomic RNA and actin mRNA to monitor YHV level and for RNA normalization and internal control respectively. Experiment was undertaken as three independent replicates.

Statistical analysis

All data obtained from the experiments were analysed using one-way ANOVA (GraphPad Prism program). A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results and discussion

Transmission electron microscopy

The morphology of cationic liposome and dsRNA/cationic liposomes was observed using transmission electron microscopy after negative staining. The diameter of cationic liposomes ranged from 0.1 to 0.4 μm as shown in Fig. 1a, whereas YHV-Pro-dsRNA/cationic liposome complexes were

found to be large spherical aggregates with a diameter ranging from 0.5 to 1 μm (Fig. 1b). The large aggregates of YHV-Pro-dsRNA/cationic liposome complex are probably due to the positively charged cationic liposomes efficiently interacting with negatively charged dsRNA molecules to form dsRNA/lipoplexes in a manner analogous to DNA/lipoplexes (Sternberg, Sorgi & Huang 1994; Lin, Slack, Ahmad, George, Samuel & Safinya 2003).

Protection of YHV infection in shrimp by dsRNA-cationic liposome complexes

To determine whether the YHV-Pro-dsRNA/cationic liposome complexes increased the efficiency of dsRNA mediated protection against YHV infection, healthy pacific white shrimps were co-injected with 10^4 $TCID_{50}$ mL^{-1} of YHV and either cationic liposomes, YHV-Pro-dsRNA or YHV-Pro-dsRNA/cationic liposome complexes. Mortality was recorded daily for 2 weeks and samples of gill tissue taken immediately from dead shrimps and from all shrimps at the end of 2 weeks. RNA was extracted from all gill samples and the presence of YHV determined by RT-PCR in parallel with amplification of actin as a control. Dead shrimps were excluded from further analysis if the RT-PCR for YHV was negative.

The result of RT-PCR analysis showed that all shrimps in the control group (Fig. 2a) were infected with YHV, whereas three of eight YHV-Pro-dsRNA injected shrimps (Fig. 2b) and two of eight YHV-Pro-dsRNA/cationic liposome complex injected shrimps (Fig. 2c) were infected with YHV. Moreover, on the fourth day of injection, the cumulative mortality of control group (YHV/cationic liposome) was 100% ($P < 0.0001$), whereas cumulative mortality of injected shrimp with YHV/YHV-Pro-dsRNA and YHV/YHV-Pro-dsRNA/cationic liposome was approximately 30% ($P < 0.0001$) and 10% ($P < 0.0001$) respectively (Fig. 3). By day 10 post infection, cumulative mortality in the YHV-Pro-dsRNA group had reached 50%, whereas the cumulative mortality in the YHV-Pro-dsRNA/cationic liposome injected group remained constant at approximately 10% (Fig. 3).

In this study a total of 2.5 μg of YHV-Pro-dsRNA per gramme shrimp was used which is consistent with several previous studies that have shown inhibition of YHV replication with this dosage (Yodmuang *et al.* 2006; Tirasophon *et al.* 2007; Assavalapsakul *et al.* 2009), whereas the titre of YHV used was some 10 times higher to maximize any possible difference between the two dsRNA treatment groups (with or without cationic liposomes). The RT-PCR analysis and cumulative mortality showed that shrimp injected with YHV-Pro-dsRNA/cationic liposome complex had both lower numbers of infected shrimp as well as an increased rate of survival as compared with naked YHV-Pro-dsRNA injected shrimp. These results suggest that the cationic liposomes increase delivery of YHV-Pro-dsRNA to target cells. Most cationic liposomes share the characteristic of condensing DNA into small particles which facilitate cellular uptake via endocytosis through charge-charge interaction with anionic sites on cell surface (Gao, Kim & Liu 2007). It seems likely

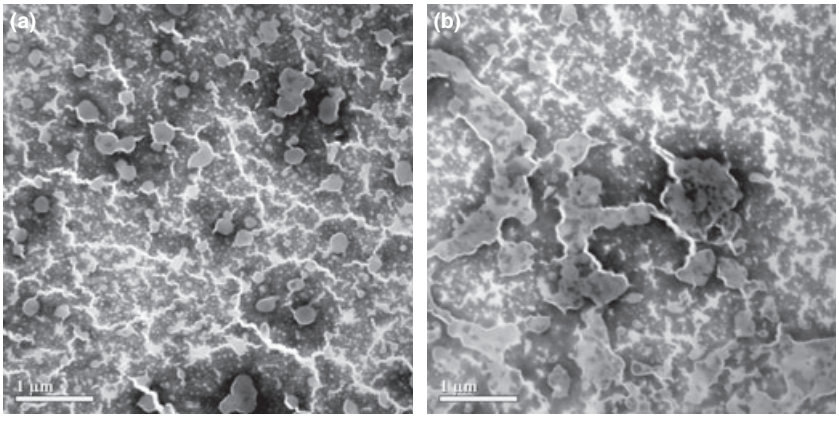


Figure 1 Transmission electron microscopy (TEM) of cationic liposome and YHV-Pro-dsRNA/cationic liposome. Either cationic liposomes (a) or YHV-Pro-dsRNA/cationic liposomes (b) was stained with PTA and observed under a TEM. The bar represents 1 μm.

 © 2012 Blackwell Publishing Ltd,

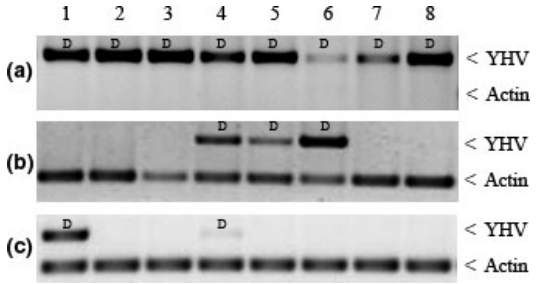


Figure 2 Inhibitory effect of yellow head virus (YHV) replication in Pacific white shrimp using YHV-Pro-dsRNA/cationic liposomes. Shrimps (3 g) were injected with (a) YHV with cationic liposomes, (b) YHV/YHV-Pro-dsRNA or (c) YHV/YHV-Pro-dsRNA/cationic liposomes. The YHV load of individual shrimp was determined by RT-PCR. D denotes a dead shrimp.

therefore that dsRNA might behave in a manner similar to DNA molecules. Alternatively, a dsRNA-degrading nuclease has been identified in *Bombyx mori* (Arimatsu, Kotanib, Sugimurab & Furusawa 2007) and this nuclease was found in tissues, haemolymph and the gut lumen, and it is possible therefore that other arthropods such as shrimp may similarly express dsRNA nucleases. In this case, the cationic liposomes may also protect the dsRNA cargo from nuclease digestion in the haemolymph.

In this study the dsRNA-cationic liposome complex was co-injected with YHV, and further studies will be required to determine the length of protection that the complexes can confer. However, the current method of dsRNA delivery, injection, has limited potential application to commercial shrimp farming. Other studies, however, have shown that a crude extract of bacterially expressed VP28dsRNA administered orally can provide therapeutic protection against White spot syndrome virus (WSSV) challenge (Sarathi, Simon, Venkatesan & Hameed 2008) and that a DNA construct containing the VP28 gene of WSSV when administered orally as a complex with chitosan nanoparticles was able to protect shrimp from subsequent challenge (Rajeshkumar, Venkatesan, Sarathi, Sarathbabu, Thomas, Anver Basha & Sahul Hameed 2009). Both of these studies show that oral administration is a viable therapeutic or protective route, and suggest that YHV-Pro-dsRNA/cationic liposome complex coated with shrimp food might be of possible future application to shrimp farming industries.

Acknowledgments

We thank Prof. Duncan R. Smith, Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University for his comments and proof reading this manuscript. This work was supported by Office of Higher Education Commission, Ministry of Education, and The Thailand Research Fund (TRF) MRG5180160 and RMU5480003. NA is a recipient of the Royal Golden Jubilee Ph.D. programme of TRF for a scholarship. Support from the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Office of Higher Education Commission, Ministry of Education is gratefully acknowledged. The funding agencies have no role in the study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report or in the decision to submit the study for publication.

Authorship

This is the original work of the authors and the manuscript was not previously submitted to BITE.

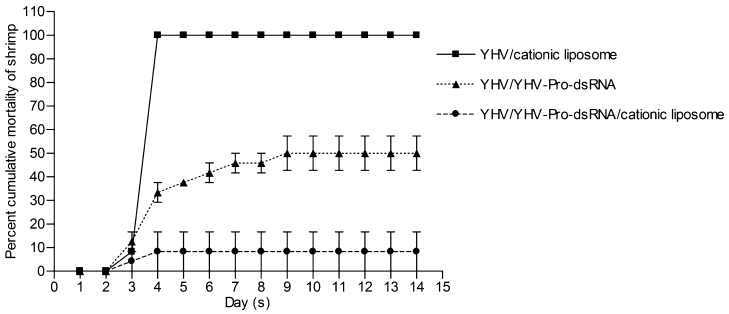


Figure 3 Percent cumulative mortality of Pacific white shrimp. Shrimps (3 g) were co-injected yellow head virus (YHV) with cationic liposomes (■), YHV-Pro-dsRNA (▲) or YHV-Pro-dsRNA/cationic liposomes (●). Shrimp mortality was recorded daily for 14 days. Per cent mortality in each experimental group is presented as the mean of triplicated experiments.

All authors are aware of, and accept responsibility for, the manuscript. Conceived and designed the experiments: NA, BY and WA. Performed the experiments: NA and WA. Analysed the data: NA, BY and WA. Contribute reagents, materials, analysis tools: NA, BY and WA. Wrote the manuscript: WA.

References

Arimatsu Y., Kotanib E., Sugimurab Y. & Furusawa T. (2007) Molecular characterization of a cDNA encoding extracellular dsRNase and its expression in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **37**, 176–183.

Assavalapsakul W., Smith D.R. & Panyim S. (2003) Propagation of infectious yellow head virus particles prior to cytopathic effect in primary lymphoid cell cultures of *Penaeus monodon*. *Disease of Aquatic Organisms* **55**, 253–258.

Assavalapsakul W., Chinnirunvong W. & Panyim S. (2009) Application of YHV-protease dsRNA for protection and therapeutic treatment against yellow head virus infection in *Litopenaeus vannamei*. *Disease of Aquatic Organisms* **84**, 167–171.

Attasart P., Kaewkhaw R., Chimwai C., Kongphom U. & Panyim S. (2011) Clearance of *Penaeus monodon* densovirus in naturally pre-infected shrimp by combined ns1 and vp dsRNAs. *Virus Research* **159**, 79–82.

Boonyaratpalin S., Supamattaya K., Kasornchandra J., Direkbusaracom S., Aekpanithanpong U. & Chantanachooklin C. (1993) Non-occluded Baculo-like virus, the causative agent of yellow head disease in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Gyohyo Kenkyu* **2**, 103–109.

Chen F., Wang H., He H., Song L., Wu J., Gao Y., Liu X., He C., Yang H., Chen L., Wang L., Li G., Li Y., Kaplan D.E. & Zhong J. (2011) Short hairpin RNA-mediated silencing of bovine rotavirus NSP4 gene prevents diarrhoea in suckling mice. *Journal of General Virology* **92**, 945–951.

Elouahabi A. & Ruysschaert J.M. (2005) Formation and intracellular trafficking of lipoplexes and polyplexes. *Molecular Therapy* **11**, 336–347.

Felgner P.L., Gadek T.R., Holm M., Roman R., Chan H. W., Wenz M., Northrop J.P., Ringold G.M. & Danielsen M. (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 7413–7417.

Flegel T.W. (1997) Special topic review: major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **13**, 433–442.

Gao X., Kim K.S. & Liu D. (2007) Nonviral gene delivery: what we know and what is Next. *The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal* **9**, E92–E104.

Gish R.G., Satishchandran C., Young M. & Pachuk C. (2011) RNA interference and its potential applications to chronic HBV treatment: results of a Phase I safety and tolerability study. *Antiviral Therapy* **16**, 547–554.

Hannon G.J. (2002) RNA interference. *Nature* **418**, 244–251.

Hunter W., Ellis J., Vanengelsdorp D., Hayes J., Westervelt D., Glick E., Williams M., Sela I., Maori E., Pettis J., Cox-Foster D. & Paldi N. (2010) Large-scale field application of RNAi technology reducing Israeli acute paralysis virus disease in honey bees (*Apis mellifera*, Hymenoptera: Apidae). *PLoS Pathogens* **6**, e1001160.

Iwanaga K., Ono S., Narioka K., Morimoto K., Kakemi M., Yamashita S., Nango M. & Oku N. (1997) Oral delivery of insulin by using surface coating liposomes: improvement of stability of insulin in GI tract. *International Journal of Pharmaceutics* **157**, 73–80.

Jahan S., Khaliq S., Samreen B., Ijaz B., Khan M., Ahmad W., Ashfaq U.A. & Hassan S. (2011) Effect of combined siRNA of HCV E2 gene and HCV receptors against HCV. *Virology Journal* **8**, 295.

Karmali P.P. & Chaudhuri A. (2007) Cationic liposomes as non-viral carriers of gene medicines: resolved issues, open questions, and future promises. *Medicinal Research Reviews* **27**, 696–722.

Limsuwan C., Chuchird N., Prompamorn P., Prasertsri S., Maneewongprateep S., Laisutisan K. & Wiriyapatthanasub P. (2008) Yellow-head disease in cultured *Litopenaeus vannamei* in low-salinity water. In: *Proceedings of the 46th Kasetsart University Annual Conference, January 29–February 1, 2008*. Bangkok. Kasetsart Univ., Bangkok, pp. 450–457.

Lin A.J., Slack N.L., Ahmad A., George C.X., Samuel C.E. & Safinya C.R. (2003) Three-dimensional imaging of lipid gene-carriers: membrane charge density Controls universal transfection behavior in lamellar cationic liposome-DNA complexes. *Biophysical Journal* **84**, 3307–3316.

Lonez C., Vandenbranden M. & Ruysschaert J.-M. (2008) Cationic liposomal lipids: from gene carriers to cell signaling. *Progress in Lipid Research* **47**, 340–347.

Ma J., Song Y., Wu B., Jiang M., Li K., Zhu C. & Wen F. (2011) Production of transgenic rice new germplasm with strong resistance against two isolations of *Rice stripe virus* by RNA interference. *Transgenic Research* **20**, 1367–1377.

Mavichak R., Takano T., Kondo H., Hirono I., Wada S., Hatai K., Hatai K., Inagawa H., Takahashi Y., Yoshimura T., Kiyono H., Yuki Y. & Aoki T. (2010) The effect of liposome-coated recombinant protein VP28 against white spot syndrome virus in kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicas*. *Journal of Fish Diseases* **33**, 69–74.

 © 2012 Blackwell Publishing Ltd,

Mohammed A.R., Westonb N., Coombes A.G.A., Fitzgerald M. & Perrie Y. (2004) Liposome formulation of poorly water soluble drugs: optimisation of drug loading and ESEM analysis of stability. *International Journal of Pharmaceutics* **285**, 23–34.

Rajeshkumar S., Venkatesan C., Sarathi M., Sarathbabu V., Thomas J., Anver Basha K. & Sahul Hameed A.S. (2009) Oral delivery of DNA construct using chitosan nanoparticles to protect the shrimp from white spot syndrome virus (WSSV). *Fish and Shellfish Immunology* **26**, 429–437.

Robalino J., Bartlett T., Shepard E., Prior S., Jaramillo G., Scura E., Chapman R.W., Gross P.S., Browdy C.L. & Warr G.W. (2005) Double-stranded RNA induces sequence-specific antiviral silencing in addition to non-specific immunity in a marine shrimp: convergence of RNA interference and innate immunity in the invertebrate antiviral response? *Journal of Virology* **79**, 13561–13571.

Sarathi M., Simon M.C., Venkatesan C. & Hameed A.S. (2008) Oral administration of bacterially expressed VP28dsRNA to protect *Penaeus monodon* from white spot syndrome virus. *Marine Biotechnology* **10**, 242–249.

Schwind N., Zwiebel M., Itaya A., Ding B., Wang M.B., Krczal G. & Wassenegger M. (2009) RNAi-mediated resistance to Potato spindle tuber viroid in transgenic tomato expressing a viroid hairpin RNA construct. *Molecular Plant Pathology* **10**, 459–469.

Senapin S., Thaowbut Y., Gangnonngiw W., Chuchird N., Sriurairatana S. & Flegel T.W. (2010) Impact of yellow head virus outbreaks in the whiteleg shrimp, *Penaeus vannamei* (Boone), in Thailand. *Journal of Fish Diseases* **33**, 421–430.

Shekhar M.S. & Lu Y. (2009) Application of nucleic-acid-based therapeutics for viral infections in shrimp aquaculture. *Marine Biotechnology* **11**, 1–9.

Sternberg B., Sorgi F.L. & Huang L. (1994) New structures in complex formation between DNA and cationic liposomes visualized by freeze-fracture electron microscopy. *FEBS Letters* **356**, 361–366.

Tang K.F.-J. & Lightner D.V. (1998) A yellow head virus probe: application to *in situ* hybridization and determination of its nucleotide sequence. *Disease of Aquatic Organisms* **35**, 165–173.

Tirasophon W., Yodmuang S., Chinnirunvong W., Plongthongkum N. & Panyim S. (2007) Therapeutic inhibition of yellow head virus multiplication in infected shrimps by YHV-protease dsRNA. *Antiviral Research* **74**, 150–155.

Wang W., Wang Y., Chen Z.G. & Shin D.M. (2009) Advances of cancer therapy by nanotechnology. *Cancer Research and Treatment* **41**, 1–11.

Yang F., Jin C., Jiang Y., Li J., Di Y., Ni Q. & Fu D. (2011) Liposome based delivery systems in pancreatic cancer treatment: from bench to bedside. *Cancer Treatment Reviews* **37**, 633–642.

Yodmuang S., Tirasophon W., Roshorm Y., Chinnirunvong W. & Panyim S. (2006) YHV- protease dsRNA inhibits YHV replication in *Penaeus monodon* and prevents mortality. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **341**, 351–356.

ISSN 1068-1620, Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 2013, Vol. 39, No. 4, pp. 444–450. © Pleiades Publishing, Ltd., 2013.

In vitro Delivery of Curcumin with Cholesterol-Based Cationic Liposomes[1]

N. Apiratikul[a, 2], T. Penglong[b, 2], K. Suksen[c], S. Svasti[b], A. Chairoungdua[c, d], and B. Yingyongnarongkul[a, 3]

[a] *Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Bangkapi, Bangkok, 10240 Thailand*

[b] *Thalassemia Research Center, Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Salaya Campus, Nakhonpathom, 73170 Thailand*

[c] *Department of Physiology and* [d] *Research Center of Transport Proteins for Medical Innovation, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, 10400 Thailand*

Received September 12, 2012; in final form November 9, 2012

Abstract—A new cholesterol-based cationic lipid was synthesized; liposomes prepared on its basis were evaluated as drug delivery vehicles for curcumin. Free and liposome-encapsulated curcumin cytotoxicity against HeLa, A549, HepG2, K562 and 1301 cell lines was assessed. Liposomal curcumin with ED_{50} values ranging from 2.5–10 μM exhibited 2–8 times higher cytotoxicity than free curcumin. The synthetic cholesterol-based cationic lipid also enhanced cellular uptake of curcumin into tested cells. Cationic liposome alone showed low cytotoxicity at high doses with ED_{50} values of 90–210 μM.

Keywords: cationic lipids, cholesterol-based, liposome, curcumin, drug delivery, cytotoxicity

DOI: 10.1134/S1068162013030035

INTRODUCTION

In recent years, drug delivery systems enhancing efficacy of bioactive compounds attract wide attention. These delivery systems include polymeric micelles and vesicles [1–3], dendrimers [4, 5], liposomes [6, 7], micelles [7], and nanogels [8, 9]. Among these, liposomes are considered as promising carriers for an extensive range of applications in drug as well as gene delivery [10–12]. Cationic liposomes have been studied as drug carriers also because of their selective accumulation in tumor endothelial cells [13]. Enhancement of cellular uptake of drug-loaded cationic liposomes as well as their in vitro cytotoxicity have been demonstrated and those results were attributed to the ability of cationic liposomes to interact with cells via electrostatic interaction, which could induce endocytosis of the liposomes and also facilitate drug release to the cytosol by endosomal escape [14]. These properties of cationic liposomes have been applied to the delivery of nucleic acid as well as cytotoxic compounds.

Curcumin (Fig. 1), a major component of turmeric, is used for centuries in Asian countries including Thailand as a spice. Curcuminoids exhibited many interesting biological activities including anti-inflammatory [15], antioxidant [16–18], anticancer [15, 16, 19, 20] and anti-HIV activity [21, 22]. The pharmacological safety and efficacy of curcumin makes it a potential compound for treatment and prevention of a wide variety of human diseases. However, curcumin has not yet been approved as a therapeutic agent because of problems arising from its poor bioavailability. Phospholipid-based liposomes have been demonstrated to enhance bioavailability and biological activity of curcumin [23–25]. Some of the liposome formulations incorporated cholesterol as a helper lipid for curcumin delivery [23, 25]. The synthetic cholesterol-based cationic lipids have been reported as gene delivery into mammalian cells [26–31]. Cholesterol was often used here as a lipid anchor due to its lipid bilayer stabilizing activity [32] and minimal toxicity to the treated cells. However, the use of cationic lipid with cholesterol tail to encapsulate and deliver curcumin into cells has not been reported. In this work, we report the synthesis of new cholesterol-based cationic lipid (**I**) (Fig. 1) and evaluation of cellular uptake and cytotoxicity of curcumin encapsulated into liposomes prepared on the basis of lipid (**I**).

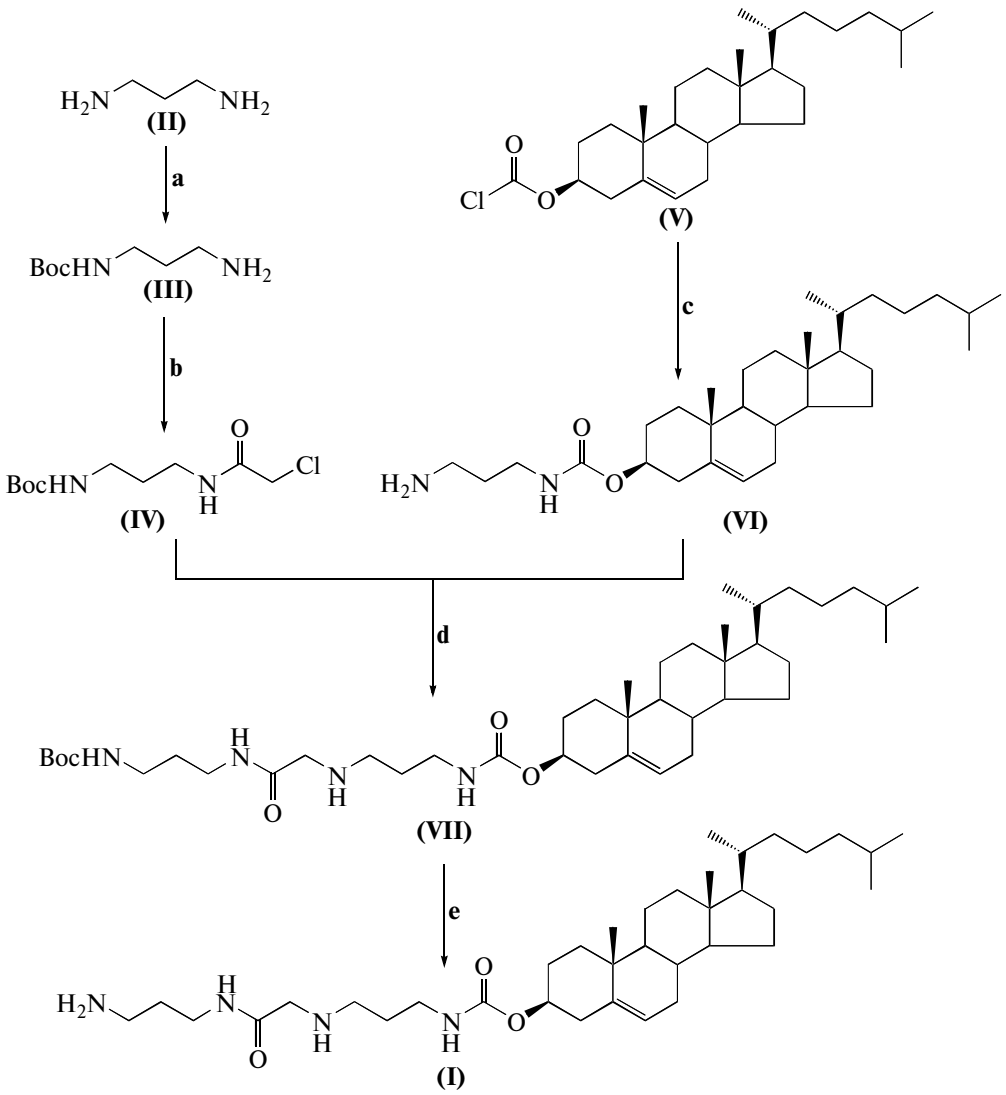
RESULTS AND DISCUSSION

The designed cholesterol-based lipid (**I**) was synthesized by solution-phase chemistry (Scheme). *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-1,3-diaminopropane (**III**)

[1] The article is published in the original.

[2] These authors contributed equally to this work.

[3] Corresponding author: phone: +66 2 3190931; fax: +66 2 3191900; e-mail: boonek@ru.ac.th.



Scheme. Synthesis of cationic lipid (**I**). *Reagents and conditions*: (a) Boc_2O, CH_2Cl_2, rt., 89%; (b) chloroacetyl chloride, pyridine, 0°C, 81%; (c) 1,3-diaminopropane,CH_2Cl_2, rt., 97%; (d) Et_3N, EtOH, reflux, 72%; (e) TFA, CH_2Cl_2, 93%.

was prepared by high dilution method [33] and then transformed into amide (**IV**) by condensation with chloroacetyl chloride in the presence of pyridine base at 0°C (72% yield over two steps). 3β-Cholest-5-en-3-yl-*N*-(3-aminopropyl)carbamate (**VI**) was also prepared in excellent yield by high dilution method in the same manner as the compound (**III**). Care must be taken for the alkylation step of amine (**VI**) with alkyl chloride (**IV**), since the dialkylation product might have taken place to give undesired product. The monoalkylation product (**VII**) was obtained in a good yield by refluxing compounds (**VI**) and (**IV**) in EtOH in the presence of Et_3N. Finally, the Boc protecting group of derivative (**VII**) was removed by treating with TFA in CH_2Cl_2 to afford lipid (**I**) in 93% yield. The structures of the synthesized compounds were established on the basis of IR, ^1H, ^{13}C NMR, and high resolution mass spectral analysis.

An important parameter to be evaluated for a liposomal delivery system is the loading efficiency. The thin-film evaporation method was used to obtain the curcumin liposomal preparation [34]. The liposome formulation composed of cationic lipid (**I**) and dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) at 1 : 1 (wt/wt) containing curcumin and lipid in the weight ratio of 1 : 20; this formulation was found to have moderate curcumin encapsulation efficiency (68%). We suppose that the hydrophobic nature of curcumin allows it to become incorporated into the lipid bilayer region of the liposome and improves the encapsulation efficiency. Similar observations for the hydrophobic drug have been previously reported [34, 35].

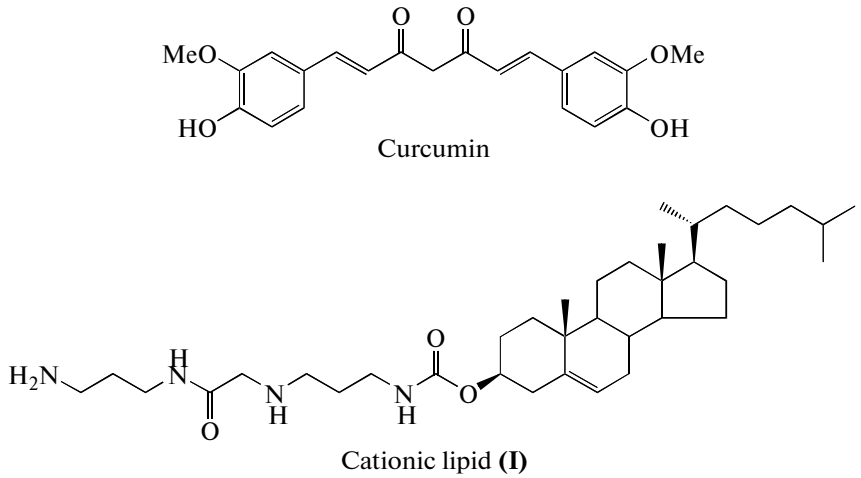


Fig. 1. Structures of curcumin and cholesterol-based cationic lipid (**I**).

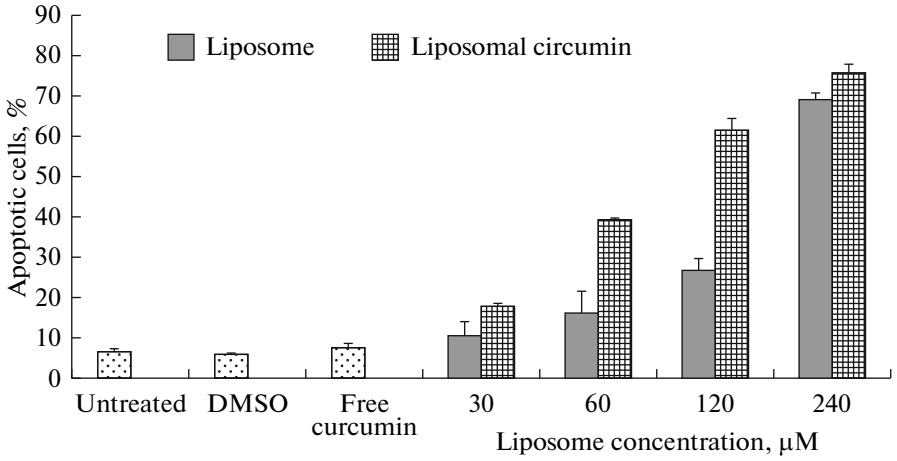


Fig. 2. Effect of empty liposomes and liposomal curcumin on apoptotic cells. The concentration of curcumin was 10.8 μM in each liposomal curcumin formulation. The DMSO concentration was 0.5%.

The cytotoxic activity of free and liposomal encapsulated curcumin in five different human cancer cell lines, cervical epithelial adenocarcinoma (HeLa), lung epithelial adenocarcinoma (A549), liver hepatocellular carcinoma (HepG2), erythromyeloblastoid leukemia (K562), and T cell lymphoblastic leukaemia (1301), was determined. To find the optimal curcumin/liposome ratio, cytotoxic activities of liposomal curcumin and free liposomes were evaluated against HeLa cells. Preparations of curcumin/lipid at 1 : 5, 1 : 10, 1 : 20, 1 : 40 and 1 : 80 wt/wt ratios were prepared, the concentration of curcumin in each formulation being constant at 10.8 μM. Empty liposomes at the same concentration were also tested for comparison. The results are shown in Fig. 2. At high weight ratio (1 : 80), cytotoxic activity of liposomal curcumin and liposomes was the same. This shows that the high concentration of liposomes was toxic to the tested cells. At curcumin/lipid ratio of 1 : 20, the concentration of liposome lipid was equivalent to 120 μM; treatment of tested cells with empty liposomes of the same concentration gave 25% of apoptotic cells, whereas the apoptotic cells of liposomal curcumin was at 60%. Thus, the curcumin/liposome weight ratio of 1 : 20 was used for the next experiments.

It has been reported that liposomes are toxic to various cells [36, 37]. First, we investigated whether our synthetic liposome formulation without curcumin was toxic to the tested cells. Five cell lines were treated with liposomes of a range of concentrations; the results are shown in table. ED_{50} values of empty liposomes against HeLa, A549, HepG2, K562 and 1301 cells were 180, 210, 105, 165 and 90 μM, respectively. It was suggested that our cationic liposomes were weakly toxic to tested cells. The synthetic liposomes were also tested against normal cells, human embryonic kidney (HEK293). In contrast with the previously reported data on the cytotoxicity of cationic lipid to the normal cells, we have found that our liposomes were not toxic to the normal cells with the IC_{50}

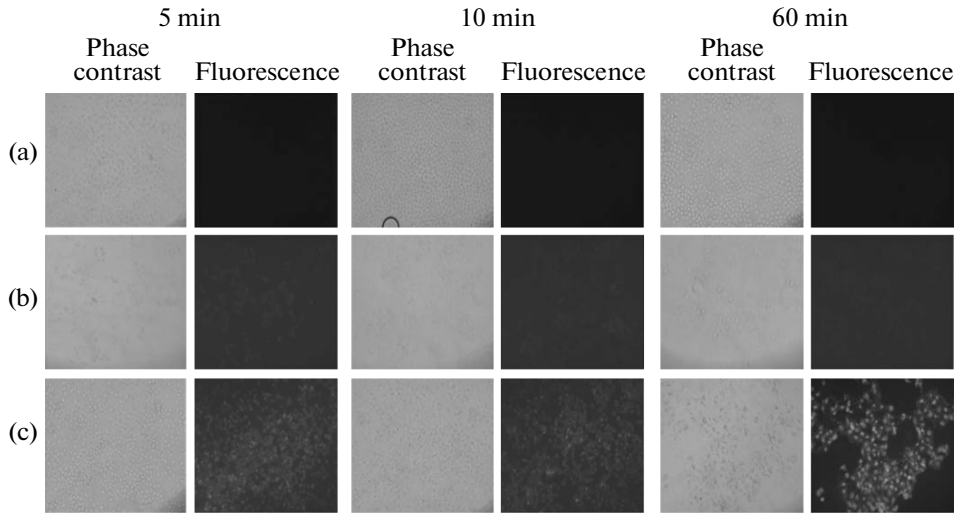


Fig. 3. Fluorescence microscopy images of HeLa cells incubated for 5, 10 and 60 min at 37°C. Row (a): PBS; row (b): 40 μM curcumin, and row (c): 40 μM liposome-encapsulated curcumin.

value of 600 μM (data not shown). This data suggest that our liposomes were suitable as delivery system with the minimal adverse effects on normal cells. Most of the commercial liposomes have been reported to enhance cytotoxicity of encapsulated compounds on various cells [23–25, 38]. We then investigated whether our synthetic liposomes enhance cytotoxic activity of curcumin. Cytotoxicity of liposomal and free curcumin was evaluated by staining with Annexin V-FITC and analyzed by flow cytometry. The results indicated that cytotoxic activity of liposomal and free curcumin was dependent on cell types (table). Curcumin has been reported to be non-toxic to normal cells [39]. The pharmacological safety of curcumin was also shown by the non-toxic consumption of up to 8 g/day for 3 months in humans [40] and up to 5 g/kg in rats [41]. In our experiment, free curcumin showed lower cytotoxicity compared to the liposomal curcumin. The low cytotoxicity of free curcumin might be due to low intracellular uptake and its rapid degradation. Different types of cancer cells respond to cytotoxic drug differently. Encapsulation of curcumin in our synthetic liposomes increased its cytotoxicity 5–8 times against A549, HepG2 and K562 cells, and 2–3 times against HeLa and 1301 cells.

The cellular uptake of liposomal and free curcumin into HeLa cells was observed under fluorescence microscope and the results are shown in Fig. 3. Cationic liposome demonstrated enhanced cellular uptake of curcumin into tested cells. This might be due to cationic charge of cationic liposomes, which can induce electrostatic interaction with negatively-charged cell membrane and facilitate cellular uptake. The cellular uptake of liposomal curcumin occurred as early as 5 min after exposure to cells. The fluorescence intensity increased upon increasing exposure time. It was clearly seen that at 60 min all the cells were fluorescent with high intensity. We suppose that cationic liposomes may protect curcumin from degradation in cells and gradually release it. Curcumin itself was also uptaken into cells as early as after 5 min incubation but with low fluorescence intensity, then the fluorescence disappeared after 20 min (data not shown). This result might indicate that most of the uptaken curcumin was metabolized in the cell and prove the suggestion that our synthetic liposomes are efficient in delivering curcumin to the tested cells by enhancing cellular uptake.

In summary, our synthetic cholesterol-based cationic lipid could be used as a basic component of delivery system capable to enhance stability, cellular uptake and cytotoxicity of curcumin. The cytoxicity of liposome-encapsulated curcumin has 2–8 times higher activity than that of free curcumin. Based on the structure of synthetic cationic lipid, the polar part would allow the targeting vehicle to attach to the destination cells and enhance the selectivity in delivering encapsulated cytotoxic compound. Due to its cellular entry ability, this cationic lipid might also be used as a transfection agent.

EXPERIMENTAL

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich-Fluka. Pyridine was dried over KOH. Solvents

ED_{50} of curcumin, liposomal curcumin and empty liposomes

Tested preparation	ED_{50} (μM)				
	HeLa	A549	HepG2	K562	1310
Free curcumin	17	50	30	20	8
Liposomal curcumin	8	10	4	2.5	3.1
Empty liposomes	180	210	105	165	90

were purchased from commercial suppliers and used without further purification. Column chromatography and TLC were carried out using Merck silica gel 60 (<0.063 mm) and precoated silica gel 60 F_{254} plates, respectively. Spots on TLC were detected by spraying with anisaldehyde–H_2SO_4 and ninhydrin reagents followed by heating. IR spectra were recorded in KBr on a Perkin-Elmer FT-IR Spectrum BX spectrophotometer. NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE400 spectrometer. Electrospray (ES) mass spectra were obtained using a Finnigan LC-Q mass spectrometer. High resolution mass spectra were obtained using a Bruker micrOTOF mass spectrometer.

***N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-1,3-diaminopropane (III).** Di-*tert*-butyl dicarbonate (5.9 g, 0.0269 mol) in CH_2Cl_2 (50 mL) was added dropwise to 1,3-diaminopropane (**II**) (10 g, 0.134 mol) in CH_2Cl_2 (200 mL) and the mixture was stirred overnight. Then solvent was evaporated, the residue was suspended in water (100 mL) and filtered. Filtrate was extracted by CH_2Cl_2 (3 × 50 mL). The combined organic phase was dried (Na_2SO_4) and concentrated in vacuo. The crude product was purified by column chromatography using a CH_2Cl_2–MeOH system to yield the title compound (4.2 g, 89%). The spectroscopic data were in agreement with those found in the literature [42].

***N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*N'*-(chloroacetyl)-1,3-diaminopropane (IV).** Amine (**III**) (1.88 g, 0.0108 mol) was dissolved in dry pyridine and stirred at 0°C for 10 min. Chloroacetyl chloride (1.46 g, 0.0129 mol) was then added. The reaction mixture was allowed to warm up to ambient temperature, and stirring continued for 12 h. The reaction mixture was poured into crushed ice and thoroughly extracted with EtOAc (3 × 50 mL). Column chromatography using CH_2Cl_2–MeOH gradient of the residue from extract yielded the desired product (2.21 g, 81%). White solid, mp 43–45°C; IR (KBr): ν_{max} 3359, 3197, 2956, 2923, 2852, 1660, 1640, 1553, 1468, 1411, 1173, 1137, 702 cm^{-1}; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1.30 (9 H, s, CH_3-Boc), 1.53 (2 H, quint, *J* 6.0 Hz, H-2), 3.01 (2 H, br. d, *J* 5.4 Hz, H-1), 3.20 (2 H, q, *J* 5.5 Hz, H-3), 3.90 (2 H, s, H-4), 5.27 (1 H, br. s, NHCOO), 7.40 (1 H, br. s, NHCO); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) 28.1 (CH_3-Boc), 29.4 (C-2), 36.4 (C-1), 37.0 (C-3), 42.2 (C-5), 79.1 (C-Boc), 156.5 (NHCOO), 166.7 (NHCO); MS (ES^+): *m/z* 273.7 ([M + Na]$^+$, 100%); HR-TOFMS (ESI^+): *m/z* 273.0982 [M + Na]$^+$; calcd. for $C_{10}H_{19}N_2O_3$ + Na, 273.0976.

3β-Cholest-5-en-3-yl-*N*-(3-aminopropyl)carbamate (VI). Cholesteryl chloroformate (**V**) (6.1 g, 0.013 mol) in CH_2Cl_2 (50 mL) was added dropwise to 1,3-diaminopropane (11 g, 0.14 mol) in CH_2Cl_2 (200 mL) and the mixture was stirred overnight. Water (200 mL) was added to the reaction mixture and extracted with CH_2Cl_2 (3 × 50 mL). Column chromatography of the product using CH_2Cl_2–MeOH mixtures gave the title compound as neat oil (6.1 g, 97%). IR (KBr): ν_{max} 3422, 2926, 2852, 1685, 1466, 1382, 1122, 1045 cm^{-1}; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 0.62 (3 H, s, Me-Chol), 0.81 (6 H, d, *J* 6.5 Hz, Me-Chol), 0.86 (6 H, d, *J* 6.5 Hz, Me-Chol), 0.88–1.50 (21 H, m, CH-Chol), 1.57 (2 H, quint, *J* 6.4 Hz, H-2'), 1.6–2.3 (7 H, m, CH-Chol), 2.72 (2 H, t, *J* 6.5 Hz, H-3'), 3.20 (2 H, br. d, *J* 5.0 Hz, H-1'), 4.42 (1 H, br. s, CH-Chol), 5.19 (1 H, br. s, NHCO), 5.34 (1 H, br. s, CH-Chol); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) 11.7, 18.6, 19.2, 20.9, 22.4, 22.7, 23.7, 24.1, 27.9, 28.10, 28.14, 31.7, 31.8, 33.0, 35.7, 36.0, 36.4, 36.9, 38.5, 38.7, 39.4, 39.6, 42.2, 49.9, 56.0, 56.5, 74.0, 122.3, 139.7, 156.2; MS (ES^+): *m/z* 487.4 ([*M* + H]$^+$, 100%); HR–TOFMS (ESI^+): *m/z* 487.4278 [*M* + H]$^+$; calcd. for $C_{31}H_{54}N_2O_2$ + H, 487.4258.

Compound (VII). A solution of chloroamide (**IV**) (0.367 g, 146 mmol), compound (**VI**) (0.715 g, 146 mmol) and Et_3N (0.61 mL, 0.044 mol) in EtOH (10 mL) was stirred and refluxed for 6 h. After completion of reaction (control by TLC using 10% MeOH/CH_2Cl_2 as eluent), the reaction mixture was extracted with EtOAc (3 × 100 mL); after common treatment, the product was purified by column chromatography using a CH_2Cl_2–MeOH as eluting solvent to give compound (**VII**) as neat oil (0.735 g, 72%). IR (KBr): ν_{max} 3364, 2928, 2852, 1720, 1689, 1660, 1545, 1527, 1461, 1366, 1272, 1253, 1174 cm^{-1}; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 0.63 (3 H, s, Me-Chol), 0.82 (6 H, d, *J* 6.5 Hz, Me-Chol), 0.87 (6 H, d, *J* 6.5 Hz, Me-Chol), 0.96 (3 H, s, CH-Chol), 1.00–1.31 (10 H, m, CH-Chol), 1.39 (9 H, s, CH_3-Boc), 1.44–1.52 (9 H, m, CH-Chol), 1.61 (2 H, t, *J* 6.0 Hz, H-2), 1.70 (2 H, quint, *J* 6.4 Hz, H-2'), 1.79–2.29 (7 H, m, CH-Chol), 2.65 (2 H, t, *J* 6.4 Hz, H-3'), 3.11 (2 H, br. d, *J* 6.0 Hz, H-1'), 3.25–3.30 (6 H, m, H-1, H-3, H-4), 4.43 (1 H, br. s, CH-Chol), 5.06 (1 H, br. s, NH), 5.13 (1 H, br. s, NH), 5.34 (1 H, br. s, CH-Chol), 7.65 (1 H, br. s, NH); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) 11.8, 18.6, 19.2, 20.9, 21.4, 22.5, 22.7, 23.7, 24.2, 27.9, 28.12, 28.18, 28.3, 29.4, 29.9, 31.8, 35.7, 36.1, 36.5, 36.9, 37.1, 38.1, 38.5, 39.4, 39.6, 42.2, 46.7, 49.9, 51.8, 56.0, 56.6, 74.3, 79.2, 122.5, 139.7, 156.4, 170.9, 175.7; MS (ES^+): *m/z* 701.5 ([M + H]$^+$, 100%); HR-TOFMS (ESI^+): *m/z* 701.5577 [M + H]$^+$; calcd. for $C_{41}H_{72}N_4O_5$ + H, 701.5575.

Cationic lipid (I). To a solution of compound (**VII**) (0.20 g, 0.285 mmol) in CH_2Cl_2 (5 mL) trifluoroacetic acid (1.0 mL) was added and the solution was stirred for 10 min. The solvent was removed under stream of nitrogen to give designed product as neat oil (0.16 g, 93%). IR (KBr): vmax 3395, 2929, 2852, 1715, 1679, 1554, 1519, 1462, 1202, 1135 cm^{-1}; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 0.65 (3 H, s, Me-Chol), 0.84 (6 H, d, *J* 6.0 Hz, Me-Chol), 0.87 (6 H, d, *J* 5.4 Hz, Me-Chol), 0.97 (3 H, s, CH-Chol), 1.02–1.52 (20 H, m, CH-Chol), 1.83–1.97 (10 H, m, H-2, H2', CH-Chol), 2.25 (2 H, br. s, CH-Chol), 2.94 (2 H, br. s, H-3'), 3.08 (2 H, br. s, H-3), 3.20 (2 H, br. s, H-1), 3.30

(2 H, br. s, H-1'), 3.79 (2 H, br. s, H-5), 4.36 (1 H, br. s, CH-Chol), 5.31 (1 H, br. s, CH-Chol); ^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) 11.8, 18.7, 19.1, 21.0, 22.5, 22.7, 23.9, 24.2, 26.4, 27.8, 28.0, 28.2, 31.8, 35.8, 36.2, 36.5, 36.8, 37.4, 38.2, 39.5, 39.7, 42.3, 49.9, 56.2, 56.6, 114.0, 116.9, 122.8, 139.4, 158.0, 166.3; MS (ES^+): *m/z* 601.5 ($[M + H]^+$, 100%); HR-TOFMS (ESI^+): *m/z* 601.5089 $[M + H]^+$; calcd. for $C_{36}H_{64}N_4O_3$+H, 601.5051.

Preparation of liposome-encapsulated curcumin. Bilayer lipids for liposomes were cationic lipid (**I**) and dioleoyl-L-α-phosphatidylethanolamine (DOPE) taken equivalent weight ratio; different total lipid/curcumin ratios were used. An appropriate quantity of curcumin dissolved in EtOH (1 μg/μL) and lipid in $CHCl_3$ (1 μg/μL) were mixed in Eppendrof tube, organic solvents were evaporated under a stream of nitrogen and residue was dried under high vacuum for 2 h. The resulting thin film was hydrated with phosphate-buffer saline (PBS, pH 7.4, 20 μL) at room temperature. The mixture was vortexed for 30 s and sonicated for 20 min; concentration of curcumin in each case was the same. The resulting liposomal curcumin was used immediately. Free curcumin was prepared by dissolving in DMSO, and the final concentration of DMSO was 0.5% (v/v).

Curcumin encapsulation efficiency. The amount of curcumin incorporated in liposome was determined using HPLC using Waters Model 515 liquid chromatograph. Cationic lipid (**I**) and DOPE were mixed in the ratio of 1 : 1 (w/w) in $CHCl_3$. The known amount of curcumin in EtOH was added to the lipid solution in the weight ratio of 1 : 20 (drug/lipid). The organic solvents were evaporated under a stream of nitrogen and further dried under high vacuum for 2 h. The resulting thin film was hydrated with PBS at room temperature. The mixture was vortexed for 30 s and sonicated for 20 min. The supernatant containing liposomal-curcumin complex was separated from insoluble un-encapsulated curcumin by centrifugation at 3000 rpm for 5 min on Eppendrof miniSpin. The curcumin pellet obtained was washed twice with water, dissolved in CH_2Cl_2 and assayed by HPLC (Waters Model 515 device, Model 2487 UV detector, 250 × 4.60 mm column, Luna 5μ silica Phenomenex, CH_2Cl_2/ MeOH, 90/10, v/v).

Cell cultures. HeLa cells were cultured in growth medium, consisting of S-MEM, 5% horse serum, 5% fetal bovine serum, 1% L-glutamine and 1% gentamicin-kanamycin. A549 and HepG2 cells were cultured in D-MEM with 10% fetal bovine serum, 1% L-glutamine and 1% penicillin-streptomycin. K562 and 1301 cells were cultured in RPMI1640 media with 10% fetal bovine serum, 1% L-glutamine and 1% penicillin-streptomycin. HEK293 cells were cultured in MEM supplemented with 10% fetal bovine serum. Cells were incubated at 37°C, 5% CO_2. 1×10^5 attached cells (HeLa, A549 and HepG2) and 5×10^5 suspension cells (K562 and 1301) were plated in 500 μL of growth medium in 24-well plate so these cells would be 80–90% confluent at the time of testing.

Cell uptake studies. HeLa cells were seeded in 24-well plates at a seeding density of 1×10^5 cells per well in 500 μL of growth medium and were allowed to attach for 24 h. For the studies of concentration-dependent uptake, cells were treated with 40 μM of liposomal curcumin or curcumin and were incubated for 5, 10, 20 and 60 min. Each time point, the medium was removed and the cells were washed three times with PBS and visualized using an Nikon ECLIPSE TE 300 microscope (λ_{ex} = 460–490 and λ_{em} = 510–520 nm).

Cytotoxicity assays. In 24-well plates, 100000 cells were plated per well and allowed to grow overnight. Curcumin at final concentrations of 5, 10, 20, 40 and 80 μM and liposomal curcumin at final curcumin concentration of 1.25, 2.5, 5, 10, 20, and 40 μM was added in wells (in triplicate) and incubated at 37°C in CO_2 incubator for 6 h. The medium was removed and the cells were washed thrice with PBS buffer before being changed to complete medium. The cells were incubated at 37°C in CO_2 incubator for 48 h prior to testing for apoptosis by staining with propidium iodide and Annexin V-FITC and then detected by flow cytometer [43]. Data (table) show the mean of at least three independent experiments ± SD.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Office of Higher Education Commission, Ministry of Education, and The Thailand Research Fund (TRF). Partial support from the Strategic Basic Research Grant from TRF, Office of Higher Education Commission and Mahidol University under the National Research University Initiative and Technology Development Agency are gratefully acknowledged. Support from the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Office of Higher Education Commission, Ministry of Education is gratefully acknowledged. NA would like to thank the Royal Golden Jubilee Ph.D. program of TRF for a scholarship.

REFERENCES

1. Torchilin, V.P., *Pharm. Res.*, 2007, vol. 24, pp. 1–16.
2. Savic, R., Luo, L., Eisenberg, A., and Maysinger, D., *Science*, 2003, vol. 300, pp. 615–618.
3. Peer, D., Karp, J.M., Hong, S., Farokhzad, O.C., Margalit, R., and Langer, R., *Nat. Nanotechnol.*, 2007, vol. 2, pp. 751–760.
4. Gillies, E.R., and Frechet, J.M.J., *Drug Discov. Today*, 2005, vol. 10, pp. 35–43.
5. Svenson, S., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2009, vol. 71, pp. 445–462.
6. Gregoriadis, G., *J. Drug Targeting*, 2008, vol. 16, pp. 520–524.
7. Cukierman, E., and Khan, D.R., *Biochem. Pharmacol.*, 2010, vol. 80, pp. 762–770.

8. Vinogradov, S.V., Zeman, A.D., Batrakova, E.V., and Kabanov, A.V., J. *Control. Release*, 2005, vol. 107, pp. 143–157.
9. Oh, J.K., Siegwart, D.J., Lee, H.I., Sherwood, G., Peteanu, L., Hollinger, J.O., Kataoka, K., and Matyjaszewski, K., *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, vol. 129, pp. 5939–5945.
10. Torchilin, V.P., *Nat. Rev.*, 2005, vol. 4, pp. 145–160.
11. Torchilin, V.P., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2006, vol. 58, pp. 1532–1555.
12. Chonn, A. and Cullis, P.R., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1998, vol. 30, pp. 73–83.
13. Wu, J., Lee, A., Lu, Y., and Lee, R.J., *Int. J. Pharm.*, 2007, vol. 337, pp. 329–335.
14. Dass, C.R., *Int. J. Pharm.*, 2003, vol. 267, pp. 1–12.
15. Chan, M.M.-Y., Huang, H.-I., Fenton, M.R., and Fong, D., *Biochem. Pharmacol.*, 1998, vol. 55, pp. 1955–1962.
16. Ruby, A.J., Kuttan, G., Dinesh Babu, K., Rajasekharan, K.N., and Kuttan, R., *Cancer Lett.*, 1995, vol. 94, pp. 79–83.
17. Sugiyama, Y., Kawakishi, S., and Osawa, T., *Biochem. Pharmacol.*, 1996, vol. 52, pp. 519–525.
18. Grinberg, L.N., Shalev, O., Tonnesen, H.H., and Rachmilewitz, E.A., *Int. J. Pharm.*, 1996, vol. 132, pp. 251–257.
19. Kuttan, R., Bhanumathy, P., Nirmala, K., and George, M.C., *Cancer Lett.*, 1985, vol. 29, pp. 197–202.
20. Inano, H., Onoda, M., Inafuku, N., Kubota, M., Kamada, Y., Osawa, T., Kobayashi, H., and Wakabayashi, K., *Carcinogenesis*, 2000, vol. 21, pp. 1835–1841.
21. Jordan, W.C. and Drew, C.R., *J. Natl. Med. Assoc.*, 1996, vol. 88, p. 333.
22. Mazumder, A., Raghavan, K., Weinstein, J., Kohn, K.W., and Pommier, Y., *Biochem. Pharmacol.*, 1995, vol. 49, pp. 1165–1170.
23. Li, L., Braiteh, F.S., and Kurzrock R., *Cancer*, 2005, vol. 104, pp. 1322–1331.
24. Thangapazham, R.L., Puri, A., Tele, S., Blumenthal, R., and Maheshwari, R.K., *Int. J. Oncol.,* 2008, vol. 32, pp. 1119–1123.
25. Chen, C., Johnston, T.D., Jeon, H., Gedaly, R., McHugh, P.P., Burke, T.G., and Ranjan, D., *Int. J. Pharmaceu.*, 2009, vol. 366, pp. 133–139.
26. Kearns, M.D., Donkor, A.-M., and Savva, M., *Mol. Pharm.*, 2008, vol. 5, pp.128–139.
27. Bajaj, A., Kondaiah, P., and Bhattacharya, S., *Bioconjugate Chem.*, 2007, vol. 18, pp. 1537–1546.
28. Moradpour, D., Schauer, J.I., Zurawski, V.R., Wands, J.R., and Boutin, R.H., *Biochem. Biophy. Res. Commun.,* 1996, vol. 221, pp. 82–88.
29. Vigneron, J.-P., Oudrhiri, N., Fauquet, M., Vergely, L., Bradley, J.-C., Basseville, M., Lehn, P., and Lehn, J.-M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1996, vol. 93, pp. 9682–9686.
30. Lee, E.R., Marshall, J., Siegel, C.S., Jiang, C., Yew, N.S., Nichols, M.R., Nietupski, J.B., Ziegler, R.J., Lane, M.B., Wang, K.X., Wan, N.C., Scheule, R.K., Harris, D.J., Smith, A.E., and Chen, S.H., *Hum. Gene Ther.,* 1996, vol. 7, pp. 1701–1717.
31. Radchatawedchakoon, W., Watanapokasin, R., Krajarng, A., and Yingyongnarongkul, B., *Bioorg. Med. Chem.,* 2010, vol. 18, pp. 330–342.
32. Yeagle P.L., *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, vol. 822, pp. 267–287.
33. Unciti-Broceta, A., Diezmann, F., Ou-Yang, C.Y., Fara, M.A., and Bradley, M., *Bioorg. Med. Chem.*, 2009, vol. 17, pp. 959–966.
34. Thangapazham, R.L., Puri, A., Tele, S., Blumenthal, R., and Maheswari, R.K., *Int. J. Oncol.*, 2008, vol. 32, pp. 1119–1123.
35. Rane, S. and Prabhakar, B., *Int. J. Pharm. Tech. Res.*, 2009, vol. 1, pp. 914–917.
36. Berrocal, M.C., Bujan, J., Garcia-Honduvilla, N., and Abeger, A., *Drug Deliv.*, 2000, vol. 7, pp. 37–44.
37. Smistad, G., Jacobsen, J., and Sande, S.A., *Int. J. Pharm.*, 2007, vol. 330, pp. 14–22.
38. Jung, S.H., Jung, S.H., Seong, H., Cho, S.H., Jeong, K.-S., and Shin, B.C., *Int. J. Pharm.*, 2009, vol. 382, pp. 254–261.
39. Anitha, A., Maya, S., Deepa, N., Chennazhi, K.P., Nair, S.V., Tamura, H., and Jayakumar, R., *Carbohydrate Pol.*, 2011, vol. 83, pp. 452–461.
40. Cheng, A.L., Hsu, C.H., Lin, J.K., Hsu, M.M., Ho, Y.F., Shen, T.S., Ko, J.Y., Lin, J.T., Lin, B.R., Ming-Shiang, W., Yu, H.S., Jee, S.H., Chen, G.S., Chen, C.A., Lai, M.K., Pu, Y.S., Pan, M.H., Wang, Y.J., Tsai, C.C., and Hsieh, C.Y., *Anticancer Res.*, 2001, vol. 21, pp. 2895–2900.
41. Wahlstrom, B. and Blennow, G., *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 1978, vol. 43, pp. 86–92.
42. Boturyn, D., Boudali, A., Constant, J.-F., Defrancq, E., and Lhomme, J., *Tetrahedron*, 1997, vol. 53, pp. 5485–5492.
43. Wanitchakool, P., Jariyawat, S., Suksen, K., Soorukram, D., Tuchinda, P., and Piyachaturawat, P., *Eur. J. Pharmacol.*, 2012, vol. 696, pp. 34–42.

AAPS PharmSciTech (© 2014)
DOI: 10.1208/s12249-014-0095-x

Research Article

Nonionic Surfactant Vesicles Composed of Novel Spermine-Derivative Cationic Lipids as an Effective Gene Carrier *In Vitro*

Orapan Paecharoenchai,[1] Nattisa Niyomtham,[2] Lalita Leksantikul,[1] Tanasait Ngawhirunpat,[1] Theerasak Rojanarata,[1] Boon-ek Yingyongnarongkul,[2,3] and Praneet Opanasopit[1,3]

Received 10 October 2013; accepted 28 January 2014

Abstract. In the present study, nonionic surfactant vesicles (niosomes) formulated with Span 20, cholesterol, and novel synthesized spermine-based cationic lipids with four hydrocarbon tails in a molar ratio of 2.5:2.5:1 were investigated as a gene carrier. The effects of the structure of the cationic lipids, such as differences in the acyl chain length (C14, C16, and C18) of the hydrophobic tails, as well as the weight ratio of niosomes to DNA on transfection efficiency and cell viability were evaluated in a human cervical carcinoma cell line (HeLa cells) using pDNA encoding green fluorescent protein (pEGFP-C2). The niosomes were characterized both in terms of morphology and of size and charge measurement. The formation of complexes between niosomes and DNA was verified with a gel retardation assay. The transfection efficiency of these cationic niosomes was in the following order: spermine-C18 > spermine-C16 > spermine-C14. The highest transfection efficiency was obtained for transfection with spermine-C18 niosomes at a weight ratio of 10. Additionally, no serum effect on transfection efficiency was observed. The results from a cytotoxicity and hemolytic study showed that the cationic niosomes were safe *in vitro*. In addition, the cationic niosomes showed good physical stability for at least 1 month at 4°C. Therefore, the cationic niosomes offer an excellent prospect as an alternative gene carrier.

KEY WORDS: cationic lipid; cationic niosomes; gene carrier; gene transfection; nonionic surfactant vesicles; spermine derivatives.

INTRODUCTION

Gene therapy has been widely endorsed as a promising therapeutic approach for many incurable diseases related to gene function, such as genetic diseases, cancer, cardiovascular diseases, and autoimmune diseases (1). Successful gene therapy requires not only therapeutically suitable genes but also a safe and efficient gene carrier (2). To avoid severe side effects resulting from viral vectors, such as immunogenicity, mutagenesis, and carcinogenesis, nonviral vectors offer an attractive alternative. Cationic liposomes, a vesicular system widely investigated as effective gene carriers, are one of the preferred nonviral vectors (3,4). In addition, several studies have reported on the use of another vesicular system, nonionic surfactant vesicles (niosomes), as a gene carrier that can potentially be substituted for liposomes (4–6).

Niosomes are nonionic surfactant vesicles formed by the self-assembly of nonionic amphiphiles into a bilayer structure in an aqueous medium (7). The nonionic surfactants preferably used to prepare niosomes include alkyl ethers and alkyl glyceryl ethers (Brij), sorbitan fatty acid esters (Span), and polyoxyethylenefatty acid esters (Tween) (7–9). Cholesterol is usually combined with a nonionic surfactant in a 1:1 molar ratio in niosome formulations (10,11). Niosomes can be prepared in the same way as liposomes and possess similar structure and physical properties. However, niosomes have several advantages over liposomes, including low production costs, high purity, uniform content, greater stability, and the ease of storing nonionic surfactants (12). Cationic niosomes used as gene carriers are usually composed of nonionic surfactants (*i.e.*, Tween and Span), cholesterol, and cationic lipids (10,13). One of the major factors affecting gene transfection mediated by cationic niosomes is niosome composition, including the types of surfactants and cationic lipids used (5,6).

The cationic lipids used as transfection reagents usually contain three parts: a hydrophobic group, a linker group, and a positively charged head group that can interact with DNA and cause DNA condensation. The polyamines furnish one of the most effective cationic lipid head groups (14). Among the polyamines, spermine, a well-known polyamine consisting of a tetraamine with two primary and two secondary amino groups, plays an important role as a gene carrier (15). Spermine-derivative cationic lipids commercially available for gene delivery applications include dioctadecylamidoglycylspermine (DOGS) and dipalmitoylphosphatidyl ethanolamidospermine (DPPES) (16–18). In the present study, cationic niosomes formulated with

[1] Pharmaceutical Development of Green Innovations Group (PDGIG), Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Nakhon Pathom, 73000, Thailand.
[2] Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Bangkok, 10240, Thailand.
[3] To whom correspondence should be addressed. (e-mail: boonek@ru.ac.th; praneet@su.ac.th)

Published online: 13 March 2014

1530-9932/14/0000-0001/0 © 2014 American Association of Pharmaceutical Scientists

Span 20, cholesterol, and novel synthesized spermine-based cationic lipids with four hydrocarbon tails, namely, *Tetra-(N^1,N^1,N^{14},N^{14}*-myristeroyloxyethyl)-spermine (spermine-C14), *Tetra-(N^1,N^1,N^{14},N^{14}*-palmitoyloxyethyl)-spermine (spermine-C16), and *Tetra-(N^1,N^1,N^{14},N^{14}*-steroyloxyethyl)-spermine (spermine-C18) (Fig. 1), in a molar ratio of 2.5:2.5:1 were investigated as gene carriers. Factors affecting transfection efficiency and cell viability, including cationic lipid structure (*i.e.*, differences in the acyl chain length (C14, C16, and C18) of the hydrophobic tails as well as the weight ratio of niosomes to DNA) were evaluated in a human cervical carcinoma cell line (HeLa cells) using pDNA-encoded green fluorescent protein (pEGFP-C2). The morphology, size, and charge of these niosomes/DNA complexes were characterized, and agarose gel electrophoresis was performed. Moreover, the physical stability of these cationic niosomes was evaluated with size and charge measurements.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Sorbitan monolaurate (Span 20) was obtained from Sigma-Aldrich, MO, USA. Cholesterol was purchased from Carlo Erba Reagenti, MI, Italy. Spermine-based cationic lipids as shown in Fig. 1a–c were synthesized *via* solid phase synthesis. The synthesis and characterization procedure of these compounds were described in the previous report (19). HeLa cells, the human cervical cancer cell line, were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). Modified Eagle's medium (MEM), trypsin-EDTA, penicillin–streptomycin antibiotics, and fetal bovine serum (FBS) were purchased from GIBCO-Invitrogen, NY, USA. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) was obtained from Sigma-Chemical Co., MO, USA. The pEGFP-C2 plasmid DNA, encoding green fluorescent protein (GFP), was obtained from Clontech, CA, USA. The λ*Hin*dIII were obtained from Promega, CA, USA. Lipofectamine™ 2000 was purchased from Invitrogen, NY, USA. The human leukocyte-poor packed red cells (LPRC) preserved with SAGM red cell preservation solution (dextrose monohydrate 0.9 g, sodium chloride 0.877 g, mannitol 0.525 g, and adenine 0.0169 g dissolved in 100 ml water for injection) was donated from National Blood Centre Thai Red Cross Society, Bangkok, Thailand. All other reagents employed were of cell culture and molecular biology quality.

Plasmid Preparation

pEGFP-C2 was propagated in *Escherichia coli* DH5-α and purified by using the Qiagen endotoxin-free plasmid purification kit (Qiagen, Santa Clarita, CA, USA). DNA concentration was quantified by measuring UV absorbance at 260 nm using a GeneRay UV Photometer (Biometra®, Goettingen, Germany). The purity of the plasmid was verified by gel electrophoresis (1% agarose gel) in Tris acetate-EDTA buffer, pH 8.0 (TAE buffer) using λDNA/*Hin*dIII as a DNA marker.

Preparation of Cationic Niosomes

The cationic niosomes used in the present study were prepared using a sonication method (20). Briefly, nonionic surfactants and cholesterol were dissolved in an ethanol/chloroform mixture (1:1 *v/v* ratio), whereas cationic lipid was dissolved in a chloroform/methanol mixture (2:1 *v/v* ratio). The cationic lipid solution was then added to the solution of surfactant and cholesterol to obtain a mixed solution of surfactant/cholesterol/cationic lipid in a molar ratio of 2.5:2.5:1. The solvents were evaporated under N_2 gas flow to generate a thin film at the bottom of the test tubes. The thin film was left in a desiccator overnight to remove the remaining organic solvents, and thin film hydration was performed using a Tris buffer (20 mM Tris and 150 mM NaCl, pH 7.4). After hydration, the dispersion was sonicated using a bath sonicator for 30 min followed by a probe sonicator (Vibra-Cell™ Ultrasonic Processor, Sonics & Materials, Inc., USA), each for 30 min in two cycles.

Preparation and Characterization of the Niosomes/DNA Complexes

The niosomes/DNA complexes were prepared at variable-weight ratios of niosomes to DNA by adding the niosome solution to a DNA solution (the amount of DNA was fixed at 0.5 μg). The mixture was gently mixed by pipetting up and down for 3–5 s to initiate complex formation. To complete the complex formation process, the mixture was left at room temperature for 30 min. Agarose gel electrophoresis was performed to ensure complex formation using 1% agarose gels (1 g agarose in 100 ml TAE buffer containing ethidium bromide 0.5 μg/ml) and TAE as a running buffer. The electrophoresis was performed for 45 min at 100 V. Ten microliters of niosomes/DNA complexes containing 0.5 μg of DNA were loaded per well.

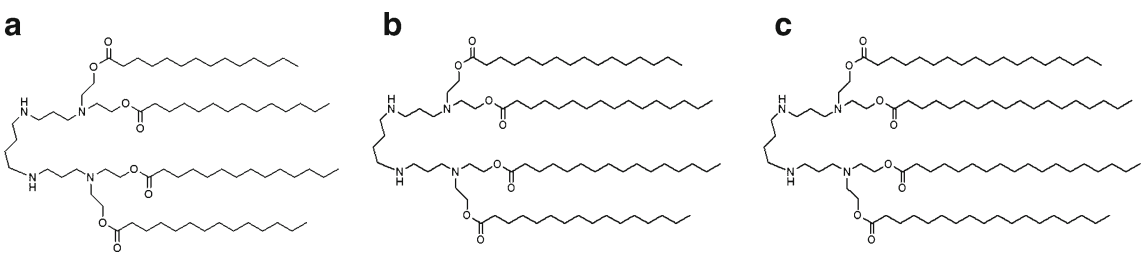


Fig. 1. Chemical structure of **a** *Tetra-(N^1,N^1,N^{14},N^{14}*-myristeroyloxyethyl)-spermine (spermine-C14), **b** *Tetra-(N^1,N^1,N^{14},N^{14}*-palmitoyloxyethyl)-spermine (spermine-C16), and **c** *Tetra-(N^1,N^1,N^{14},N^{14}*-steroyloxyethyl)-spermine (spermine-C18)

Size and Zeta Potential Measurements

The particle size and surface charge of the cationic niosomes and niosomes/DNA complexes were determined by photon correlation spectroscopy using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK). The niosomes and the niosomes/DNA complexes at varying weight ratios were diluted with distilled water that had been filtered through a 0.22-μm membrane filter to obtain the volume required for each measurement (approximately 1 ml). All samples were measured in triplicate at room temperature.

In Vitro Transfection of Niosomes/DNA Complexes into HeLa Cells

On the day before transfection, HeLa cells were seeded into a 48-well plate at a density of 2×10^4 cells/well in 0.25 ml of complete medium (MEM containing 10% fetal bovine serum and supplemented with 1% L-glutamine, 1% nonessential amino acid solution, and 100 U/ml penicillin and 100 μg/ml streptomycin) and were incubated at 37°C with 5% CO_2 overnight. Prior to transfection, the medium was removed, and the cells were incubated with 0.25 ml of the niosomes/DNA complexes in serum-free medium at variable-weight ratios containing 0.5 μg of pEGFP-C2 for 24 h at 37°C and with 5% CO_2. Cells transfected with naked pEGFP-C2 were used as negative controls, and cells transfected with Lipofectamine™ 2000 complexed with DNA at a weight ratio of 2 were used as positive controls. On the day after transfection, the cells were washed with pH 7.4 phosphate-buffered saline (PBS) and replaced with complete medium. GFP expression was directly observed under a fluorescence microscope (model: GFP-B; wavelengths: excitation filter 480/40 and emission filter 535/50). All transfection experiments were performed in triplicate. A complete medium containing 10% FBS was used to investigate the effect of serum on transfection efficiency.

Evaluation of Cell Viability

Cell viability was investigated using an MTT assay. HeLa cells were seeded into a 96-well plate at a density of 8×10^3 cells/well in 100 μl of complete medium and were incubated at 37°C and 5% CO_2 overnight. Prior to the cytotoxicity study, the medium was removed, and the cells were treated with the niosomes/DNA complexes under the same conditions as in the transfection experiment. On the day after treatment, the cells were rinsed with PBS and incubated in 100 μl MTT-containing medium (1 mg/ml) for 4 h. The formazan crystals formed in living cells were dissolved in 100 μl dimethyl sulfoxide per well. Relative cell viability (in percent) was calculated based on the absorbance observed at 550 nm using a microplate reader (Universal Microplate Analyzer, models AOPUS01 and AI53601, Packard BioScience, CT, USA) and compared with nontreated cells. The viability of nontreated cells was defined as 100%.

Hemolytic Assay of Cationic Niosomes and Niosomes/DNA Complexes

Hemolytic activity was evaluated using human LPRC according to (21). Briefly, LPRC was centrifuged at 3,800 rpm for 5 min to remove the plasma and additive solution. The red blood cells (RBCs) were then washed three times with PBS. The RBCs were distributed in a 96-well plate (100 μl/well), and an equal volume of cationic niosomes or niosomes/DNA complexes under the same concentration as in the transfection experiment (both diluted with PBS) was added. After incubation at 37°C for 1 h, the plates were centrifuged at 800×*g* for 10 min, and the supernatant was collected. The absorbance of the supernatant was measured at 550 nm using a microplate reader (Universal Microplate Analyzer, models AOPUS01 and AI53601, Packard BioScience, CT, USA). RBCs treated with PBS were used as a negative control (normal hemolysis), whereas RBCs treated with sterile water were used as a positive control (100% hemolysis). Positive and negative control wells were added on each plate. The percentage of hemolytic activity of each sample was estimated from the absorbance at 550 nm using the following equation: $[(A-A_0)/(A_{max}-A_0)]\times100$, where A_0 is the absorbance of the negative control and A_{max} is the absorbance of the positive control, corresponding to 100% hemolysis. The percentages of hemolysis (*Y* axis) were plotted against the log of niosome concentration (*X* axis), and the 50% hemolytic concentration (HC_{50}) value of the niosomes (the niosome concentration that lyses 50% RBCs) was estimated.

Transmission Electron Microscopy

The morphological analysis of cationic niosomes and niosomes/DNA complexes was performed with a transmission electron microscope (JEOL JEM-1230, JEOL, Tokyo, Japan). A small drop of sample was placed on a 200-mesh carbon-coated copper grid. The excess sample was removed using a filter paper, and the sample was then air-dried and viewed at 80 kV.

Physical Stability of Cationic Niosomes

The physical stability of the cationic niosomes after storage for 30 days at 4°C and 25°C was determined by monitoring the particle size and zeta potential.

Statistical Analysis

The significance of differences in transfection efficiency and cell viability was statistically evaluated with a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by an LSD post hoc test for analyzing transfection efficiency and a Tukey post hoc test for determining cell viability. The significance level was set at $p<0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of Cationic Niosomes and Niosomes/DNA Complexes

Cationic niosomes composed of Span 20, cholesterol (Cho), and spermine-cationic lipids with four hydrocarbon tails (Fig. 1; A = *Tetra-(N^1,N^1,N^{14},N^{14}*-myristeroyloxyethyl)-spermine (spermine-C14), B = *Tetra-(N^1,N^1,N^{14},N^{14}*-palmitoyloxyethyl)-spermine (spermine-C16), and C = *Tetra-(N^1,N^1,N^{14},N^{14}*-steroyloxyethyl)-spermine (spermine-C18)) in a molar ratio of 2.5:2.5:1 were prepared. The formulations of niosomes, particle sizes, and zeta potentials are shown in Table I. The particle size of the cationic niosomes ranged

Table I. Physical Stability of Cationic Niosomes Formulated with Span 20/Cholesterol/Spermine-Cationic Lipid in a Molar Ratio of 2.5:2.5:1 After Storage at 4°C and 25°C for 30 Days. Each Value Represents the Mean ± Standard Deviation (S.D.) from Three Independent Experiments

	Particle size (nm)			Zeta potential (mV)		
		Day 30			Day 30	
Formulations	Initial (day 0)	4°C	25°C	Initial (day 0)	4°C	25°C
Niosomes-C14 (Span 20/Cho/spermine-C14)	876±25	893±14	2,459±348	+42±7	+38±5	+1±3
Niosomes-C16 (Span 20/Cho/spermine-C16)	462±10	472±2	2,130±744	+49±1	+47±2	+2±2
Niosomes-C18 (Span 20/Cho/spermine-C18)	385±12	395±3	2,796±616	+54±1	+53±3	+15±1

from 385 to 876 nm in the following order: niosomes-C14 > niosomes-C16 > niosomes-C18. The spermine-cationic lipids with a long carbon chain may increase the rigidity of the vesicle due to deeper insertion into the bilayer, thus increasing the carbon chain length produced a decrease in vesicle size. The zeta potential of the cationic niosomes ranged from 42 to 54 mV in the following order: niosomes-C18 > niosomes-C16 > niosomes-C14. These findings might result from the intrinsic properties of each spermine-cationic lipid. The hydrophobic strength of the long-chain carbon was greater than that of the short-chain carbon. Accordingly, the long-chain carbon increased the solubility of the cationic lipid in the niosome bilayer. The amount of long-chain carbon in the niosome bilayer was higher than that of the short-chain carbon. Accordingly, the niosomes-C18 showed a higher zeta potential than the niosomes-C14. These results were consistent with the findings of a previous study that the membrane rigidity and stability of polymer-hybridized liposomes (PHL) increased with the alkyl chain length of poly(asparagines) grafted with alkyl chains at the same polymer concentration. It is expected that longer alkyl chains will have stronger hydrophobic interactions with PC lipids, producing a tighter PHL lipid bilayer (22).

The conditions for complex formation were optimized through the use of a gel retardation assay to determine the degree of binding between the cationic niosomes and DNA at varying weight ratios. DNA migration will be retarded if the carrier can form complexes with DNA. Moreover, no DNA migration is observed if complex formation is complete (23). In this study, the weight ratios of the cationic niosomes to DNA were altered by varying the amount of cationic niosomes and fixing the amount of DNA. The complex formation demonstrated by agarose gel electrophoresis is shown in Fig. 2. The results showed that niosomes-C14, niosomes-C16, and niosomes-C18 achieved complete complex formation at weight ratios greater than 130, 100, and 60, respectively (Fig. 2a–c). It can be concluded that the cationic niosomes containing spermine-cationic lipids can condense DNA at different binding affinities.

Further investigations of the particle size and zeta potential of the niosomes/DNA complexes were performed at weight ratios of 2.5, 10, 20, 30, 40, and 100. The particle size and zeta potential were plotted against the weight ratios of the niosomes/DNA complexes (Fig. 3). The particle size of all formulations of niosomes/DNA complexes did not obviously change when weight ratio increased from 2.5 to 30, whereas further increasing the weight ratio from 30 to 100 resulted in an increase in particle size. A negative value of the zeta potential of niosomes/DNA complexes in all niosome formulations was observed for weight ratios ranging from 2.5 to 40. The zeta potential changed from negative to neutral as the weight ratio increased from 40 to 100. It can be assumed from these findings that the lack of variation in particle size as well as the negative value of the zeta potential observed with the increasing weight ratios cited might be due to the adsorption of anionic DNA molecules at the cationic surface of the niosomes through electrostatic interactions.

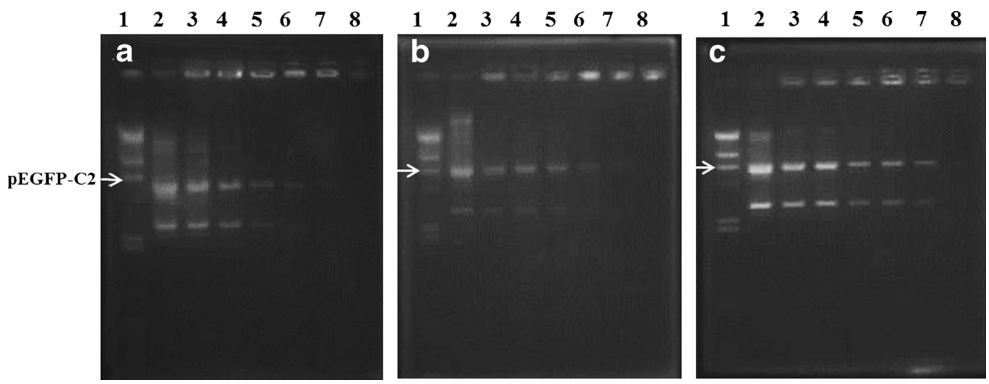


Fig. 2. Gel retardation assay of niosomes/DNA complexes. *Lane 1*, λ*Hin*d III DNA marker; *lane 2*, pEGFP-C2; *lanes 3–8*, niosomes/DNA complexes at weight ratios of 80, 90, 100, 110, 120, and 130 for **a** niosomes-C14, weight ratios of 50, 60, 70, 80, 90, and 100 for **b** niosomes-C16, and weight ratios of 35, 40, 45, 50, 55, and 60 for **c** niosomes-C18

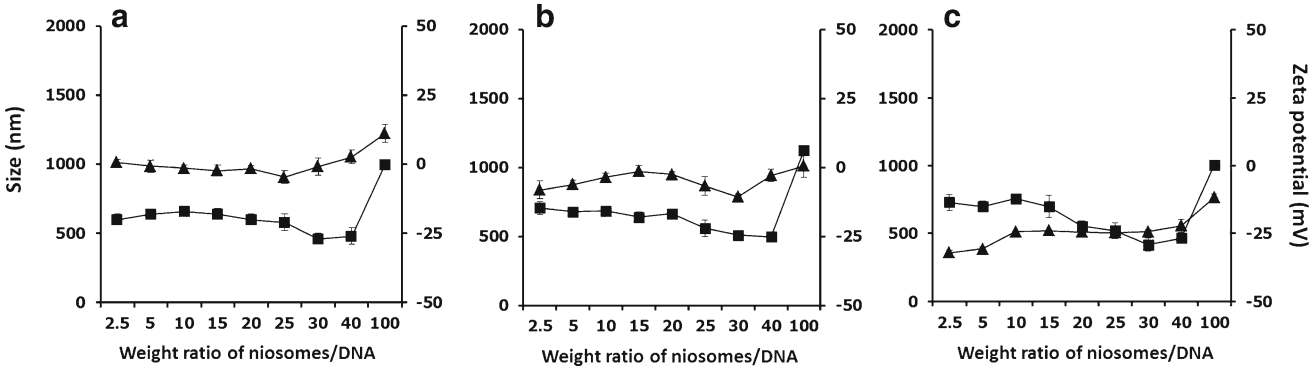


Fig. 3. Particle size (*black triangle*) and zeta potential (*black square*) at varying weight ratios of niosomes/DNA complexes; **a** niosomes-C14, **b** niosomes-C16, and **c** niosomes-C18. Each value represents the mean ± S.D. of three measurements

In Vitro Transfection in HeLa Cells

An effective gene delivery system should provide high transfection efficiency. To investigate the *in vitro* transfection efficiency of cationic niosomes, cationic niosomes carrying pEGFP-C2 were transfected into a human cervical carcinoma cell line (HeLa cells). Gene transfection mediated by cationic niosomes is affected by numerous factors, including the types of surfactants and cationic lipids that compose the niosomes (5,6). In this component of the study, the effects of multiple factors, including the acyl chain length (C14, C16, and C18) of cationic lipids and the niosomes/DNA weight ratio, on transfection efficiency were evaluated in comparison with Lipofectamine™ 2000 at a weight ratio of 2 (positive control) and naked pDNA (negative control) (Fig. 4). The niosomes-C16/DNA complexes and niosomes-C18/DNA complexes showed significantly higher transfection efficiency compared with naked DNA transfection at any weight ratio (Fig. 4b, c), whereas the transfection efficiency of niosomes-C14/DNA complexes was only significantly higher than the negative control at weight ratios of 10–40 (Fig. 4a). In general, higher weight ratios were correlated with higher transfection efficiencies. However, a decrease in transfection efficiency was observed if the weight ratio was increased above that yielding the highest transfection efficiency. This finding is in agreement with our previous reports (24,25). The highest transfection efficiency observed for the niosomes-C14, niosome-C16, and niosomes-C18 was at weight ratios of 20, 30, and 10, respectively. The transfection efficiency decreased as follows: niosomes-C18 (7,993±94 cells/cm^2) > niosomes-C16 (5,958±197 cells/cm^2) > niosomes-C14 (2,082±63 cells/cm^2).

Among the niosomes, the highest transfection efficiency was observed in the niosomes-C18 formulation at a weight ratio of 10. In addition, no significant difference was observed between the transfection efficiency of the niosomes-C18 formulation at weight ratios from 10 to 20 and that of the Lipofectamine™ 2000 positive control ($p>0.05$) (data not shown). These results showed that not only the weight ratio but also the alkyl chain length of the spermine-cationic lipids affected the efficiency of gene transfection. Increasing the alkyl chain length increased the efficiency of gene transfection. The high transfection efficiency of niosomes-C18 might be attributed to the small particle size (385±12 nm), high zeta potential (+54±1 mV), and complete DNA complex formation at lower weight ratios (above 60) relative to niosomes-C16 (above 100) and niosomes-C14 (above 130). Accordingly, the niosomes-C18 (composed of spermine-C18 cationic lipid) at a weight ratio of 10 serves as an effective gene carrier *in vitro*. However, niosomes-C18 achieved complete complex formation at weight ratios above 60 (Fig. 2c). Thus, at this weight ratio of 10, where the highest transfection efficiency was obtained, complex formation was not complete. This finding is in accordance with our previous report (20) on gene transfection using cationic niosomes containing another spermine derivative. In this previous study, the highest gene transfection efficiency was observed at a weight ratio below

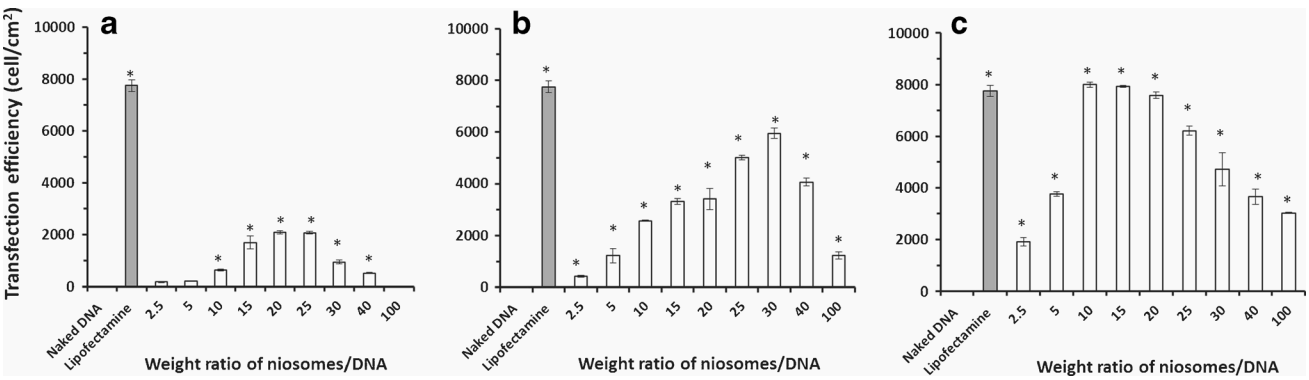


Fig. 4. *In vitro* transfection efficiency of niosomes/DNA complexes with weight ratios of 2.5–100 at pH 7.4 in HeLa cells; **a** niosomes-C14, **b** niosomes-C16, and **c** niosomes-C18. Each value represents the mean ± S.D. of triplicate experiments (Asterisk indicates $p<0.05$ compared with naked DNA)

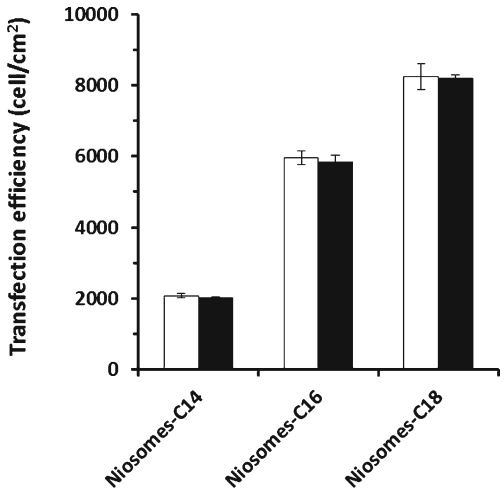


Fig. 5. *In vitro* transfection efficiency of niosomes/DNA complexes in HeLa cells at pH 7.4 in the absence of serum (*white bars*) and presence of 10% serum (*black bars*) with weight ratios of 20, 30, and 10 for niosomes-C14, niosomes-C16, and niosomes-C18, respectively. Each value represents the mean ± S.D. of triplicate experiments

that at which complete complex formation occurred (partial complex formation). In contrast, our previous study on cationic liposomes formulated with the same spermine-C18 cationic lipid and phosphatidylcholine (PC) (liposome-C18) found that the highest transfection efficiency was obtained at a weight ratio of 15 (greater than the weight ratio needed for complete complex formation) (24). This finding might result from differences between liposomes and niosomes in intracellular processing or cellular uptake mechanisms. Experiments on complex formation effects and the possible cellular >uptake mechanisms of niosomes will be conducted in the future. The surface modification of cationic liposomes using sorbitan ester (Span®) can enhance the cellular uptake of oligonucleotides through an endocytosis-dependent pathway. The hydrophobicity of cationic liposomes must be appropriate for the cellular uptake process. Excessively strong hydrophobicity may impede carrier access to the cell surface, whereas a decrease in hydrophobicity to a certain level may hinder adhesion and phagocytosis. Additionally, Span may destabilize the cell membrane by disordering the liquid crystal structures of lipid bilayers and could thus facilitate entrance by the cells of xenobiotics (26). The mechanism of cellular internalization of surfactant vesicles has also been investigated (27). The cited study suggested that surfactant vesicles were primarily internalized through the cholesterol-dependent clathrin-mediated endocytosis pathway. It is reasonable to suppose that surfactant vesicles bind nonspecifically to clustered cellular receptors in coated regions and are then internalized. After cellular internalization, effective gene carriers should promote endosomal escape. Zhou *et al.* investigated the mechanism of cellular internalization of niosomes-siRNA complexes using cationic niosomes (SPANosome) formulated with DOTAP/Span 80/TPGS in a molar ratio of 50:49:1. The niosomes-siRNA complexes were shown to be internalized by tumor cells primarily through the caveolae-mediated pathway, which does not result in lysosomal delivery and is thus less degradative. In contrast, the pathway used by lipofectamine–siRNA was primarily clathrin-mediated endocytosis (28). Accordingly, the present study investigated cationic niosomes containing Span 20 niosomes and spermine-cationic lipids. The high transfection efficiency found in this study might have occurred because cationic lipids can be protonated at an intralysosomal acidic pH, producing endosomal membrane destabilization, subsequent cytosolic release of the delivered DNA, and, finally, gene transcription and translation. Lysosomotropic

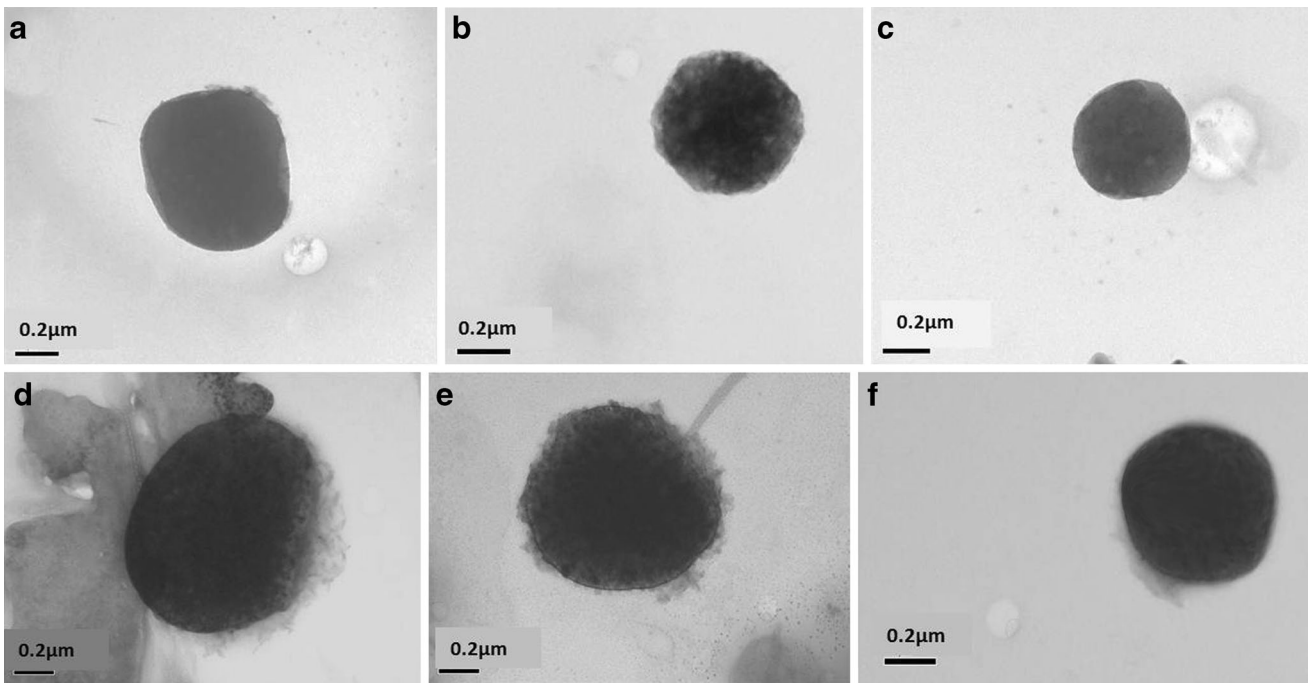


Fig. 6. Transmission electron microscope (TEM) images at magnification ×50 k of the cationic niosomes; **a** niosomes-C14; **b** niosomes-C16; **c** niosomes-C18 and niosomes/DNA complexes; **d** niosomes-C14/DNA complexes at weight ratio of 20; **e** niosomes-C16/DNA complexes at weight ratio of 30; and **f** niosomes-C18/DNA complexes at a weight ratio of 10

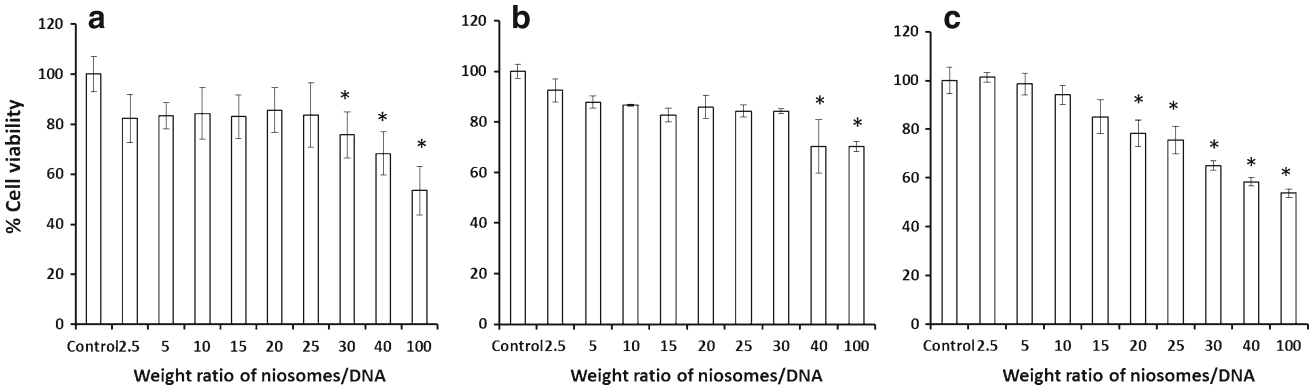


Fig. 7. The percentage cell viability of niosomes/DNA complexes with weight ratios of 2.5–100 at pH 7.4 in HeLa cells; **a** niosomes-C14, **b** niosomes-C16, and **c** niosomes-C18. Each value represents the mean ± S.D. of triplicate experiments (Asterisk indicates $p<0.05$ compared with control)

detergents, such as lipophilic amines, can become protonated at an intralysosomal acidic pH level, resulting in enhanced endosomal escape (29). The role of cationic niosomes in gene delivery, as well as the cellular uptake mechanism and intracellular process, is interesting and is currently under investigation in our laboratory.

One of the major factors to be considered regarding transfection reagents is their ability to function in serum-supplemented cell culture medium. A crucial drawback hindering the clinical success of cationic transfection lipids is their serum incompatibility. The *in vitro* gene transfection efficiency of cationic amphiphiles is usually adversely affected in the presence of serum. Generally, gene transfection mediated by cationic liposomes is inhibited by serum (30). Such serum incompatibility of cationic transfection lipids is hypothesized to begin through the adsorption of negatively charged serum proteins onto the positively charged cationic liposome surfaces, preventing the efficient interaction of these proteins with the cell surface and/or their internalization (31). Additional investigations of the effect of serum on the transfection efficiency of cationic niosomes (niosomes-C14, niosomes-C16, and niosomes-C18) at the weight ratios that provided the highest gene transfection were conducted (Fig. 5). The transfection efficiency of all of the niosome formulations did not differ significantly in the presence (10% FBS) and absence of serum ($p>0.05$). This presence of a serum effect appears to be another advantageous property of these cationic niosomes that facilitates their use as gene carriers.

Morphological Analysis of Cationic Niosomes and Niosomes/DNA Complexes

The cationic niosomes and niosomes/DNA complexes were morphologically characterized with transmission electron microscopy (TEM). The TEM images demonstrated that the cationic niosomes had spherical shapes with a smooth surface and a detached border (Fig. 6a–c). The morphology of the niosomes/DNA complex at the weight ratio providing the highest gene transfection is illustrated in Fig. 6d–f. This complex also had a spherical shape, but the surface of the complex was rough or hairy, and the particle size was larger. The hairy surface of the complex in the images shows that anionic DNA molecules interacted electrostatically with the cationic niosome surfaces.

Effect of Niosomes/DNA Complexes on Cell Viability

Suitable gene delivery systems require not only high transfection efficiency but also safety. To assure the safety of the gene carriers, an MTT assay was performed in HeLa cell culture (Fig. 7). The cell viability of the niosomes/DNA complex-treated cells was compared with the nontreated cells

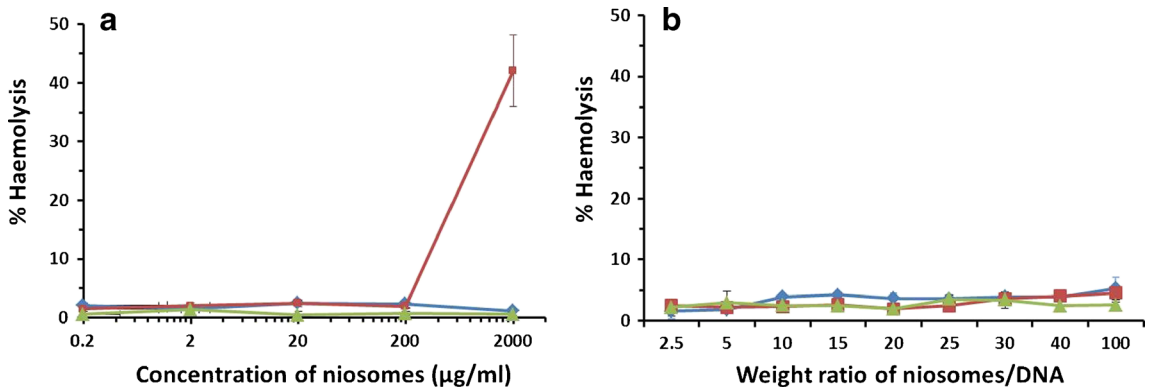


Fig. 8. Hemolytic activity of **a** cationic niosome concentrations of 0.2–2,000 μg/ml and **b** niosomes/DNA complexes with weight ratios of 2.5–100 at pH 7.4 in human leukocyte-poor packed red cells (LPRC); niosomes-C14 (◆), niosomes-C16 (■), niosomes-C18 (▲). Each value represents the mean ± S.D. of triplicate experiments

(controls). Safe formulations should result in cell viabilities similar to those of untreated cells. The results showed that niosomes-C14 was safe for use at a weight ratio of 2.5–25, whereas niosomes-C16 and niosomes-C18 were safe at weight ratios of 2.5–30 and 2.5–15, respectively. Cytotoxicity has been observed to be correlated with increasing carrier-to-DNA weight ratios (23). These cationic niosomes possess low toxicity at the weight ratios that provided the highest transfection efficiency (weight ratios of 20, 30, and 10 for niosome-C14, niosome-C16, and niosome-C18 formulations, respectively). Therefore, it can be assumed that these cationic niosomes are safe for *in vitro* use.

Hemolytic Assay

The hemolytic activity of cationic niosomes and niosomes/DNA complexes was determined using RBCs as a marker of general membrane toxicity (21). To evaluate the hemolytic activity of cationic niosomes in terms of HC_{50}, the percentage of hemolysis was plotted against the log niosome concentration. All niosome formulations in the concentrations of 0.2 to 2,000 μg/ml used in this study had a low hemolytic effect, and the estimated HC_{50} of all formulations was greater than 2,000 μg/ml (the concentration of niosomes prepared in this study was approximately 2,000 μg/ml) (Fig. 8a). In addition, the niosomes/DNA complexes at the weight ratios used in the transfection experiment (weight ratios of 2.5 to 100) also showed a low hemolytic effect (Fig. 8b).

Due to safety concerns, the internal use of Span is limited because of its surfactant properties. In this study, however, the concentration of Span 20 in the niosome formulation that provided the highest transfection efficiency showed low hemolytic activity. Additionally, successful topical genetic immunization against hepatitis B in mice using niosomes composed of Span 85 and cholesterol encapsulating DNA encoding hepatitis B surface antigen (HBsAg) has been reported (12). Consequently, it might be assumed that Span-niosomes represent a promising alternative for *in vivo* application.

Physical Stability of Cationic Niosomes

Particle size is an important indicator of the stability response of colloids. Increases in particle size usually result from the aggregation and fusion of colloidal vesicles, correlated with an unstable colloidal system. After storage of the cationic niosomes at 4°C and 25°C for 30 days, the particle size and zeta potential of the niosomes were determined (Table I). The particle size of all niosome formulations stored at 25°C increased markedly compared with the initial value (day 0), whereas no alterations in particle size were observed at 4°C for any formulation. The zeta potential of all niosome formulations stored at 25°C decreased markedly compared with the initial value, whereas almost no changes in zeta potential were observed at 4°C for any formulation.

To prevent aggregation, vesicles must have a high surface charge to provide sufficient electrostatic repulsion (13). Cationic niosomes only show good physicochemical stability after refrigeration (4°C). This result implies that the stability of cationic niosomes is primarily affected by temperature. Temperature is associated with energy input, which can induce changes in the crystalline structure of lipids. This finding was in agreement with a previous observation (32) that rapid growth of solid lipid nanoparticles (SLNs) stored at 50°C occurred in association with a decrease in the zeta potential of the SLNs. Additionally, high temperatures can induce destabilization due to changes in zeta potential (33). In conclusion, the cationic niosomes were physically stable for at least 1 month at 4°C.

Although the particle size of the niosomes-DNA complexes that provided the highest transfection efficiency was relatively large (approximately 500 nm), this system might be used for topical DNA delivery. For cutaneous gene therapy, several niosome formulations have been successfully reported to deliver genes to the skin and provide excellent transfection efficiency (10). The current study shows that niosomes can potentially be used as a gene carrier *in vitro*. Several studies have reported that niosomes can facilitate siRNA delivery *in vitro* as well as gene delivery (28,34). Our study also supported the view that Span 20 niosomes show a low hemolytic effect and might serve as a promising alternative *in vivo*. However, further investigations of intracellular uptake mechanisms as well as the *in vivo* efficacy and safety of this system are required.

CONCLUSIONS

Cationic niosomes formulated from Span 20, cholesterol, and novel spermine-based cationic lipids with differences in the acyl chain length (C14, C16, and C18) of the hydrocarbon tails at a molar ratio of 2.5:2.5:1 were successfully prepared to enhance transfection efficiency *in vitro*. The niosomes composed of spermine cationic lipid with an acyl chain length of C18 demonstrated the highest transfection efficiency as well as low cytotoxicity and a low hemolytic effect *in vitro*. Additionally, the cationic niosomes had good physical stability for at least 1 month at 4°C. Consequently, these cationic niosomes show an excellent potential as an alternative gene carrier.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to acknowledge the Commission of Higher Education (Thailand), the Thailand Research Funds through the Golden Jubilee Ph.D. Program (grant nos. PHD/0092/2551 and PHD/0217/2552), the Office of the Higher Education Commission, Ministry of Education, the Thailand Research Fund (RMU5480003), and the Silpakorn University Research and Development Institute (SURDI 57/01/24) for financial support.

REFERENCES

1. Mhashilkar A, Chada S, Roth JA, Ramesh R. Gene therapy: therapeutic approaches and implications. Biotechnol Adv. 2001;19:279–97.
2. Gabor MR. The future of human gene therapy. Mol Aspects Med. 2001;22:113–42.
3. Serikawa T, Suzuki N, Kikuchi H, Tanaka K, Kitagawa T. A new cationic liposome for efficient gene delivery with serum into cultured human cells: a quantitative analysis using two independent fluorescent probes. Biochim Biophys Acta. 2000;1467:419–30.
4. He CX, Tabata Y, Gao JQ. Non-viral gene delivery carrier and its three-dimensional transfection system. Int J Pharm. 2010;386:232–42.

5. Huang Y, Chen J, Chen X, Gao J, Liang W. PEGylated synthetic surfactant vesicles (Niosomes): novel carriers for oligonucleotides. J Mater Sci. 2008;19:607–14.
6. Manosroi A, Thathang K, Werner RG, Schubert R, Manosroi J. Stability of luciferase plasmid entrapped in cationic bilayer vesicles. Int J Pharm. 2008;356:291–9.
7. Uchegbu IF, Vyas SP. Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) in drug delivery. Int J Pharm. 1998;172:33–70.
8. Kumar GP, Rajeshwarrao P. Nonionic surfactant vesicular systems for effective drug delivery—an overview. Acta Pharmacol Sin B. 2011;1:208–19.
9. Mahale NB, Thakkar PD, Mali RG, Walunj DR, Chaudhari SR. Niosomes: novel sustained release nonionic stable vesicular systems—an overview. Adv Colloid Interface Sci. 2012;183–184:46–54.
10. Geusens B, Strobbe T, Bracke S, Dynoodt P, Sanders N, Gele MV, *et al*. Lipid-mediated gene delivery to the skin. Eur J Pharm Sci. 2011;43:199–211.
11. Manosroi A, Wongtrakul P, Manosroi J, Sakai H, Sugawara F, Yuasa M, *et al*. Characterization of vesicles prepared with various non-ionic surfactants mixed with cholesterol. J Colloids Surf B: Biointerfaces. 2003;30:129–38.
12. Vyas SP, Singh RP, Jain S, Mishra V, Mahor S, Singh P, *et al*. Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) for non-invasive topical genetic immunization against hepatitis B. Int J Pharm. 2005;296:80–6.
13. Huang Y, Rao Y, Chen J, Yang VC, Liang W. Polysorbate cationic synthetic vesicle for gene delivery. J Biomed Mater Res A. 2011;96:513–9.
14. Ram IM. Water insoluble and soluble lipids for gene delivery. Adv Drug Deliv Rev. 2005;57:699–712.
15. Azzama T, Eliyahua H, Makovitzki A, Linial M, Domb AJ. Hydrophobized dextran-spermine conjugate as potential vector for in vitro gene transfection. J Control Release. 2004;96:309–23.
16. Gaucheron J, Santaella C, Vierling P. Transfection with fluorinated lipoplexes based on fluorinated analogues of DOTMA, DMRIE and DPPES. Biochim Biophys Acta. 2002;1564:349–58.
17. Jean PB, Barbara D, Jean PL, Jose PM. Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989;86:6982–6.
18. Morille M, Passirani C, Vonarbourg A, Clavreul A, Benoit JP. Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. Biomaterials. 2008;29:3477–96.
19. Yingyongnarongkul B, Radchatawedchakoon W, Krajarng A, Watanapokasin R, Suksamrarn A. High transfection efficiency and low toxicity cationic lipids with aminoglycerol-diamine conjugate. Bioorg Med Chem. 2009;17:176–88.
20. Paecharoenchai O, Niyomtham N, Ngawhirunpat T, Rojanarata T, Yingyongnarongkul B, Opanasopit P. Cationic niosomes composed of spermine-based cationic lipids mediate high gene transfection efficiency. J Drug Target. 2012;20:783–92.
21. Lopes RM, Luísa CM, Eleutério CV, Carvalheiro MC, Scoullica E, Cruz ME. Formulation of ORZ liposomes: in vitro studies and in vivo fate. Eur J Pharm Biopharm. 2012;82:281–90.
22. Park SI, Lee EO, Yang HM, Park CW, Kim JD. Polymer-hybridized liposomes anchored with alkyl grafted poly(asparagine). J Colloid Interface Sci. 2011;364:31–8.
23. Weecharangsan W, Opanasopit P, Ngawhirunpat T, Apirakaramwong A, Rojanarata T, Ruktanonchai U, *et al*. Evaluation of chitosan salts as non-viral gene vectors in CHO-K1 cells. Int J Pharm. 2008;348:161–8.
24. Paecharoenchai O, Niyomtham N, Apirakaramwong A, Yingyongnarongkul B, Opanasopit P. Effect of acyl chain length of spermine derivatives on transfection efficiency. Adv Mater Res. 2012;506:445–8.
25. Paecharoenchai O, Niyomtham N, Apirakaramwong A, Ngawhirunpat T, Rojanarata T, Yingyongnarongkul B, *et al*. Structure relationship of cationic lipids on gene transfection mediated by cationic liposomes. AAPS PharmSciTech. 2012;13:1302–8.
26. Huang YZ, Gao JQ, Chen JL, Liang WQ. Cationic liposomes modified with non-ionic surfactants as effective non-viral carrier for gene transfer. Colloids Surf B: Biointerfaces. 2006;49:158–64.
27. Marzio DL, Marianecci C, Cinque B, Nazzarri M, Cimini AM, Cristiano L, *et al*. pH-sensitive non-phospholipid vesicle and macrophage-like cells: binding, uptake and endocytotic pathway. Biochim Biophys Acta. 2008;1778:2749–56.
28. Zhou C, Zhang Y, Yu B, Phelps MA, Lee LJ, Lee RJ. Comparative cellular pharmacokinetics and pharmacodynamics of siRNA delivery by SPANosomes and by cationic liposomes. Nanomedicine. 2013;9(4):504–13.
29. Liang E, Hughes J. Characterization of a pH-sensitive surfactant, dodecyl-2-(1′-imidazolyl) propionate (DIP), and preliminary studies in liposome mediated gene transfer. Biochim Biophys Acta. 1998;1369:39–50.
30. Sato T, Ishii T, Okahata Y. In vitro gene delivery mediated by chitosan: effect of pH, serum, and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency. Biomaterials. 2001;22:2075–80.
31. Li S, Tseng WC, Stolz DB, Wu SP, Watkins SC, Huang L. Dynamic changes in the characteristics of cationic lipidic vectors after exposure to mouse serum: implications for intravenous lipofection. Gene Ther. 1999;6:585–94.
32. Freitas C, Müller RH. Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN) dispersions. Int J Pharm. 1998;168:221–9.
33. Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP. Physicochemical stability of colloidal lipid particles. Biomaterials. 2003;24:4283–300.
34. Paecharoenchai O, Teng L, Yung BC, Teng L, Opanasopit P, Lee RJ. Nonionic surfactant vesicles for delivery of RNAi therapeutics. Nanomedicine. 2013;8(11):1865–73.