



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การเพิ่มประสิทธิภาพการรักษามะเร็งปากมดลูกด้วยลิโปโซม
ดัดแปลงพื้นผิวและเทคนิคการนำส่งยาแบบมุ่งเป้า

โดย

นางณัฐริกา แสงกฤษฎ

16 ธันวาคม 2560

สัญญาเลขที่ RSA5680041

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความร่วมแรงอย่างดียิ่งของทีมวิจัย ห้องปฏิบัติการระบบนำส่ง ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ได้แก่ น.ส. สุภาวดี บุญทศ, นายสมศักดิ์ แซ่ชู, ดร. สุวิมล สุรัสโม, ดร. ชีรพงศ์ ยะทา และ ดร. คทาวัช นามดี ขอขอบพระคุณนักวิจัยจากหน่วยวิจัยเกษตรนาโนและสิ่งแวดล้อม ได้แก่ นางสาวภัทรศยา ทรงคำ, ดร. กฤตภาส เลหาสุโยธิน และ ดร. วรายุทธ สระโสมแสง สำหรับการวิเคราะห์สารสำคัญและการสังเคราะห์อนุพันธ์โคโตซาน ขอขอบพระคุณ รศ. ดร. สิทธิ สารสุขเมธี สำหรับความอนุเคราะห์ bevacizumab (anti-VEGF) เพื่อใช้ในการทดลอง ขอขอบคุณ ดร. อรุชา รัชต์ตานนท์ชัย และ รศ. ดร. สาธิต พุทธิพิพัฒน์ขจร สำหรับการให้คำปรึกษาเชิงเทคนิคตลอดการวิจัย และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ สำหรับสถานที่และคำแนะนำสำหรับการในการดำเนินการทดลองในสัตว์

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่ได้ให้การสนับสนุนทุนพัฒนานักวิจัย รหัสโครงการ RSA5680041

ณัฐริกา แสงกฤษ

บทสรุปผู้บริหาร

ในการศึกษานี้ ทีมวิจัยได้พัฒนาระบบนำส่งลิโปโซมใหม่สองระบบ เพื่อการรักษามะเร็งปากมดลูกแบบมุ่งเป้าอย่างมีประสิทธิภาพ ระบบแรกคือลิโปโซมที่ดัดแปลงพื้นผิวเพื่อการเกาะติดเยื่อเมือก ด้วยการออกแบบและสังเคราะห์อนุพันธุ์ไคโตซาน Quaternized N,O-oleoyl chitosan (QCS) แล้วนำมาเตรียมเป็นลิโปโซมเกิดเป็น Lip-QCS ซึ่งเป็นอนุภาครูปทรงกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 171.5 ± 0.8 นาโนเมตร มีการกระจายตัวของขนาดอนุภาคอยู่ในช่วงแคบ (PDI 0.1 ± 0.0) และมีค่าประจุพื้นผิว 11.7 ± 0.7 mV อนุภาค Lip-QCS ที่ได้มีความสามารถในการเกาะติดเยื่อเมือก เหมาะสำหรับการส่งผ่านเซลล์ที่มีเยื่อเมือกปกคลุมเช่น เซลล์เยื่อบุปากมดลูก นอกจากนี้ยังพบว่า การเติม QCS ในระบบนำส่งลิโปโซมนั้น สามารถช่วยเพิ่มค่าประจุบวกให้อนุภาคซึ่งมีผลเพิ่มสามารถในการเข้าเซลล์อีกด้วย จากการตรวจตามอนุภาคที่เข้าเซลล์ที่ระยะเวลาบ่ม 2 ชั่วโมงพบว่า Lip-QCS สามารถเข้าเซลล์ได้เพิ่มขึ้นถึง 17% ทีมวิจัยได้ใช้ระบบนำส่ง Lip-QCS บรรจุ cisplatin ซึ่งเป็นยาเคมีบำบัดสำหรับการรักษามะเร็งปากมดลูก พบว่าอนุภาคสามารถบรรจุยาโดยมีค่าการกักเก็บ (encapsulation efficiency) เท่ากับ 27.45 ± 0.78 % และยังได้ตรวจสอบประสิทธิภาพในการรักษาเซลล์มะเร็งในระบบเซลล์มะเร็งปากมดลูกจำลองสามมิติ (3D spheroid cervical cancer) พบว่า Lip-QCS-cis มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งและชักนำให้เกิด apoptosis ได้โดยให้ผลการปลดปล่อยแบบระยะยาว ดังนั้นระบบนำส่งยาที่ได้พัฒนาขึ้นนี้ จึงเป็นตัวอย่างที่น่าจะเป็นประโยชน์ในการเพิ่มประสิทธิภาพการรักษา มะเร็งปากมดลูก

ระบบนำส่งแบบที่สองคืออิมมูโนลิโปโซม (immune liposome) ซึ่งมีการเชื่อมแอนติบอดี anti-VEGF (ชื่อทางการค้าคือ avastin®) ให้ติดบนพื้นผิวของลิโปโซม เนื่องจาก anti-VEGF สามารถจับอย่างจำเพาะกับโปรตีน VEGF ที่หลั่งรอบจากเซลล์ปากมดลูกที่มีการเปลี่ยนรูปเป็นเซลล์มะเร็ง ดังนั้นหากใช้ระบบนำส่งนี้ส่งยาเคมีบำบัดเข้าสู่ร่างกายจึงคาดว่าจะมีการสะสมของอนุภาคที่บริเวณเซลล์มะเร็ง ช่วยลดความเป็นพิษของยาต่อเซลล์ปกติ การทดลองใช้อนุภาคนาโน PLGA เป็นแกนกลางในการบรรจุยาเคมีบำบัด cisplatin ได้เป็น PLGA-cis มีขนาด 233.5 ± 7.3 nm และมีค่าประสิทธิภาพของการกักเก็บยาเท่ากับ 30.1 % จากนั้นจึงเคลือบ PLGA ด้วยลิโปโซมเพื่อช่วยเสริมการเข้าเซลล์ของอนุภาค ขั้นสุดท้ายคือการเชื่อม anti-VEGF ที่ผิวลิโปโซมเพื่อช่วยเพิ่มความจำเพาะและประสิทธิภาพในการรักษา พบว่า 50 % ของ anti-VEGF สามารถเชื่อมติดบนอนุภาคได้ เกิดเป็น PLGA-lip-anti-VEGF มีลักษณะกลมและพบชั้นของไขมันเคลือบเมื่อตรวจสอบด้วย TEM จากนั้นทีมวิจัยได้ทำการทดลองในหนูซึ่งปลูกถ่ายเนื้อเยื่อมะเร็งปากมดลูก เพื่อตรวจสอบความสามารถในการนำส่งแบบมุ่งเป้าและตรวจตามผลการยับยั้งเซลล์มะเร็ง ผลการทดลองพบว่า อนุภาคที่ติดโมเลกุลเป้าหมาย PLGA-lip-anti-VEGF มีสัญญาณการสะสมของอนุภาคที่บริเวณมะเร็งเป้าหมายมากกว่าแบบที่ไม่ติด การทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของระบบนำส่งยาเพื่อการรักษามะเร็งแบบมุ่งเป้าสำหรับการรักษามะเร็งปากมดลูก

Executive summary

In this study, two novel surface modified liposomes possessing targeted therapeutic effect against cervical cancer were purposed. First, mucoadhesive nanocarrier, possessing cancer therapeutic effect against cervical cancer was developed. An amphiphilic chitosan derivative, quaternized N,O-oleoyl chitosan (QCS) was designed and synthesized. QCS was incorporated into liposome vesicles, generating QCS liposome (Lip-QCS). Lip-QCS liposomes were spherical in shape (average size diameter 171.5 ± 0.8 nm), with a narrow size distribution (PDI 0.1 ± 0.0) and zeta potential of 11.7 ± 0.7 mV. *In vitro* mucoadhesive tests indicated that Lip-QCS is a mucoadhesive liposome. Moreover, the presence of QCS was able to induce the cationic charge on the surface of liposome. Cellular internalization of Lip-QCS was monitored over time, with the results revealing that the cell entry level of Lip-QCS was elevated 17 % at 2 h. Following this, Lip-QCS were then employed to load cisplatin, a common platinum-containing anti-cancer drug, with encapsulation efficiency of 27.45 ± 0.78 % being obtained. The therapeutic potency of the loaded Lip-QCS was investigated using a 3D spheroid cervical cancer model (SiHa) which highlighted their cytotoxicity and apoptosis effect, and suitability as a controllable system for sustained drug release. This approach has the potential to assist in development of an effective drug delivery system against cervical cancer.

The second study is related with immuno liposome development. Anti-VEGF (a commercial available namely, avastin®) was conjugated on liposome surface. Since anti-VEGF specifically bind to VEGF protein secreted around cervix transformed cell. Thus, the developed delivery system would accumulated at the tumor target site. We firstly prepared particle using PLGA as a core for loading cisplatin. PLGA-cis particle size diameters were 233.5 ± 7.3 nm in average, and it possessed 30.1 % encapsulation efficiency. Liposome was then formulated to coat on PLGA-cis particle in order to facilitate cellular uptake. Finally, anti-VEGF was decorated on liposome surface to enhance specificity and promote therapeutic effect. We found that 50 % of anti-VEGF was successfully conjugated. The obtained nanoparticle, PLGA-lip-anti VEGF, exhibited spherical shape detected under TEM. Targeting ability and therapeutic effect of PLGA-lip-anti VEGF were examined *in vivo* in cervical cancer xenograft in mouse model. The result revealed that PLGA-lip-anti VEGF was significantly accumulated at the tumor xenograft with signal intensity higher than that of non-targeted one. The tumor volume was also reduced which indicated therapeutic efficacy of PLGA-lip-anti-VEGF. The study demonstrated the potential to develop an effective drug delivery system for active target therapy cervical cancer.

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RSA5680041

ชื่อโครงการ : การเพิ่มประสิทธิภาพการรักษามะเร็งปากมดลูกด้วยลิโปโซมดัดแปลงพื้นผิวและเทคนิคการนำส่งยาแบบมุ่งเป้า

ชื่อนักวิจัย : ดร. ณัฐริกา แสงกฤษ ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ
สำนักงานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

E-mail Address : nattika@nanotec.or.th

Project Period : 17 มิ.ย. 2556-16 ธ.ค. 60

การวิจัยนี้มีเป้าหมายพัฒนาระบบนำส่งยาบำบัดมะเร็งปากมดลูก โดยออกแบบให้ยาบรรจุในอนุภาคนาโนลิโปโซม เพื่อการนำส่งยาที่มีประสิทธิภาพสูง เป็นพิษต่ำและมีความจำเพาะกับเซลล์เป้าหมาย ในการทดลองนี้ได้นำการดัดแปลงผิวของลิโปโซมให้มีหน้าที่จำเพาะสำหรับการรักษามะเร็งปากมดลูกซึ่งระบบนำส่งที่ใช้จะเป็น liposome ที่ได้รับการดัดแปลงพื้นผิว 2 ระบบคือ 1) ระบบนำส่งยาประจุบวกและเกาะติดเยื่อเมือกที่ดัดแปลงผิวของอนุภาคให้มี quaternized N,O-oleoyl chitosan (QCS) เกิดเป็นระบบผสม Lip-QCS และ 2) ระบบนำส่งยาแบบมุ่งเป้าที่ติด anti-VEGF เพื่ออนุภาคนาโนที่บรรจุยาที่มีความจำเพาะในการนำส่งเข้าสู่เซลล์มะเร็งเป้าหมาย ได้อนุภาค PLGA-lip+anti-VEGF ระบบนำส่งทั้ง 2 แบบนี้ ได้บรรจุยา cisplatin ซึ่งเป็นยาเคมีบำบัดที่ใช้ในการรักษามะเร็งปากมดลูก ในการทดลองนี้ได้ทำการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางเคมีกายภาพ คุณสมบัติของพื้นผิวของอนุภาคที่เกิดจากการดัดแปลง ความเป็นพิษของระบบความสามารถในการเข้าเซลล์เป้าหมาย ประสิทธิภาพการกักเก็บยา และความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเป้าหมาย

คำหลัก: ระบบนำส่งยาแบบมุ่งเป้า, ลิโปโซม, ซิสพลาติน, มะเร็งปากมดลูก

Abstract

Project Code : RSA5680041

Project Title : Development of ligand-targeted and surface-modified liposome for specific drug delivery to cervical cancer cell

Investigator : Dr. Nattika Saengkrit, National Nanotechnology Center, National Science and Technology Development Agency (NSTDA)

E-mail Address : nattika@nanotec.or.th

Project Period : 17 Jun 2513-16 Dec 17

This study focuses on development of chemotherapeutic drug delivery system of cervical cancer therapy. Liposome is employed for drug encapsulation, aiming to enhance drug efficacy with low toxicity and high specificity to the cell target. Surface functionalization of liposome was the approach used to generate the drug delivery vehicle. Accordingly, we purposed two novel modification system for targeting approach. The system are including 1) a cationic/mucoadhesive liposome which generate through the incorporation of quaternized N,O-oleoyl chitosan (QCS) in liposome, resulting in a hybrid system named Lip-QCS and 2) a PLGA coated liposome in which anti-VEGF, a therapeutic and targeted antibody drug was conjugated resulting, PLGA-lip+anti-VEGF. These two delivery systems were employed to load with cisplatin which is a chemotherapeutic drug in the cervical cancer treatment. We determined the physical morphology, physicochemistry, surface functional property by design, cytotoxicity, cellular uptake and the efficiency in inhibition of cancer target cell.

Keywords: Active targeted drug delivery system, liposome, cisplatin, cervical cancer

บทนำ

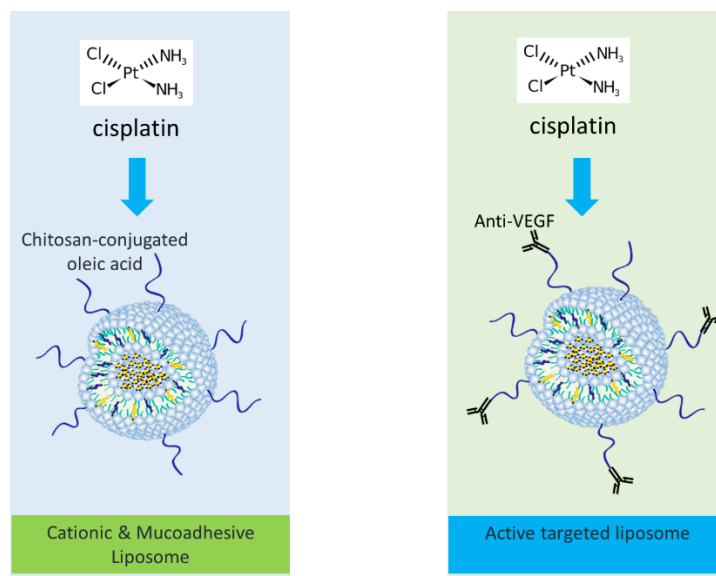
มะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งที่ก่อให้เกิดอัตราการตายสูงสุดเป็นอันดับสองในเพศหญิงรองจากมะเร็งทรวงอก ในปี 2008 ได้มีการบันทึกว่าทั่วโลกมีผู้เป็นมะเร็งชนิดนี้ 529,409 ราย จากจำนวนนี้พบว่าการเสียชีวิต 274,883 ราย ซึ่งคิดเป็น 50% ของผู้ป่วยที่ตรวจพบอาการโรค นอกจากนี้ยังพบว่า 86% ของโรคนี้นพบในประเทศที่กำลังพัฒนา (WHO report-THAILAND 2010) สำหรับประเทศไทยนั้น ตามรายงานของ WHO ปี 2016 พบว่าในหญิงไทยที่มีอายุ 15 ปีขึ้นไปทั้งหมดจำนวน 26.09 ล้านคน ตรวจพบว่ามีประมาณ 9,999 คนที่เป็นมะเร็งดังกล่าว และจากจำนวนนี้มี 5,216 คนเสียชีวิต เป็นที่ทราบกันดีว่าสาเหตุหลักของการเกิดมะเร็งชนิดนี้คือเชื้อ Human papillomavirus (HPV) โดยเฉพาะ type 16 และ 18 แม้ว่าการตรวจ Pap smear จะช่วยคัดกรองและบรรเทาการลุกลามของโรค อย่างไรก็ตาม ระบบการรักษาที่มีประสิทธิภาพก็เป็นอีกด้านหนึ่งที่ต้องพัฒนาเพื่อช่วยลดความสูญเสียได้ ในการรักษามะเร็งปากมดลูกนั้น จะมีทั้งวิธีการผ่าตัด ร่วมกับการใช้แสงและ/หรือการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด กลุ่มยาเคมีบำบัดที่ใช้ได้แก่ cisplatin, paclitaxel, ifosfamide และ topotecan

ในการวิจัยนี้ได้ศึกษาการใช้ระบบนำส่งยาที่เป็นอนุภาคนาโนสำหรับกักเก็บ cisplatin ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม platinum-based anti-cancer ที่ใช้ชักนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็ง โดยการรบกวนกระบวนการแปลรหัสของดีเอ็นเอและกลไกการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอ เป็นผลให้การส่งสัญญาณของสารต่าง ๆ ในเซลล์ถูกรบกวนทำให้เซลล์เกิด apoptosis (Siddik., 2003) แม้ว่า cisplatin จะเป็นยาเคมีบำบัดลำดับแรก (first line drug) ที่ใช้ในการรักษามะเร็งปากมดลูก แต่การใช้ก็ยังมีความจำกัดเนื่องจากเป็นยาที่มีความเป็นพิษสูงมากสามารถก่อให้เกิดผลข้างเคียงต่อ ตับ ไต ระบบประสาท การได้ยิน รวมถึงการคลื่นไส้ (Giaccone et al., 2000) นอกจากนี้แล้วโมเลกุลของยายังมีขนาดเล็กทำให้มีการขับออกจากร่างกายได้เร็ว ยาอยู่ในมะเร็งเป้าหมายเป็นเวลานาน ๆ แต่สามารถไหลเวียนในกระแสเลือดได้ดีทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อปกติ (Konishi et al., 2003)

การวิจัยนี้มีเป้าหมายเพื่อพัฒนาระบบนำส่งยาบำบัดมะเร็งปากมดลูก โดยออกแบบให้ยาบรรจุอยู่ในอนุภาคนาโนไลโปโซม เพื่อนำส่งยาที่มีประสิทธิภาพสูง เป็นพิษต่ำและมีความจำเพาะกับเซลล์เป้าหมาย ในการทดลองนี้ได้เน้นการดัดแปลงผิวของไลโปโซมให้มีหน้าที่จำเพาะสำหรับการรักษามะเร็งปากมดลูก ระบบนำส่งที่ใช้จะเป็น liposome ที่ได้รับการดัดแปลงพื้นผิว 2 ระบบคือ

1. ระบบนำส่งยาประจุบวกและเกาะติดเยื่อเมือก chitosan-conjugated liposome ซึ่งบรรจุยา cisplatin เพื่อการรักษามะเร็งปากมดลูก
2. ระบบนำส่งยาแบบมุ่งเป้า PLGA-liposome บรรจุยา cisplatin เพื่อการรักษามะเร็งปากมดลูก โดยใช้ anti-VEGF เป็นโมเลกุลช่วยในการจับกับเซลล์เป้าหมายได้

ระบบทั้งสองแสดงดังภาพที่ 1 ในเนื้อหาวิทยานิพนธ์นี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 เรื่อง ตามลำดับ



ภาพที่ 1 แสดงระบบนำส่งแบบไขมันที่มีการดัดแปลงผิวของอนุภาคด้วย chitosan-conjugated oleic acid (a) และ anti-VEGF (b) เพื่อการนำส่งอย่างมีประสิทธิภาพ

วิธีการทดลอง

เรื่องที่ 1 ระบบนำส่ง chitosan-conjugated liposome บรรจุ cisplatin เพื่อการรักษามะเร็งปากมดลูกด้วยระบบนำส่งแบบเกาะติดเยื่อเมือก

เซลล์มะเร็งปากมดลูกเพาะเลี้ยง

เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa (ATCC® HTB-35™) เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงแบบเกาะ ได้มาจากชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ squamous cell บริเวณปากมดลูก (Squamous cell carcinoma) ภายในเซลล์มีเชื้อ HPV สายพันธุ์ที่ 16 อาศัยอยู่ 1-2 copies และจัดเป็นเซลล์ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกระยะที่ 2

การสังเคราะห์ quaternized N,O-oleoyl chitosan (QCS)

เพื่อให้โคโตซานมีประจุบวก ละลายน้ำได้ และมีส่วนที่สามารถเข้าร่วมประกอบกับไลโปโซมได้ ในงานวิจัยนี้จึงดัดแปลงโคโตซาน โดยเริ่มจากการเตรียม N,O-oleoyl chitosan แล้วทำ quantization ให้เป็นประจุบวกถาวรและเพิ่มค่าการละลายน้ำ โดยการเติมหมู่ glycidyltrimethyl ammonium chloride ได้เป็น quaternized N,O-oleoyl chitosan (QCS) ซึ่งมี degree of quaternization (DQ) เท่ากับ 27%

การเตรียม lip และ lip-QCS และการตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ

ละลาย lecithin 10 มิลลิโมลาร์ PE-PEG 1% โดยน้ำหนัก โดยน้ำหนัก ในสารละลาย diethyl ether 10 มิลลิตร ใน flask ก้นกลม ให้เป็นเนื้อเดียว ระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่ความเร็ว 90-150 รอบต่อนาที ในสภาวะที่มีก๊าซไนโตรเจนผ่าน ที่อัตรา 50-100 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร

25 องศาเซลเซียส จนกระทั่งหมด จะได้เป็นฟิล์มไขมันบาง เรียบ และใส เกาะที่ผิวของขวดกันกลม ทำแผ่นฟิล์มให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dryer ใช้เวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมง ละลายแผ่นฟิล์มด้วยสารละลาย PBS pH 7.4 10 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องบ่มเขย่า (incubator shaker) จนกระทั่งฟิล์มละลายหมด ประมาณ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องหรือ 4 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 3 ชั่วโมงเพื่อให้สารละลายไลโปโซมคงตัว ลดขนาดของไลโปโซม ด้วยเครื่อง extruder ผ่าน poly carbonate membrane ขนาด 200 นาโนเมตร รอให้ไลโปโซมคงตัวด้วยการตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องหรือ 4 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 3 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้ทำการทดลองต่อไป

การเตรียม lip-QCS องค์ประกอบแล้ววิธีการเป็นเช่นเดียวกับ lip โดยจะใส่ QCS ในขั้นตอนเตรียมฟิล์มที่ 2.0 % โดยน้ำหนัก ได้เป็น lip-2.0%QCS

การทดสอบความเป็นพิษของ lip-QCS

เตรียมเซลล์ SiHa ใน 96 well plate โดยใช้เซลล์ปริมาณ 8,000 เซลล์ต่อหลุม บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนเซลล์เพิ่มจำนวนประมาณ 80% confluence เตรียมทดสอบความเป็นพิษของอนุภาคไลโปโซม (Lip) และ Lip-QCS เจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ ใส่สารที่เตรียมได้ในปริมาตร 10 ไมโครลิตร ต่อ 1 หลุม บ่มต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างเซลล์ด้วย sodium phosphate buffer ที่ pH 7.4 จากนั้นดูดออก แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีผสม 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]- 2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตรต่อ 1 หลุม บ่มไว้ 4 ชั่วโมง ดูดสารละลายออกแล้วเติม dimethyl sulfoxide ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อ 1 หลุม วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader (Molecular Devices SpectraMax M2, CA, USA) ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เพื่อหาค่า % cell survival ดังสมการ

$$\%cell\ survival = \frac{Absorbance_{550}\ of\ sample \times 100}{Absorbance_{550}\ of\ control}$$

การทดสอบการเกาะติดเยื่อเมือกโดยการใช้อนุภาค mucin

ความสามารถในการเกาะติดเยื่อเมือกสามารถทดสอบแบบ *in vitro* ได้ด้วยการตรวจการจับกันของ Lip-QCS กับอนุภาค mucin โดยใช้ mucin type III ซึ่งสกัดจากกระเพาะหมูเตรียมเป็นอนุภาคเพื่อทำการทดสอบตามวิธีการ (Takeuchi et. al., 2005) ดังนี้ ละลาย mucin 1 % ใน Tris buffer pH 6.8 เป็นเวลาข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 °C จากนั้นลดขนาดของสารแขวนลอยที่ได้ด้วย ultrasonication จนกระทั่งได้อนุภาคขนาด 200-300 nm บั่นเก็บอนุภาคที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ผสมอนุภาค mucin 1 % กับ Lip และ Lip-QCS โดยกำหนดปริมาณของ mucin คงที่เป็น 1 ส่วน และผสมกับอนุภาคที่ทดสอบให้อยู่ในช่วง 0.025-0.2 ส่วน ตรวจตามการเปลี่ยนแปลงของขนาดและประจุของอนุภาคที่ได้ด้วย dynamic light scattering (DLS)

การตรวจสอบความสามารถในการเข้าเซลล์ของ lip-QCS

การเข้าเซลล์สามารถตรวจสอบได้เชิงปริมาณด้วย flow cytometry โดยเตรียมเซลล์ SiHa ใน 6 well plate ใช้เซลล์ปริมาณ 10,000 เซลล์ต่อหลุม บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง อนุภาค Lip และ Lip-QCS ที่ติดสีด้วยสารเรืองแสงสีแดง (dil dye) ในอัตราส่วน 1:1000 โดยน้ำหนักของฟอสโฟลิปิดร่วมกับเซลล์ SiHa ในอาหารที่ไม่มี serum เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำตัวอย่างละ 5 ซ้ำ ดูอาหารที่มีส่วนประกอบของอนุภาคทั้ง ล้างเซลล์ด้วย PBS pH 7.4 จากนั้นเก็บเซลล์แขวนลอยไปวัดการเข้าเซลล์ของอนุภาคด้วยเครื่อง Flow cytometry เตรียมตัวอย่างกลุ่มควบคุมเป็นเซลล์ SiHa ที่ไม่ได้บ่มด้วยอนุภาค เพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบในหาอัตราการเข้าเซลล์ของอนุภาค

การเตรียมไลโปโซมบรรจุ cisplatin

ละลาย cisplatin 60 mg (0.02 mmol) ในสารละลาย silver nitrate solution (66.2 mg/1 mL, 0.39 mmol) นำสารละลายที่ได้บ่มที่ 60 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง กวนต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นกำจัดตะกอน silver nitrate ด้วยการปั่นตก 16,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที กรองด้วยตัวกรองขนาด 0.2 μm ได้สารละลาย cisplatin นำมาบรรจุใน liposome ที่เตรียมด้วยวิธีดังบรรยายข้างต้น โดยจะใส่ภายหลังการเตรียม thin film แล้ว rehydrated ด้วยการเติม phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 และสารละลาย cisplatin (100 μg of cisplatin/1 mg of lipid) เขย่าเพื่อให้เกิดการละลายและการสร้างไลโปโซม อนุภาคที่ได้ถูกลดขนาดด้วย discontinuous extruder Liposo-Fast™-10 (Avestin Inc, Ottawa, Canada) ซึ่งมี polypropylene membrane ขนาด 200 nm เป็นตัวกรองคัดขนาด โดยทำการ extrude จำนวน 15-20 รอบ ได้เป็น Lip-QCS ปั่นตกด้วย ultracentrifugation (Optima L-100 XP Ultracentrifugation Beckman Coulter; California, USA) ที่ความเร็ว 80,000 รอบต่อนาที 25 °C เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง แขนงลอยตะกอนที่ด้วย PBS ได้ Lip-QCS บรรจุ cisplatin (lip-QCS-cisplatin)

ปริมาณของ cisplatin ที่บรรจุใน liposome วัดได้ด้วย Atomic Absorption Spectrometer (AAS; Perkin Elmer model PinAAcle 900F, MA, USA) ซึ่งตรวจตามจากปริมาณของ platinum ซึ่งเป็นองค์ประกอบในโมเลกุล cisplatin

การวัดปริมาณ cisplatin

เตรียมตัวอย่าง cisplatin โดยละลาย cisplatin ด้วยน้ำปราศจากไอออนที่ความเข้มข้น 50.0, 25.0, 12.5, 6.3, 3.1 และ 1.6 $\mu\text{g/mL}$ เพื่อใช้ในการเตรียมกราฟมาตรฐานของ cisplatin (standard curve) และเตรียมตัวอย่าง liposome ที่ต้องการวัดปริมาณ cisplatin โดยการเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออนที่ 1:10 จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้วัดปริมาณ cisplatin ด้วยเครื่อง atomic absorption spectroscopy โดยเมื่อตัวอย่างสารละลายถูกส่งผ่านเข้าสู่เปลวไฟ ทำให้เกิดกระบวนการแตกตัวของโมเลกุล โดยไอออนของโลหะจะแตกตัวอยู่ในรูปของออกไซด์ ซึ่งจะทำให้อิเล็กตรอนของธาตุเกิดการเปลี่ยนแปลงระดับพลังงานจากสถานะพื้น

(Ground stage) ไปสู่สภาวะกระตุ้น (Excited stage) โดยอาศัยการดูดกลืนแสง (Absorption) ที่ความยาวคลื่นที่เฉพาะเจาะจง ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของธาตุ เมื่อนำค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของแสงมาคำนวณผลกับค่าความเข้มข้นสุดท้ายหลังจากการดูดกลืนแสงจะได้ “ค่าการดูดกลืน (Absorbance, A)” ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของธาตุที่อยู่ในสารละลายตัวอย่าง

เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานโดยเทียบกับค่าความเข้มข้นของสารละลายที่ทราบความเข้มข้น (Standard solution) จะได้สมการที่ได้จากกราฟของสารละลายมาตรฐาน ก็จะสามารถวิเคราะห์หาปริมาณโลหะในสารละลายตัวอย่างได้โดยเทียบจากค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้

การเตรียม 3D cancer model เพื่อตรวจสอบอัตราการรอดชีวิตและการชักนำ apoptosis

เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของระบบในการรักษามะเร็งปากมดลูก จึงทดสอบการยับยั้งเซลล์มะเร็งใน 3D cancer model เตรียมเซลล์ SiHa 2×10^3 เซลล์ต่อหลุม เลี้ยงในจานอาหารที่มีคุณสมบัติ ultra-low attachment เป็นเวลา 4 วัน จนกระทั่งได้ tumor spheroid ขนาดประมาณ $203 \pm 6 \mu\text{m}$ ก่อนเซลล์มะเร็งที่ได้จะถูกบ่มกับตัวอย่างดังนี้คือ free cisplatin, Lip, Lip-QCS, Lip-QCS-cisplatin โดยศึกษาที่ความเข้มข้นของ cisplatin เท่ากับ 0, 6.25, 12.5, 25, 50, และ $100 \mu\text{g/ml}$ ตรวจสอบขนาดและลักษณะของก้อนเซลล์เมื่อเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 3 วัน ตรวจวัดความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและวัดการเกิด apoptosis ด้วย CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability assay (Promega, WI, USA) ซึ่งวัดทั้งอัตราการรอดของเซลล์

เรื่องที่ 2 ระบบนำส่งยาแบบมุ่งเป้า PLGA-liposome บรรจุ cisplatin เพื่อการรักษามะเร็งปากมดลูก

การเตรียม PLGA และ PLGA-Liposome บรรจุ cisplatin

การกักเก็บยา cisplatin ในอนุภาค PLGA (50:50) เตรียมโดยเทคนิค double emulsion solvent evaporation (W1/O/W2) โดยการเตรียมสารละลาย cisplatin เริ่มต้นที่ 1 mg/ml ในสารละลาย PVA เพื่อเป็นส่วนของ Aqueous phase (W1) จากนั้นนำ W1 ที่ละลายเข้ากันแล้วหยดลงในสารละลาย PLGA ใน dichloromethane (O) ที่ความเข้มข้น 5% โดยน้ำหนัก ภายใต้แรงสั่นสะเทือนที่ 40% เป็นระยะเวลา 3 นาที จะได้เป็น W1/O emulsion จากนั้นนำ cisplatin ที่อยู่ใน W1/O emulsion มาหยดในสารละลาย 2%PVA (W2) ด้วยเครื่อง Ultrasonic probe ภายใต้แรงสั่นสะเทือนที่ 40% เป็นระยะเวลา 3 นาที เพื่อให้เกิดการ form ตัวของอนุภาค PLGA โดย cisplatin จะถูกบรรจุอยู่ในอนุภาค PLGA ในรูปของ W1/O/W2 นำ emulsion ที่ได้นี้ตั้งป่นทิ้งไว้เป็นเวลา 3 ชั่วโมงเพื่อระเหย solvent ออกให้หมด จากนั้นนำอนุภาคที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนและล้างอนุภาคด้วยน้ำกลั่น ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่สภาวะ 25°C ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นระยะเวลา 30 นาที โดยทำการล้างปั่นอนุภาคเป็นจำนวน 3 รอบ จะได้เป็นอนุภาค PLGA-cisplatin

อนุภาค PLGA-cisplatin นี้ จะได้นำไปเคลือบผิวด้วย phospholipid ด้วยกระบวนการเตรียม liposome ดังที่ได้กล่าวข้างต้น

การติด Ligand ชนิด Anti-VEGF บนฟอสโฟไลปิด

- การติดแอนติบอดีบนไลโปโซม

เริ่มต้นโดยการติด linker กับแอนติบอดี โดยค่อย ๆ ผสม 2-Iminrothiolane ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรลงในแอนติบอดีความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลาย PBS pH 7.4 กวนสารผสมที่ความเร็ว 80 รอบต่อนาที เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง ค่อย ๆ เติมสารผสมลงในไลโปโซมที่เตรียมไว้ ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร โคนกวนสารตลอดเวลาขณะเติมที่ความเร็วประมาณ 80 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 หรือ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แยกแอนติบอดีที่ไม่ติดกับไลโปโซม ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 80,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จำนวน 2 รอบ ละลายตะกอนด้วยสารละลาย PBS ตั้งทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง ก่อนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน และแอนติบอดี

- การวัดปริมาณฟอสโฟลิปิดและการประเมินผลการติด Anti-VEGF บนผิวของไลโปโซม

หาปริมาณฟอสโฟลิปิดเพื่อควบคุมปริมาณเริ่มต้นของไลโปโซมสำหรับการติด Anti-VEGF ในขั้นตอนต่อไป โดยการหาจะใช้ Phospholipids C test (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) เพื่อหาปริมาณฟอสโฟลิปิดหลังการเตรียมเป็นไลโปโซม เริ่มจากการละลาย color reagent ด้วย PBS อัตราส่วน 1:1 ขวด เตรียมกราฟมาตรฐานจากสารละลายมาตรฐานของชุดตรวจสอบ จากนั้นใส่สารละลายทดสอบ 3 มิลลิลิตรต่อสารละลายตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร เขย่า บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 5 นาที วัดสีที่ความยาวคลื่นที่ 700 นาโนเมตร สร้างกราฟมาตรฐานและหาค่าเทียบจากกราฟ

ประเมินผลการติด Anti-VEGF บนผิวไลโปโซม ทำด้วยการวัดปริมาณโปรตีนโดยใช้ Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific Pierce, Rockford, USA) เตรียม reagent โดยผสม reagent A 1 ส่วนต่อ reagent B 50 ส่วน เตรียมกราฟมาตรฐานจากสารละลายมาตรฐานของชุดตรวจสอบ เติมสารละลาย reagent 200 ไมโครลิตรในสารละลายตัวอย่าง 25 ไมโครลิตร ใน 96 well plate เขย่า 30 วินาที บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที วัดสีที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร สร้างกราฟมาตรฐานและหาค่าเทียบจากกราฟ นำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายไลโปโซมที่ติดแอนติบอดีหักออกจากค่าดูดกลืนแสงของสารละลายไลโปโซมที่ไม่มีแอนติบอดี เพื่อหาค่าปริมาณโปรตีน

การทดสอบการเข้าเซลล์อย่างจำเพาะของอนุภาคด้วย confocal laser scanning microscopy

เตรียมอนุภาคโดยย้อมสารเรืองแสงสีแดง dill dye ที่อัตราส่วน 1:500 โดยน้ำหนักของฟอสโฟลิปิด ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลาข้ามคืนก่อนทดสอบ เลี้ยงเซลล์ SiHa ปริมาณ 2×10^4 เซลล์ต่อหลุม 500 ไมโครลิตรลงบน cover slide เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS 1 รอบ ผสมอนุภาคที่ย้อมสีแล้ว ละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี FBS และใส่ลงในหลุมที่มีเซลล์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO₂ เป็นเวลา 0.5, 1, 2 และ 4 ชั่วโมง เมื่อถึงเวลาที่กำหนด ดูอาหารเลี้ยงเซลล์ออก

จากนั้นล้างเซลล์ด้วย PBS 2 รอบ ตรึงเซลล์ด้วย 70% เอทานอลเย็น 2 มิลลิลิตร 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ 1 มิลลิลิตรแทนที่ 70% เอทานอล เจือจางสีย้อม Hoechst 33258 ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำสีที่เจือจาง 40 ไมโครลิตรเติมลงในเซลล์ จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์อีก 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการหมุนเพลาเป็นวงกลม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที แล้วล้างด้วย PBS 3-4 รอบ นำ cover slide ไปประกบกับ slide เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการเข้าเซลล์ด้วยเครื่อง confocal laser scanning microscopy (CLSM) (OLYMPUS FV1000) ที่กำลังขยาย 60 เท่า

การทดสอบความเป็นพิษของ PLGA-lip-cisplatin

เลี้ยงเซลล์ SiHa จำนวน 8,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมงให้เซลล์เพิ่มจำนวนสำหรับการทดสอบด้วยวิธี MTT โดยบ่ม PLGA-lip-cisplatin ที่ความเข้มข้นของ cisplatin ดังนี้ 0.10, 1.95, 3.90, 7.81, 15.62, 31.25, 62.50, 125 และ 250 บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อการทดสอบการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งซึ่งเป็นผลมาจากระบบนำส่งยา ด้วยการทดสอบกับน้ำยา MTT

การทดสอบประสิทธิภาพ PLGA-lip-cisplatin ในหนูทดลอง

ในการศึกษานี้ได้ทดลองกับ หนู Nude (BALB/cMlac-nu) เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์ สายพันธุ์จาก Central Institute of Experimental Animal; CIEA Japan ทางผู้ศึกษาได้ทำการสั่งซื้อจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล และทุกการทดลองที่ทำกับสัตว์ทดลองได้ผ่านการพิจารณาจรรยาบรรณการวิจัยในสัตว์จากมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์(013/2557) โดยปฏิบัติตามกฎกระทรวง ระเบียบ ประกาศตามที่กำหนดใน พ.ร.บ.สัตว์เพื่อนงานทางวิทยาศาสตร์ พ.ศ.2558 อย่างเคร่งครัด

ผู้ศึกษาได้ทดลองและเลี้ยงหนูทดลองในห้องปลอดเชื้อที่ ศูนย์สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ และปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูก (SiHa) จำนวน 5,000,000 เซลล์/ตัว ลงบนด้านหลังของหนูทดลองโดยการฉีด subcutaneous หลังจากนั้นเลี้ยงหนูทดลองต่อในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อให้ก้อนมะเร็งโตประมาณ 2-5 cm (ภาพที่ 2) แบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 3 กลุ่มกลุ่มละ 6 ตัวเพื่อทำการนำส่งยาไปยังบริเวณเป้าหมายดังนี้

กลุ่มที่ 1 ฉีดด้วย PLGA-lip-cisplatin + anti-VEGF (targeted) ทาง tail vein ปริมาตร 200 μ l ที่ความเข้มข้น 2.4 mg/ml

กลุ่มที่ 2 ฉีดด้วย PLGA-liposome ที่มีโมโนเลกุลเป้าหมายทาง tail vein (non-targeted) ปริมาตร 200 μ l ที่ความเข้มข้น 2.4 mg/ml

กลุ่มที่ 3 ฉีดด้วย น้ำกลั่น (control) ทาง tail vein ปริมาตร 200 μ l

ทุกกลุ่มทำการฉีดซ้ำอีกครั้งในวันที่สามและหลังฉีดจากครั้งแรกเจ็ดวัน ให้นำหนูทดลองดมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เปิดช่องท้อง และเก็บตัวอย่างอวัยวะต่าง ๆ เพื่อตรวจการสะสมของตัวนำส่งยาเปรียบเทียบกับก่อนมะเร็งต่อไป ปริมาณการสะสมของตัวนำส่งยาในอวัยวะต่างๆ สามารถวิเคราะห์โดยใช้ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซน ด้วยเครื่อง *in vivo* bioluminescence imaging system ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มด้วยวิธี One-Way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %



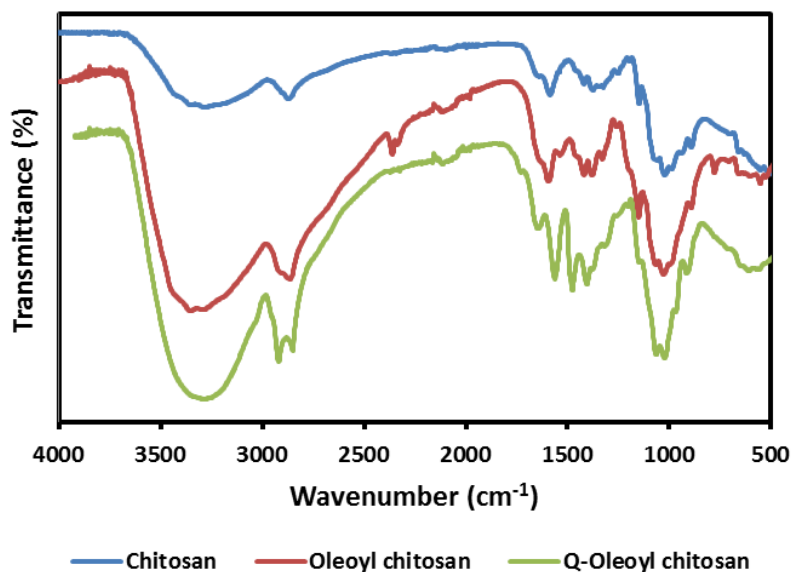
ภาพที่ 2 ก่อนมะเร็งหลังจากการปลูกถ่ายบนหลังหนูทดลองเป็นเวลาสองสัปดาห์ และสภาพห้องปลอดเชื้อที่ใช้ทำการเลี้ยงหนูทดลองและทำการทดลองในศูนย์สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ผลการทดลอง

เรื่องที่ 1 ระบบนำส่ง chitosan-conjugated liposome บรรจุยา cisplatin เพื่อการรักษามะเร็งปากมดลูก

การสังเคราะห์ quaternized N,O-oleoyl chitosan (QCS)

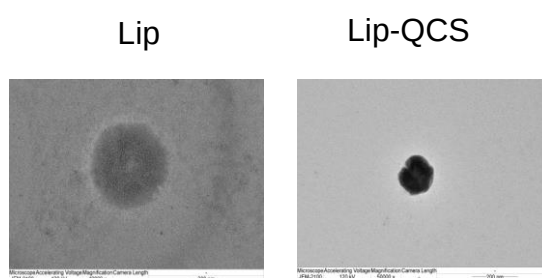
การสังเคราะห์ QCS ทำได้โดยเตรียม chitosan ให้เป็น N,O-oleoyl chitosan (OCS) ก่อน จากนั้นจึงทำ quaternization พอลิเมอร์ที่เตรียมได้แล้วนำมาวิเคราะห์ ATFT-IR spectra เปรียบเทียบระหว่าง chitosan (CS) , N,O-oleoyl chitosan (OCS) และ quaternized N,O-oleoyl chitosan (QCS) (ภาพที่ 3) ผลการทดลองพบพิกที่แสดงคุณลักษณะจำเพาะของ CS, OCS และ QCS โดยสำหรับ CS พบพิกที่ค่าการดูดกลืนแสงในช่วงคลื่น 1149 , 1057 and 1022 cm^{-1} ซึ่งเป็น C–O–C และ C–O stretching ในขณะที่ ATR-FTIR pattern ของ N,O-oleoyl chitosan พบค่าการดูดกลืนแสงที่ 2924 , 2854 , 1464 and 1182 cm^{-1} ซึ่งเป็นตำแหน่งของ –CH₂– group และที่ 777 cm^{-1} เนื่องจาก =C–H bending ของ oleoyl group และ quaternized N,O-oleoyl chitosan พบพิกที่ 1477 cm^{-1} จาก C–H stretching ของ methyl substituent of quaternary ammonium group



ภาพที่ 3 ATR-FTIR pattern ของ Chitosan, Oleoyl chitosan (OCS) และ Q-Oleoyl chitosan (QCS)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไลโปโซม

QCS ที่สังเคราะห์ได้นำมาใช้ในการดัดแปรผิวของไลโปโซมที่เตรียมให้เป็นประจุบวกด้วยการเติม QCS ในขั้นตอนการเตรียมฟิล์มของไลโปโซม ได้เป็น Lip-QCS ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและขนาดภายใต้กล้อง TEM โดยเทียบไลโปโซม (Lip) และไลโปโซมที่ผสม QCS (Lip-QCS) ภาพจาก TEM (ภาพที่ 4) แสดงให้เห็นว่าไลโปโซมทั้งสองชนิดที่เตรียมได้มีลักษณะกลม และมีการกระจายของขนาดสม่ำเสมอ นอกจากนี้ยังพบว่าภาพของไลโปโซมที่มี QCS มีการหดตัวเล็กน้อย ซึ่งน่าจะเป็นจากการเตรียมตัวอย่างซึ่งต้องมีการทำแห้ง และ QCS เป็นพอลิเมอร์จึงเกิดการหดตัว อย่างไรก็ตามผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าไลโปโซมที่เตรียมได้มีรูปแบบและขนาดเหมาะสมสำหรับการทดลองต่อไป



ภาพที่ 4 ภาพถ่าย TEM ของไลโปโซม (Lip) และ ไลโปโซมประจุบวก Lip-QCS

ลักษณะทางกายภาพเคมีของไลโปโซม

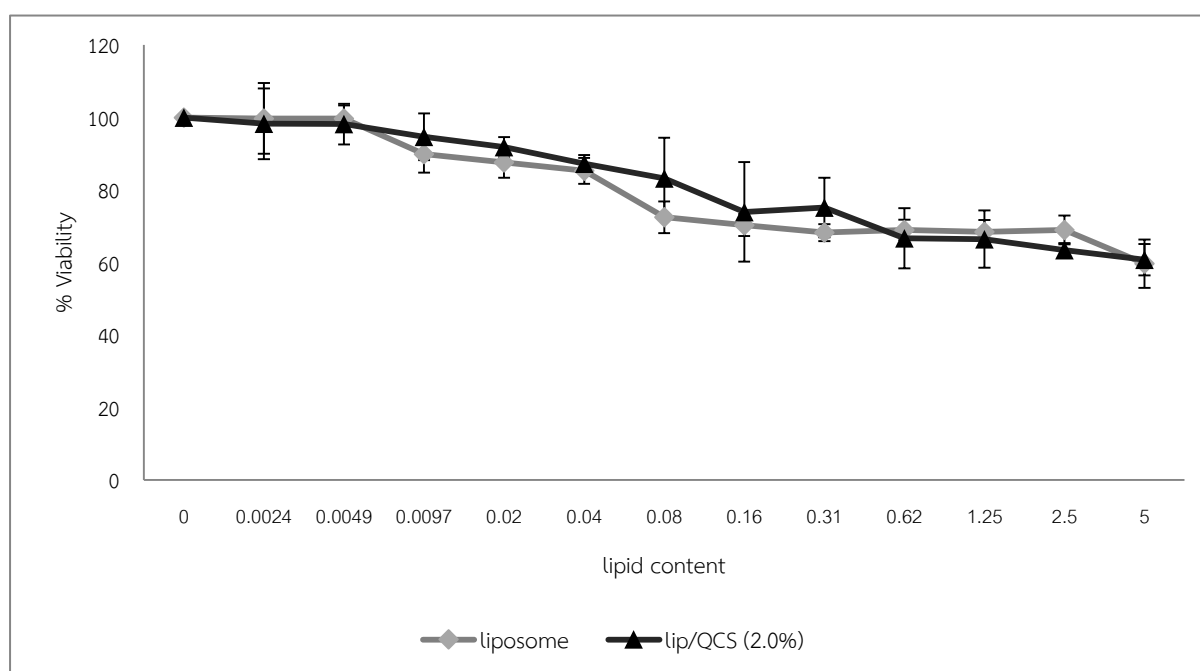
ลักษณะทางเคมีกายภาพของ liposome วิเคราะห์ได้โดยการหาค่าขนาดและประจุของอนุภาคด้วย DLS ผลการวิเคราะห์โดยวัดตัวอย่าง Lip, Lip-QCS และ Lip-QCS-cisplatin พบว่าอนุภาคที่ได้มีขนาดในช่วง 140-165 nm การใส่ QCS และ cisplatin ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของขนาด และอนุภาคทุกชนิดมีความสม่ำเสมอและมีค่าการกระจายตัวช่วงแคบคืออนุภาคส่วนใหญ่มีขนาดไม่เกิน 0.2 nm ค่าประจุที่ผิวของ Lip มีค่าติดลบที่ -7.3 ± 0.5 mV และมีประจุเป็นบวกมากขึ้นจากการเติม QCS 11.7 ± 0.7 mV ซึ่งจะช่วยให้เพิ่มโอกาสในการสัมผัสกันของอนุภาคและผิวเซลล์มากขึ้นด้วยแรงทางประจุ อย่างไรก็ตามเมื่อเป็น Lip-QCS-cisplatin ประจุกลับมีค่าเป็น 0.6 ± 0.0 mV เนื่องจาก cisplatin มีผลต่อค่าประจุของอนุภาค อย่างไรก็ตามการเติม QCS ถือเป็นการปรับค่าประจุขึ้นเพื่อช่วยให้เซลล์และอนุภาคมีแนวโน้มเข้าใกล้กันได้มากขึ้นเพื่อเพิ่มความสามารถในการเข้าเซลล์ของอนุภาค

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ขนาดและประจุของไลโปโซม ด้วย hydrodynamic light scattering

ตัวอย่าง	ขนาด (nm)	PDI	Zeta potential (mV)
Lip	141.7 ± 1.7	0.1 ± 0.0	-7.3 ± 0.5
Lip-QCS	171.5 ± 0.8	0.1 ± 0.0	11.7 ± 0.7
Lip-QCS-cisplatin	164.6 ± 1.0	0.2 ± 0.0	0.6 ± 0.0

การศึกษาความเป็นพิษของ lip และ lip-2%QCS

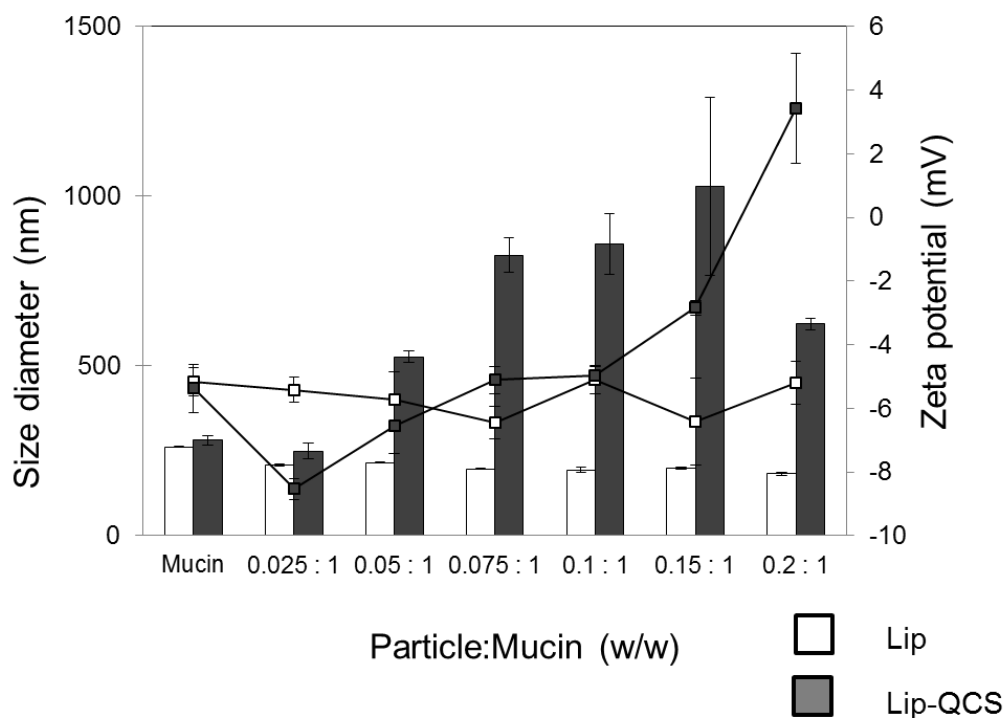
เพื่อตรวจสอบว่าการเติม QCS ไม่มีผลต่อความพิษของไลโปโซม MTT assay เพื่อเปรียบเทียบระหว่าง Lip-QCS และ Lip โดยได้ควบคุมให้ปริมาณฟอสโฟลิปิดของจากไลโปโซมทั้ง 2 ชนิดมีค่าเท่าความเข้มข้นเท่ากัน ทำ serial dilution ให้ค่าความเข้มข้นเป็น 0, 0.0024, 0.0049, 0.0097, 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.31, 0.62, 1.25, 2.50 และ 5.00 mg/ml เพื่อบ่มกับเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าการเติม QCS ไม่ได้มีผลเหนี่ยวนำให้เซลล์เป็นพิษมากขึ้น โดยระดับการยับยั้งเซลล์ของทั้ง Lip และ Lip-QCS มีความใกล้เคียงกัน โดยปริมาณฟอสโฟลิปิดที่ทำให้เซลล์อยู่รอดในระดับ 80 % คือ 0.08 mg/ml และหากเพิ่มจนถึง 5.00 mg/ml เซลล์ยังมีอัตราการรอดสูงกว่า 50 % (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 อัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก เมื่อบ่มด้วย lip และ lip-QCS

การทดสอบการเกาะติดเยื่อเมือก

นอกจากการเติม QCS มีผลทำให้ Lip-QCS มีค่าประจุเป็นบวกขึ้นแล้วยังมีผลให้อนุภาคมีคุณสมบัติเกาะติดเยื่อ mucous ได้มากขึ้นเนื่องจากคุณสมบัติของ chitosan ดังนั้นจึงได้ทดสอบคุณสมบัติดังกล่าวด้วยวิธี sub-micron mucin test ด้วยการผสมตัวอย่าง Lip-QCS ที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กับอนุภาค mucin ซึ่งหากเกิดการจับของอนุภาคและ mucin จะได้ complex ที่มีขนาดใหญ่และค่าประจุของ complex จะเปลี่ยนไปเมื่อเทียบกับ mucin โดยพบว่าการเพิ่มขึ้นของที่ขนาดและประจุจะแปรผันตรงกับ ความเข้มข้นของ QCS ที่เติมเพื่อทดสอบ (ภาพที่ 6) จึงสรุปได้ว่า Lip-QCS มีคุณสมบัติเกาะติดเยื่อเมือก ในการทดลองนี้ได้ใช้ Lip เป็นตัวอย่างควบคุมเพื่อเปรียบเทียบพบว่า Lip ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของทั้งขนาดและประจุ ซึ่งแสดงว่า Lip ไม่เกาะติดเยื่อเมือก ดังนั้นการเติม QCS จึงมีผลทั้งเพิ่มค่าประจุและความสามารถในการเกาะติดเยื่อเมือกของอนุภาคไลโปโซม



ภาพที่ 6 ขนาดและประจุของ mucin, mucin-Lip และ mucin-Lip-QCS complex

การตรวจสอบความสามารถในการเข้าเซลล์ของ lip-QCS

เพื่อตรวจสอบความสามารถในการเข้าสู่เซลล์ของไลโปโซม Lip และ Lip-QCS ซึ่งถูกย้อมด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ นำมาบ่มร่วมกับเซลล์มะเร็งปากมดลูก SiHa โดยควบคุมให้ปริมาณลิปิดในไลโปโซมทั้ง 2 ชนิดเท่ากันที่ 2.5 mg/ml และบ่มอนุภาคร่วมกับเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงวิเคราะห์ด้วย flow cytometry

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์การเข้าเซลล์ของอนุภาคไลโปโซม

ตัวอย่าง	% internalization
SiHa cell control	2.7
SiHa+Lip	76.6
SiHa+Lip-QCS	89.6

ผลการทดลอง (ตารางที่ 2) พบว่า Lip มีความสามารถในการเข้าเซลล์ได้ 76.58% แต่เมื่อดัดแปลงประจุให้เป็นบวก Lip-QCS เข้าเซลล์ได้สูงขึ้น คือเข้าได้ 89.6% ณ เวลาบ่มที่ 2 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าไลโปโซมประจุบวกมีความสามารถในการเข้าเซลล์ได้ดี ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการลด ionic repulsion ระหว่างอนุภาคซึ่ง

เป็นบวกและผนังเซลล์ซึ่งมีประจุเป็นลบ ยืนยันถึงผลประจุที่ผิวของอนุภาคที่มีผลต่อการเข้าเซลล์ โดยการเพิ่มประจุของอนุภาคให้เป็นบวกจะช่วยเพิ่ม attractive force ระหว่างอนุภาคและผนังเซลล์

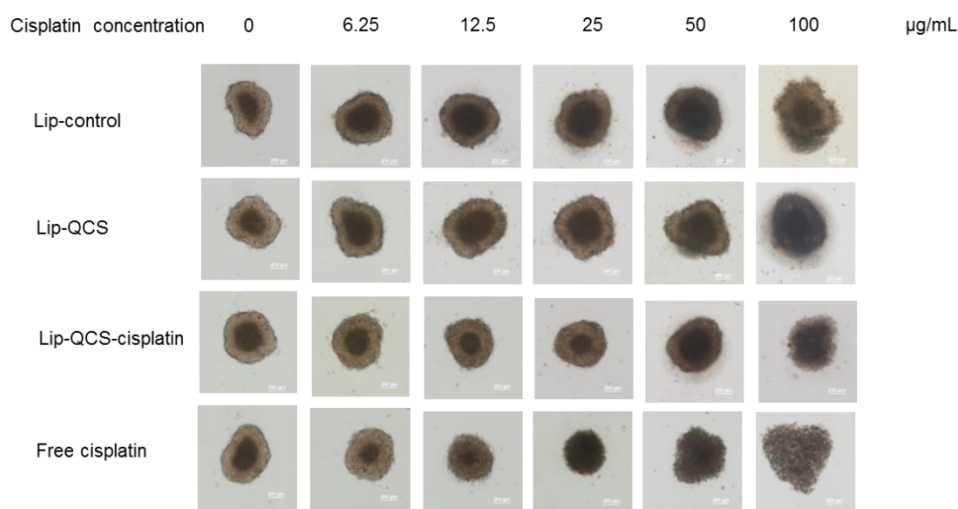
การเตรียมไลโปโซมบรรจุ cisplatin และการทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดเซลล์มะเร็งในเซลล์เพาะเลี้ยง

เพื่อทดสอบหน้าที่ของ Lip-QCS ในการเป็นตัวพา cisplatin สำหรับการบำบัดมะเร็งปากมดลูกนั้น การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์จึงจำเป็น โดยในการทดลองได้ตรวจสอบปริมาณ cisplatin ที่บรรจุใน Lip-QCS ด้วยการวัดปริมาณ cisplatin ใน AAS พบว่าจากปริมาณ lipid เริ่มต้น 104 $\mu\text{g}/\text{mg}$ สามารถบรรจุ cisplatin ได้ 29 $\mu\text{g}/\text{mg}$ คิดเป็น 28 % loading efficiency ซึ่งถือว่ายังเป็นปริมาณที่อย่างน้อย โดยสันนิษฐานได้ว่าเนื่องจาก cisplatin มีความเป็น hydrophobicity สูง ทำให้ตัวยาส่วนใหญ่ถูกผลักออกจาก hydrophilic core ของไลโปโซม และแทรกอยู่ใน hydrophobic surface ซึ่งเป็นส่วนของ lipid bilayer ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับ Huo T et al., 2012 ซึ่งได้เตรียมไลโปโซมบรรจุ cisplatin และพบว่ามี Pt-loading efficiency เป็น 25% แต่มีประสิทธิภาพพอเพียงในการรักษา

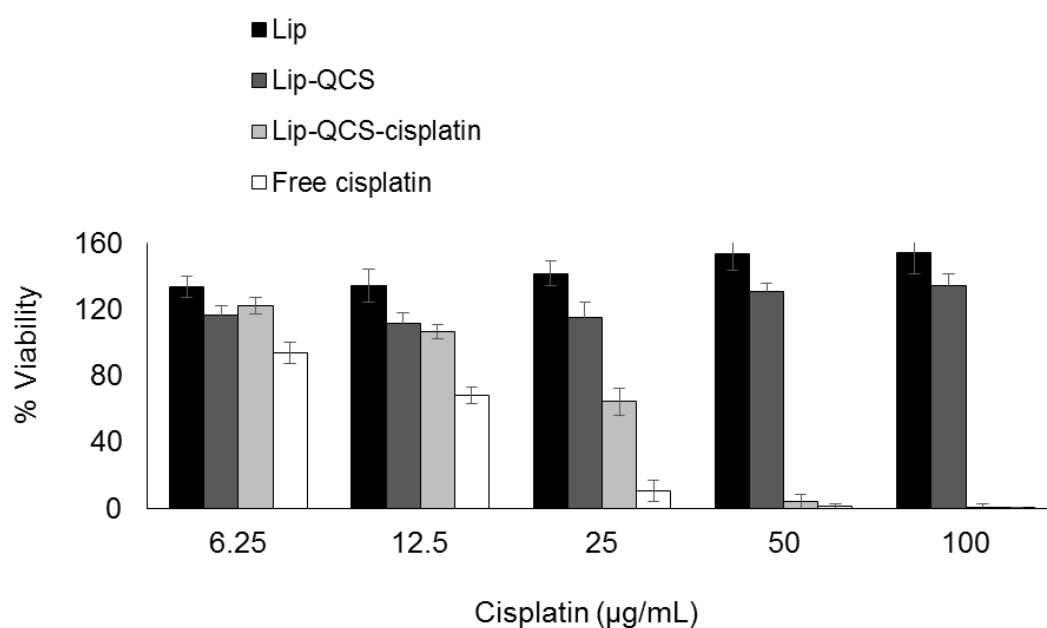
การทดสอบผลการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งใน 3D tumor model

ในการตรวจสอบประสิทธิภาพในการรักษาของ Lip-QCS บรรจุ cisplatin จึงเพาะเลี้ยงเซลล์ในรูปแบบ 3D เพื่อให้เซลล์เจริญเป็นก้อนมีรูปร่างคล้ายก้อนมะเร็ง โดยการเพาะเซลล์ 2,000 cell ในจานอาหารที่มีคุณสมบัติ ultra-low attachment ในเจริญเป็นเวลา 3 วัน เพื่อให้ได้ก้อนเซลล์มะเร็งขนาด $2.1 \pm 0.2 \times 10^7 \text{ mm}^3$ แล้วจึงบ่มกับตัวอย่าง ได้แก่ Lip, Lip-QCS, Lip-QCS-cisplatin และ free cisplatin ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 7a อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ได้รับการประเมินเชิงปริมาณด้วยการวัด MTT หลังจากการบ่มตัวอย่างกับเซลล์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เมื่อบ่มด้วย Lip-QCS-cisplatin และ free cisplatin ลดลงเป็นสัดส่วนแปรผันตรงกับความเข้มข้นของยาดังภาพที่ 6b ในขณะที่ Lip control และ Lip-QCS ซึ่งไม่บรรจุยาไม่มีผลต่อการยับยั้งเซลล์ อย่างไรก็ตาม พบว่า Lip-QCS-cisplatin ให้ผลการยับยั้งได้ต่ำกว่า free cisplatin ผลดังกล่าวนี้เกี่ยวข้องกับความแตกต่างของ bio-distribution ระหว่าง free cisplatin และ Lip-QCS-cisplatin (Newman C et al., 1999, Junior M et al., 2007) โดยผลนี้สอดคล้องกับการทดลองก่อนหน้านี้ที่ได้รายงานว่ายาทาที่บรรจุอยู่ในตัวพาจะถูกควบคุมการปลดปล่อยในขณะที่ free drug สามารถออกฤทธิ์ได้โดยตรง (Wang X et al., 2013; Ding D., et al., 2013) อย่างไรก็ตาม การกักเก็บไว้ในรูปแบบอนุภาคเป็นกลไกทำให้ยามีฤทธิ์ได้ยาวนานขึ้น การทดลองนี้ได้แสดงให้เห็นประสิทธิภาพของ Lip-QCS ในการยับยั้งการเจริญของก้อนเซลล์มะเร็ง

a)



b)

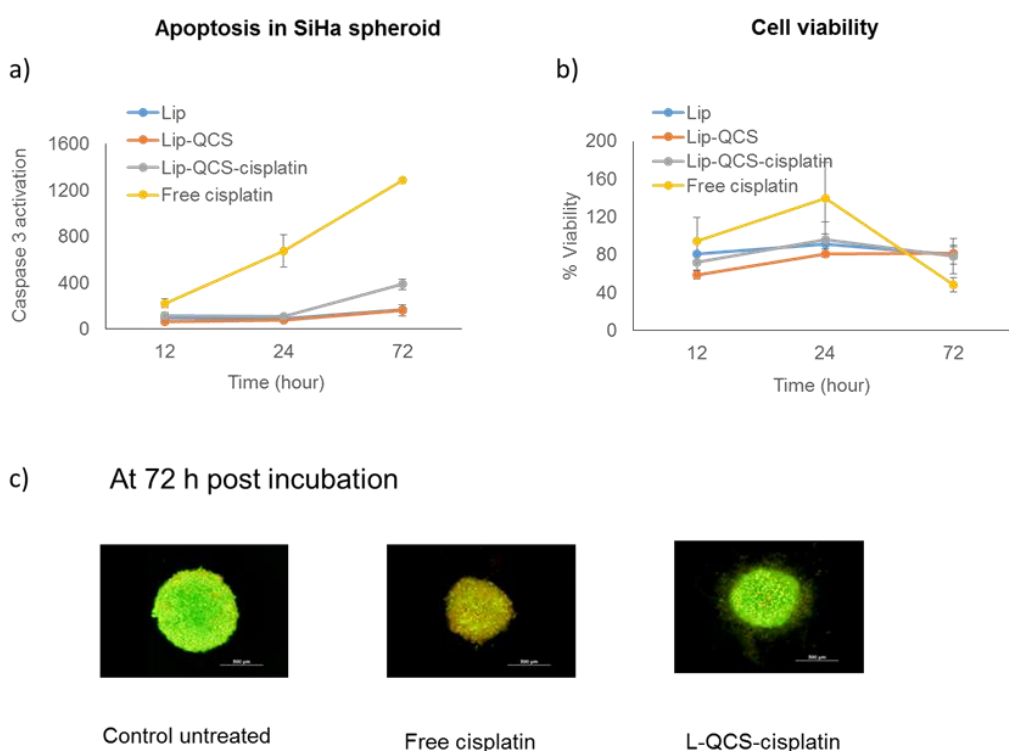


ภาพที่ 7 การทดสอบผลของยาที่มีต่อ 3D spheroid แสดงลักษณะของก้อนมะเร็งที่ได้รับผลจากยาความเข้มข้นต่าง ๆ (a) การประเมินค่าอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ (b)

การชักนำให้เกิด apoptosis ใน 3D tumor model

เนื่องจาก cisplatin มีผลต่อการชักนำให้เกิด apoptosis กับเซลล์ ดังนั้นจึงได้ทดสอบผลของ cisplatin ที่มีต่อเซลล์มะเร็งด้วยการวัด caspase-3 level ซึ่งแสดงออกจากเซลล์ที่เกิด apoptosis ในก้อนมะเร็ง โดยเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 4 วัน จนได้ขนาดเฉลี่ย $3.6 \pm 0.2 \times 10^7 \text{ mm}^3$ แล้วเติมตัวอย่างของ free cisplatin และ Lip-QCS-cisplatin โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของ cisplatin อยู่ที่ 25 µg/mL และตรวจวัด

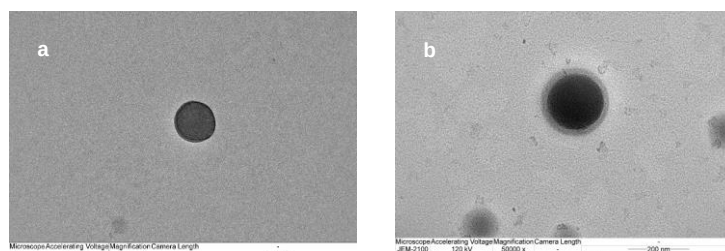
ตัวอย่างหลังจากการเลี้ยงที่เวลา 12, 24 และ 72 ชั่วโมง จากการวัดปริมาณ caspase-3 ผลการทดลองพบว่าการเกิด apoptosis แปรผันตรงกับเวลาที่บ่มตัวอย่างกับเซลล์ (ภาพที่ 7a) ซึ่งตรงข้ามกับการอยู่รอดของเซลล์ที่จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตได้ลดลงตามเวลาที่บ่มตัวอย่าง (ภาพที่ 7b) และพบว่า free cisplatin ชักนำให้เกิด apoptosis ได้ดีกว่า Lip-QCS-cisplatin ดังสังเกตได้จากปริมาณ caspase-3 ที่ผลิตในระดับสูงอันเป็นผลจากการสัมผัสโดยตรงของยาและเซลล์ การวัดอัตราการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งพบว่าทั้ง free drug และ Lip-QCS-cisplatin ซึ่งภายในเวลาศึกษา 72 ชั่วโมงนี้จะเห็นผลของความเป็นพิษจาก free cisplatin ได้เด่นชัด (ภาพที่ 7a and c) ซึ่งเป็นผลจากการที่ cisplatin ไม่ได้ถูกกักเก็บจึงมีผลก่อน และคาดว่า Lip-QCS-cisplatin จะมีผลต่อการยับยั้งในรูปแบบ slowed และ sustained release



ภาพที่ 7 การชักนำให้เกิด apoptosis เปรียบเทียบระหว่าง free cisplatin และ lip-QCS-cisplatin a) และ c) พร้อมกับการตรวจตามการรอดชีวิตของเซลล์ (b)

เรื่องที่ 2 ระบบนำส่งยาแบบมุ่งเป้า PLGA-liposome บรรจุ cisplatin เพื่อการรักษามะเร็งปากมดลูก การเตรียม PLGA และ PLGA-Liposome บรรจุ cisplatin

ลักษณะทางกายภาพของ PLGA ที่เตรียมได้วิเคราะห์ด้วย TEM พบว่าอนุภาค PLGA ที่เตรียมได้มีทรงกลม ขนาดต่ำกว่า 200 nm (ภาพที่ 8a) และเมื่อเคลือบด้วย liposome วิเคราะห์ด้วย TEM พบการเคลือบของชั้น lipid รอบผิวของอนุภาค PLGA ได้ชัดเจน (ภาพที่ 8b) เมื่อวัดด้วย AAS พบว่า PLGA สามารถกักเก็บ cisplatin ได้ 30.1%



ภาพที่ 8

ลักษณะ

ทางกายภาพของอนุภาค PLGA (a) และ PLGA เคลือบด้วยฟอสโฟลิปิด (PLGA-Lip)

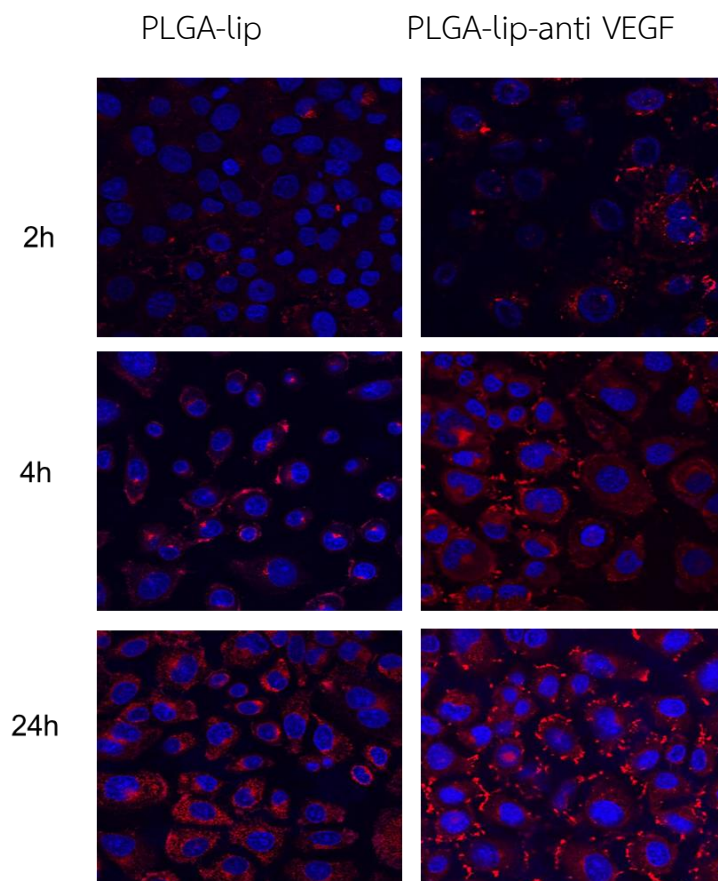
การติด Ligand ชนิด Anti-VEGF บนฟอสโฟไลปิด

ในการทดลองนี้มีเป้าหมายที่จะให้ anti-VEGF เป็น targeted moieties เพื่อการนำส่งไลโปโซมให้จำเพาะต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก ดังนั้นเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการเชื่อมแอนติบอดีดังกล่าวกับไลโปโซมและทดลองสามารถในการเข้าเซลล์ของอนุภาคเมื่อเชื่อมแอนติบอดี จึงได้ตัดแปลงพื้นผิวของไลโปโซมโดยวัดปริมาณฟอสโฟลิปิดเริ่มต้นที่ใช้ก่อนติดและหลังติด พบว่าจากไลโปโซมตั้งต้นที่เตรียมได้ซึ่งมีความเข้มข้นของฟอสโฟลิปิดเท่ากับ 6-7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 9-10 มิลลิโมลาร์นั้น เมื่อติด anti-VEGF แล้ว มีความเข้มข้นของฟอสโฟลิปิดได้ลดลงเหลือ 3-3.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็นประมาณ 50 % ซึ่งหมายความว่าได้มีการสูญเสียปริมาณอนุภาคไลโปโซมไปครึ่งหนึ่ง ในระหว่างกระบวนการติดแอนติบอดี

การประเมินผลการติด anti-VEGF เพื่อควบคุมคุณภาพของไลโปโซมที่ใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไปจากการใช้ Micro BCA Protein Assay Kit เพื่อวัดค่าโปรตีนโดยควบคุมให้ปริมาณฟอสโฟลิปิดของตัวอย่างก่อนและหลังการติด anti-VEGF มีค่าเท่ากัน พบว่าเมื่อใช้แอนติบอดีความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ไลโปโซมที่ติดแอนติบอดี มีค่าการดูดกลืนแสงมากกว่าไลโปโซมที่ไม่มีแอนติบอดี แสดงให้เห็นว่าสามารถติดแอนติบอดีบนไลโปโซมได้ โดยความเข้มข้นของโปรตีนที่วัดได้ลดลงประมาณครึ่งหนึ่งจากปริมาณตั้งต้นที่ใช้ อนึ่ง การดูดกลืนแสงของไลโปโซมมีผลต่อการวัดปริมาณโปรตีน ดังนั้นในการวัดจึงต้องเจือจางสารละลายไลโปโซมให้มีการรบกวนน้อยที่สุดแต่ยังสามารถวัดปริมาณโปรตีนได้

การทดสอบการเพิ่มการเข้าเซลล์มะเร็งปากมดลูกโดยการนำส่งแบบมุ่งเป้าด้วย lip-anti-VEGF

ผลการทดลองจาก CLSM พบว่าเมื่อควบคุมให้ความเข้มข้นของฟอสโฟลิปิดของ PLGA-lip และ PLGA-lip-anti-VEGF มีความเข้มข้นเท่ากัน แล้วบ่มกับเซลล์เป็นเวลา 2, 4 และ 24 ชั่วโมง โดยวิเคราะห์สัญญาณของ PLGA-lip และ PLGA-lip-anti-VEGF พบว่าอนุภาคเคลื่อนที่เข้าเซลล์เพิ่มขึ้นแปรผันตรงกับเวลาที่บ่ม และ PLGA-lip-anti-VEGF สามารถเข้าเซลล์ได้ดีกว่า PLGA-lip ซึ่งสามารถยืนยันผลได้ด้วย CLSM (ภาพที่ 9) ความเข้มข้นของอนุภาคที่เคลื่อนที่เข้าเซลล์ประเมินได้ดังตาราง 3 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการติด targeting moiety มีผลต่อการเข้าเซลล์ของอนุภาคซึ่งเกิดจากการเพิ่มโอกาสในการนำส่งอนุภาคเข้าเซลล์ผ่านการเพิ่มการเกาะติดของอนุภาคบนผิวเซลล์



ภาพที่ 9 เปรียบเทียบการเข้าเซลล์ระหว่างเซลล์ควบคุม SiHa เซลล์ที่ได้รับ PLGA-lip และ PLGA-lip-anti-VEGF ที่เวลา 2 ชั่วโมง ภายใต้กล้อง CLSM กำลังขยาย 60 เท่า ย้อมเซลล์ด้วย Hoechst 33258 (สีฟ้า) และอนุภาคน้ำมันสี Dill dye (สีแดง)

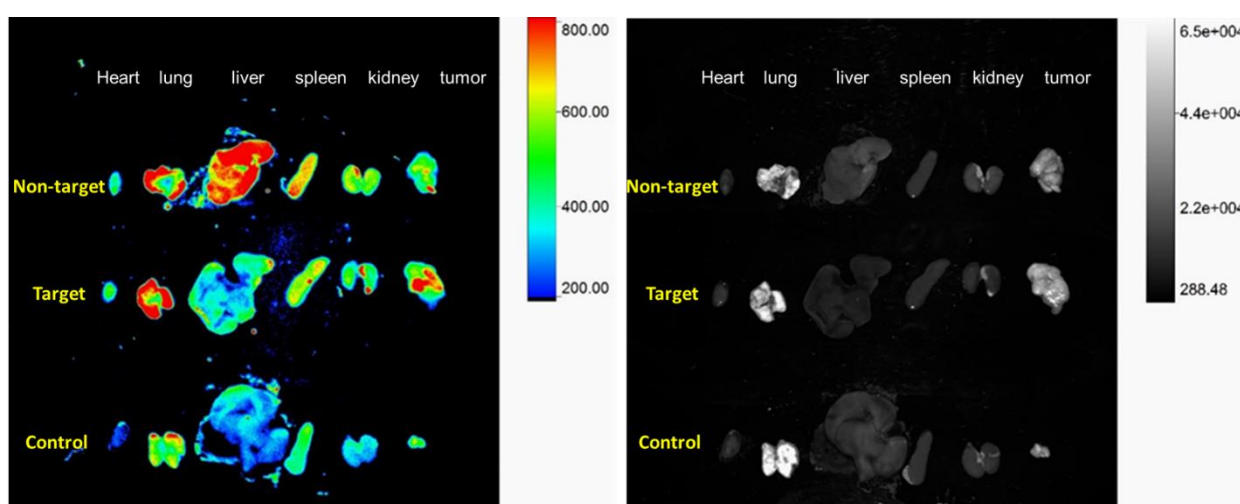
ตารางที่ 3 ปริมาณอนุภาคที่เข้าเซลล์ประเมินที่เวลา 4 ชั่วโมง

Samples at 4 h	Mean fluorescence intensity (MFI)
PLGA-lip	233.51 $\pm$ 7.31
PLGA-lip-anti-VEGF	560.60 $\pm$ 10.63

การทดสอบผลการนำส่งแบบมุ่งเป้าด้วย PLGA-lip-anti VEGF ต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกในหนูทดลอง

เบื้องต้นทำการฉีดระบบนำส่งในหนูทดลองเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นทำการ Cervical dislocation และเก็บตัวอย่างอวัยวะเพื่อมาวิเคราะห์ ตรวจสอบด้วย in vivo bioluminescence imaging system ได้ผลการกระจายของอนุภาคในแต่ละส่วนของอวัยวะดังภาพ 10 เมื่อเปรียบเทียบระหว่างหนูจาก 3 treatment ได้แก่ control (ฉีดด้วยน้ำเกลือ), PLGA-lip (non-targeted liposome) และ PLGA-lip-anti-

VEGF (targeted liposome) พบว่าอวัยวะจากหนู control ไม่ปรากฏสัญญาณเรืองแสงเนื่องจากตัวอย่างที่ฉีดไม่มีอนุภาคไลโปโซม เมื่อเปรียบเทียบระหว่างหนูที่ฉีดด้วยตัวอย่าง non-targeted liposome และ targeted liposome พบว่ามีสัญญาณจากอนุภาคในส่วนของก้อนมะเร็งจากหนูที่ฉีดด้วย targeted liposome สูงกว่าหนูที่ฉีดด้วย non-targeted liposome ในขณะที่หนูที่ฉีดด้วยกลุ่ม non-targeted liposome พบว่าอนุภาคมีการตกค้างที่ตับ ผลการทดลองนี้ยืนยันว่าการติด targeted moiety มีผลเพิ่ม retention time ของอนุภาคในก้อนมะเร็งทำให้ยาสะสมได้นานขึ้น อย่างไรก็ตามพบสัญญาณของอนุภาคเข้มข้นจากหนูที่ฉีดทั้ง non-targeted liposome และ targeted liposome สะสมที่ปอดซึ่งเป็นผลเนื่องจากการที่ปอดมีเส้นเลือดฝอยมาอนุภาคสามารถนำส่งเข้ามาได้ และภาพถ่ายนี้เป็นสภาวะเมื่อปอดมีการหดตัวแล้วจึงทำให้ปรากฏสัญญาณเข้มข้นมาก การทดลองนี้แสดงให้เห็นแนวโน้มในการนำส่งอนุภาคอย่างมุ่งเป้า ซึ่งในส่วนของผลต่อการรักษาต้องตรวจตามการยับยั้งการเจริญของก้อนมะเร็งเมื่อนำส่งอนุภาคที่บรรจุยาในลำดับต่อไป



ภาพที่ 10 ตัวอย่างอวัยวะของหนูทดลอง (หัวใจ ปอด ตับ ม้าม ไต และ ก้อนมะเร็ง) โดยใช้ in vivo bioluminescence imaging system ภาพทางด้านซ้ายคือภาพ fluorescence ที่แสดงการสะสมของระบบนำส่งในอวัยวะ และทางด้านขวาคือภาพขาวดำที่แสดงรูปร่างอวัยวะหนูทดลอง (แถวบน Liposome-non target, แถวกลาง Liposome-target, แถวล่าง Control)

สรุปผลการทดลอง

1. ระบบนำส่งยาประจุบวกและเกาะติดเยื่อเมือก chitosan-conjugated liposome ซึ่งบรรจุยา cisplatin เพื่อการรักษามะเร็งปากมดลูก

การทดลองนี้ได้ดัดแปลงผิวของไลโปโซมให้เป็นประจุบวกด้วย quaternized N,O-oleoyl chitosan (QCS) ซึ่งสังเคราะห์ให้มีส่วนชอบและไม่ชอบน้ำอยู่ในโมเลกุล และใช้ร่วมผสมกับฟอสโฟลิปิดเพื่อเตรียมเป็นไลโปโซมประจุบวก Lip-QCS ผลการวิเคราะห์ลักษณะทางเคมีกายภาพพบว่า Lip-QCS มีค่าประจุเป็นบวกแปรผันตามปริมาณ QCS ที่ใช้ จึงเลือกเติม QCS 2% โดยน้ำหนัก ซึ่งเตรียมไลโปโซมได้ขนาด 171.5 ± 0.8 nm ค่าประจุเป็นบวก 11.7 ± 0.7 สำหรับใช้เป็นระบบนำส่งยาต่อไป การเติม QCS ไม่มีผลให้ไลโปโซมมีความเป็นพิษ

กับเซลล์เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังได้พบว่า Lip-QCS มีความสามารถในการเกาะเยื่อเมือกได้ดีเมื่อทดสอบการจับกับอนุภาค mucin-particle เมื่อวิเคราะห์การเข้าเซลล์ของอนุภาคพบว่า การเติม QCS มีผลทำให้อนุภาคเข้าเซลล์ได้ดี จากคุณสมบัติข้างต้น Lip-QCS จึงถูกใช้บรรจุยาเคมีบำบัดสำหรับการรักษามะเร็งปากมดลูก cisplatin เตรียมเป็น Lip-QCS-cis พบว่าอนุภาคสามารถกักเก็บ cisplatin ได้ 28 % ซึ่งคาดว่า cisplatin จะถูกกักเก็บไว้ในผนังของ liposome ที่เป็น phospholipid bilayer ประสิทธิภาพของ lip-QCS-cis ได้รับการทดสอบยืนยันในระบบ 3D cell culture โดยตรวจสอบทั้งด้านความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งและการชักนำให้เกิด apoptosis ซึ่งเป็นผลจาก cisplatin

2. ระบบนำส่งยาแบบมุ่งเป้า PLGA-liposome บรรจุ cisplatin เพื่อการรักษามะเร็งปากมดลูก

ระบบนำส่งชนิดนี้เป็น PLGA เคลือบผิวด้วยฟอสโฟลิปิด หรือ PLGA-liposome เตรียมโดยใช้ PLGA เป็นแกนกลาง (core) ใช้บรรจุยา cisplatin และเคลือบผิวของอนุภาคด้วย liposome จากนั้นที่ผิวของไลโปโซมได้เชื่อม targeting moiety ที่เป็น anti-angiogenesis antibody หรือที่เรียกว่า anti-VEGF เพื่อให้ neutralize โปรตีน VEGF (vascular endothelial growth factor) มีผลทำให้ลด angiogenesis, progression และ metastasis ของมะเร็ง โดยแอนติบอดีดังกล่าวได้เชื่อมต่อกับ PLGA-liposome ด้วยพันธะทางเคมี พบสามารถติดแอนติบอดีได้ 50% ของปริมาณเริ่มต้นที่ใช้ ได้เป็น PLGA-lip นอกจากนี้ยังได้ทดสอบความสามารถของระบบที่เตรียมได้ในการกักเก็บยาพบว่า การบรรจุ cisplatin ลงใน PLGA ได้ 30.1% ระบบนำส่งยาชนิดนี้ได้รับการทดสอบประสิทธิภาพในระบบ 3D cell culture และในหนูทดลอง

บทวิจารณ์

1. ระบบนำส่งยาประจุบวกและเกาะติดเยื่อเมือก chitosan-conjugated liposome ซึ่งบรรจุ cisplatin เพื่อการรักษามะเร็งปากมดลูก

ปัจจุบันระบบนำส่งยาแบบ vagina admiration ได้รับความสนใจอย่างมากเนื่องจากเป็นแหล่งที่มีสถานะเป็นเยื่อเมือกทำให้เป็นอวัยวะเป้าหมายในการนำส่งยาได้ การนำส่งยาผ่าน vagina route นี้มีประสิทธิภาพทั้งที่เป็นแบบ systemic และ topical drug delivery ซึ่งในการทดลองนี้ได้สร้างระบบนำส่งยาในรูปแบบ liposome-chitosan hybrid system (Ch-QCS) ทำให้ได้ไลโปโซมที่มีคุณสมบัติเกาะติดเยื่อเมือกและมีประจุบวกช่วยในการเข้าเซลล์และเพิ่มชีวปริมาณออกฤทธิ์ของยา โดยได้ทดสอบกับยาเคมีบำบัดสำหรับมะเร็งปากมดลูก cisplatin ซึ่งเป็นยาต้านมะเร็งปากมดลูกที่มีประสิทธิภาพสูง แต่ก็มีความเป็นพิษและมีผลข้างเคียงกับผู้ป่วยสูง การกักเก็บ cisplatin ใน Lip-QCS จึงมีศักยภาพในการรักษามะเร็ง โดยในการทดลองนี้พบว่า Lip-QCS บรรจุ cisplatin ได้ด้วย 28 % loading efficiency เนื่องจาก cisplatin มีความเป็น hydrophobicity สูงจึงแทรกอยู่ที่ผิวของไลโปโซม การเพิ่มคุณสมบัติในการเกาะติดเยื่อเมือกและเพิ่มประจุบวกที่ผิวมีผล Lip-QCS เข้าเซลล์ได้ดีขึ้นซึ่งเป็นผลมาจากการเติม QCS ผลการรักษาทดสอบใน 3D tumor model พบว่าการกักเก็บ cisplatin ไว้ในรูปแบบอนุภาคเป็นกลไกทำให้ยามีฤทธิ์ได้ยาวนานขึ้น การทดลองนี้ได้แสดงให้เห็นประสิทธิภาพของ Lip-QCS ในการยับยั้งการเจริญของก้อนเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้ยังพบว่าความสามารถในการชักนำให้เกิด apoptosis ซึ่งรูปแบบการชักนำให้เกิดความเป็นพิษกับเซลล์และการเกิด apoptosis เป็นรูปแบบ slowed และ sustained release ซึ่ง Lip-QCS สามารถบรรจุยาที่มีความเป็น hydrophobic สูงได้ ระบบนำส่งนี้สามารถนำไปผสมหรือขึ้นรูปสำหรับสร้างตำรับยาในรูปแบบ เจล เม็ด หรือ

ฟิล์ม เพื่อเพิ่มชีวปริมาณออกฤทธิ์ของสารทั้งเพื่อการจับเกาะเยื่อเมือก สำหรับนำส่งยาทั้งแบบ topical และ systemic delivery ได้

2. ระบบนำส่งยาแบบมุ่งเป้า PLGA-liposome บรรจุ cisplatin เพื่อการรักษามะเร็งปากมดลูก

PLGA ที่เตรียมได้เป็นทรงกลม ขนาดต่ำกว่า 200 nm และเมื่อเคลือบด้วย liposome วิเคราะห์ด้วย TEM พบการเคลือบของชั้น lipid รอบผิวของอนุภาค PLGA ได้ชัดเจน เมื่อวัดด้วย AAS พบว่า PLGA สามารถกักเก็บ cisplatin ได้ 30.1 % อนุภาคที่ได้นำมาติด anti-VEGF ได้ 50 % เมื่อตรวจสอบการนำส่งเข้าสู่เซลล์เปรียบเทียบระหว่าง PLGA-Lip และ PLGA-lip-anti-VEGF พบว่า การติด targeting moiety มีผลต่อช่วยให้การเข้าสู่เซลล์ของอนุภาคดีขึ้น และได้ทดสอบประสิทธิภาพผลการนำส่งอนุภาคไปก้อนมะเร็งที่ปลูกถ่ายในหนู โดยเปรียบเทียบระหว่างหนูจาก 3 treatment ได้แก่ control (ฉีดด้วยน้ำเกลือ), PLGA-lip (non-targeted liposome) และ PLGA-lip-anti-VEGF (targeted liposome) ตรวจสอบด้วย in vivo bioluminescence imaging พบว่ามีสัญญาณจากอนุภาคในส่วนของก้อนมะเร็งจากหนูที่ฉีดด้วย targeted liposome สูงกว่าหนูที่ฉีดด้วย non-targeted liposome ผลการทดลองนี้ยืนยันว่าการติด targeted moiety มีผลเพิ่ม retention time ของอนุภาคในก้อนมะเร็งทำให้ยาสะสมได้นานขึ้น การทดลองนี้แสดงให้เห็นแนวโน้มในการนำส่งอนุภาคอย่างมุ่งเป้า ซึ่งในส่วนของการผลต่อการรักษาต้องตรวจสอบการยับยั้งการเจริญของก้อนมะเร็งเมื่อนำส่งอนุภาคที่บรรจุยาในลำดับต่อไป

ผลการวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นถึงแนวโน้มที่ดีในการใช้ระบบนำส่งยาแบบมุ่งเป้าเพื่อการรักษาโรคมะเร็งปากมดลูก ซึ่งทีมวิจัยสามารถนำข้อค้นคว้าที่ได้มาใช้ในการพัฒนาระบบนำส่งแบบมุ่งเป้าเพื่อการพัฒนาทางด้าน precision medicine สำหรับโรคชนิดอื่นต่อไป อย่างไรก็ตาม สำหรับการพัฒนาโดยเฉพาะกลุ่มยาใหม่นั้นยังคงต้องใช้กระบวนการอีกมากมายเพื่อพิสูจน์ประสิทธิภาพและความปลอดภัยของยานั้นจนกว่าจะถึงขั้นตอนการใช้ได้จริง หนึ่งในกระบวนการนี้คือการศึกษาระดับ pre-clinic ซึ่งถือว่ามีความสำคัญมาก เช่น การสอบฤทธิ์และความเป็นพิษของยาตามขั้นตอนมาตรฐานในสัตว์ทดลองชนิดต่าง ๆ เป็นต้น ในปัจจุบันการศึกษาระดับ pre-clinic ในประเทศไทยนั้นยังมีความขาดแคลนในด้าน animal facilities และห้องปฏิบัติการระดับ GLP/GMP รวมถึงผู้เชี่ยวชาญในด้านดังกล่าวอยู่มาก อีกทั้งการทำงานเชื่อมโยงระหว่างบุคลากรด้านสาขาก็น่าจะเป็นสิ่งจำเป็นในการผลักดันการวิจัยด้าน nanomedicine ให้มีความก้าวหน้าอีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

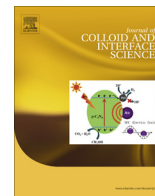
- Ding, D., Zhu, Z., Liu, Q., Wang, J., Hu, Y., Jiang, X. and Liu, B., 2011. Cisplatin-loaded gelatin-poly (acrylic acid) nanoparticles: synthesis, antitumor efficiency in vivo and penetration in tumors. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 79(1), pp.142-149.
- Huo, T., Barth, R.F., Yang, W., Nakkula, R.J., Koynova, R., Tenchov, B., Chaudhury, A.R., Agius, L., Boulikas, T., Elleaume, H. and Lee, R.J., 2012. Preparation, biodistribution and neurotoxicity of liposomal cisplatin following convection enhanced delivery in normal and F98 glioma bearing rats. *PloS one*, 7(11), p.e48752.
- Giaccone, G., 2000. Clinical perspectives on platinum resistance. *Drugs*, 59(4), pp.9-17.

- Júnior, Á.D., Mota, L.G., Nunan, E.A., Wainstein, A.J., Wainstein, A.P.D., Leal, A.S., Cardoso, V.N. and De Oliveira, M.C., 2007. Tissue distribution evaluation of stealth pH-sensitive liposomal cisplatin versus free cisplatin in Ehrlich tumor-bearing mice. *Life sciences*, 80(7), pp.659-664.
- Konishi, M., Tabata, Y., Kariya, M., Suzuki, A., Mandai, M., Nanbu, K., Takakura, K. and Fujii, S., 2003. In vivo anti-tumor effect through the controlled release of cisplatin from biodegradable gelatin hydrogel. *Journal of Controlled Release*, 92(3), pp.301-313.
- Newman, M.S., Colbern, G.T., Working, P.K., Engbers, C. and Amantea, M.A., 1999. Comparative pharmacokinetics, tissue distribution, and therapeutic effectiveness of cisplatin encapsulated in long-circulating, pegylated liposomes (SPI-077) in tumor-bearing mice. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 43(1), pp.1-7.
- Siddik, Z.H., 2003. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 22(47), p.7265.
- Takeuchi, H., Thongborisute, J., Matsui, Y., Sugihara, H., Yamamoto, H. and Kawashima, Y., 2005. Novel mucoadhesion tests for polymers and polymer-coated particles to design optimal mucoadhesive drug delivery systems. *Advanced drug delivery reviews*, 57(11), pp.1583-1594.
- Wang, X., Zhen, X., Wang, J., Zhang, J., Wu, W. and Jiang, X., 2013. Doxorubicin delivery to 3D multicellular spheroids and tumors based on boronic acid-rich chitosan nanoparticles. *Biomaterials*, 34(19), pp.4667-4679.
- WHO (2010) WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Cancers in Thailand. Summary Report 2010. Retrieved October 24, 2012 from www.who.int/hpvcentre



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Colloid and Interface Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jcis

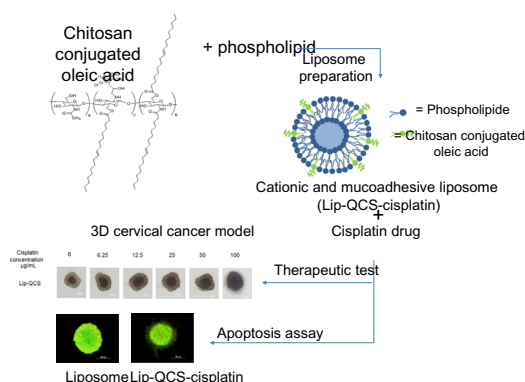
Phospholipid-chitosan hybrid nanoliposomes promoting cell entry for drug delivery against cervical cancer



Somsak Saesoo, Suphawadee Bunthot, Warayuth Sajomsang, Pattarapond Gonil, Sarunya Phunpee, Patsaya Songkhum, Kritapas Laohasurayotin, Tuksadon Wutikhun, Teerapong Yata, Uracha Rungsardthong Ruktanonchai, Nattika Saengkrit*

National Nanotechnology Center (NANOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Pathumthani 12120, Thailand

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 April 2016

Revised 28 June 2016

Accepted 29 June 2016

Available online 30 June 2016

Keywords:

Targeted cancer therapy

Liposome

Mucoadhesive nanoparticle

Cervical cancer

ABSTRACT

This study emphasizes the development of a novel surface modified liposome as an anticancer drug nanocarrier. Quaternized N,O-oleoyl chitosan (QCS) was synthesized and incorporated into liposome vesicles, generating QCS-liposomes (Lip-QCS). The Lip-QCS liposomes were spherical in shape (average size diameter 171.5 ± 0.8 nm), with a narrow size distribution (PDI 0.1 ± 0.0) and zeta potential of 11.7 ± 0.7 mV. *In vitro* mucoadhesive tests indicated that Lip-QCS possesses a mucoadhesive property. Moreover, the presence of QCS was able to induce the cationic charge on the surface of liposome. Cellular internalization of Lip-QCS was monitored over time, with the results revealing that the cell entry level of Lip-QCS was elevated at 24 h. Following this, Lip-QCS were then employed to load cisplatin, a common platinum-containing anti-cancer drug, with a loading efficiency of $27.45 \pm 0.78\%$ being obtained. The therapeutic potency of the loaded Lip-QCS was investigated using a 3D spheroid cervical cancer model (SiHa) which highlighted their cytotoxicity and apoptosis effect, and suitability as a controllable system for sustained drug release. This approach has the potential to assist in development of an effective drug delivery system against cervical cancer.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Development of effective nanocarriers for drug delivery has become an important factor dictating advances in the field. Several

* Corresponding author.

E-mail address: nattika@nanotec.or.th (N. Saengkrit).

types of nanocarriers having novel features aiding drug delivery to specific target sites, and to overcome biological barriers, have been designed [1,2]. The advanced nanocarriers devised especially for tumor treatment include those that are stimuli-responsive, are active targeting, and have site-specific triggers for localized drug delivery [3,4]. Many lipid and polymer-based nanoparticles have been studied as the basis for nanocarriers, and liposomes, neosomes, chitosan, poly (lactic-co-glycolic acid), poly-L-lysine and hybrid classes of these have been investigated to this end. Among lipid-based nanocarriers, liposomes are considered as the most conventional for use as drug carriers due to their practicality and biocompatibility, and the ability to regulate drug release. Additionally, both hydrophilic and hydrophobic drug cargo systems can be encapsulated within liposomes. However, liposomes have some limitations being that they are rapidly cleared and suffer from non-specific targeting, therefore, surface modification of these remains a key strategy for tailoring these for therapeutic use. In the polymeric nanocarrier class, chitosan is widely used in drug delivery as it is naturally occurring and biocompatible, allowing non-parenteral routes of delivery (nasal, ophthalmic, buccal, vaginal, transdermal and pulmonary) [5,6]. The outstanding advantage of chitosan over others is its excellent mucoadhesive properties, which occur via the opening of epithelial tight junctions resulting in transient permeability of mucosal barriers [7,8]. Therefore, chitosan is considered as a mucosal penetration enhancer for drug delivery applications [9,10].

Mucus membranes lining cavities and canals in the respiratory, digestive and urogenital tracts act as barriers to noninvasive drug administration routes. Drugs need to pass through mucosal surfaces to avoid hepatic first pass metabolism before reaching their target sites. Therefore, fabricating novel drug delivery systems to overcome these issues is a major theme of research in medical science. Mucus membranes have been recently highlighted as a focal point for targeted delivery in mucus-associated diseases [11,12]. A mucoadhesive nanocarrier designed for tumor therapy showed potential, with the drug-carrier system being able to pass through mucosal membranes such as pollen-mimetic porous microspheres [13] and PVA-coated PLGA [14]. The advantages of this type of cancer treatment are most obvious in cervical cancer, as the endocervix and exocervix have extensive amounts of mucosal lining [15]. Most invasive cervical cancers are induced by Human Papilloma Virus (HPV) type 16 or 18, which are the high-risk types [16]. HPV infection in keratinocytes at the basal layer of the mucosal cervix epithelium causes abnormal cells to cover the opening of the cervix muscular canal where the mucous membranes of the vagina and cervix meet. Therefore, mucous membranes are a potential target site for drug delivery against cervical cancer since the location of the cervix allows ease of access and the vagina is a favorable site for both local and systemic delivery [17,18]. Recently, Yang et al. (2014) demonstrated that incorporating PVA into polystyrene particle resulted in enhanced mucoadhesion [14]. This experiment demonstrated the use of a surfactant to formulate the drug carrier, and investigated the transport of nanoparticles in human cervicovaginal mucus. Berginc et al. (2014) developed mucoadhesive liposomes for vaginal delivery of curcumin. An *in vitro* model of vaginal mucus was developed allowing monitoring of curcumin permeability under conditions mimicking the vaginal environment [19]. This study showed that coating the liposomes with bioadhesive polymers chitosan and carbopol significantly increased the level of curcumin permeability, resulting in a superior drug delivery formulation over conventional vaginal delivery systems.

Cisplatin is a platinum-based anti-cancer drug which induces cytotoxicity by interfering with transcription and/or DNA replication. The interaction of cisplatin and DNA forms platinum-DNA adducts, resulting in the activation of several signal transduction

pathways involved in apoptosis [20]. Although cisplatin has been selected as a primary drug for treating cervical cancer, it has some significant drawbacks. Firstly, cisplatin has been proved to be extremely toxic [21] such that treatment often induces severe side effects including nephrotoxicity, neurotoxicity, ototoxicity, nausea and vomiting [22]. Additionally, as cisplatin is a low molecular-weight drug the retention time in tumor tissue is very short and it can be easily circulated causing damage to normal cells [23]. Resistance to cisplatin can also develop [20,24]. Several approaches have been developed to reduce the side effects of cisplatin such as using it in mixed drug formulations, and chemical modification of the cisplatin structure to produce less toxic analogs [25,26]. Efficient targeting of cisplatin to the required tissue would greatly enhance treatment effectiveness; directly targeting the tumor tissue using specific nano-drug delivery systems would prevent some of the aforementioned problems.

This research aimed to prepare and investigate the therapeutic effects of mucoadhesive liposomes containing cisplatin for cervical cancer treatment. The modification of phospholipids through chemical conjugation with chitosan generates quaternized N,O-oleoyl chitosan (QCS) for incorporation in liposome. The QCS-incorporated liposome (Lip-QCS) is a hybrid of polymer and lipid-based drug delivery system. The core of Lip-QCS is considered as a lipid-based delivery system which has fast and high endocytosis capacity. Therefore, our system is designed to be an active and biocompatible nanocarrier which possesses a mucoadhesive property as well. Encapsulation of cisplatin within Lip-QCS results in high therapeutic efficiencies. This approach is applicable for the development of an effective drug delivery system for local or topical administration against cervical cancer which is a mucus-associated disease. The purposed system is able to be further incorporated into cervix and vaginal delivery formulations such as gels [27], fibers [12], tablets [28] or creams [29] to increase the drug retention of cisplatin and promote active drug internalization into the target tissue.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Phosphatidylcholine of soybean origin (Epikuron 200) was purchased from Cargill (Hamburg, Germany) which contains phosphatidylcholine about 92%. Chitosan (Mw of 600 kDa) was purchased from Seafresh Chitosan Lab, Thailand. Triton X-100 was supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Phosphate buffer saline pH 7.4 (PBS) used in this study contained the following concentrations: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄. Minimum Essential Medium-Alpha (MEM- α) was supplied by GIBCO Invitrogen (NY, USA). *cis*-Diamineplatinum(II) dichloride (cisplatin) was purchased from Sigma-Aldrich (MO, USA). Fetal bovine serum (FBS) was obtained from Biochrom AG (Berlin, Germany). Trypsin-EDTA, L-glutamine, penicillin G sodium, streptomycin sulfate, and amphotericin B were obtained from Invitrogen Corp. (NY, USA). Mucin type III extracted from porcine stomach was obtained from Sigma-Aldrich (MO, USA). CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability kits were purchased from Promega (WI, USA). SiHa (HPV type 16 positive cells) were purchased from American Type Culture Collection (ATCC number HTB-35). ApoLive-Glo™ Multiplex kits were obtained from Promega (WI, USA).

2.2. Synthesis of quaternized N,O-oleoyl chitosan (QCS)

To synthesize QCS, two chemical modification steps were performed. N,O-oleoyl chitosan was first synthesized, and then

quaternized to enhance its water solubility. The following procedures outline these steps.

2.2.1. Synthesis of *N,O*-oleoyl chitosan

0.5 grams of chitosan (600 kDa) was dissolved in 80 mL of methanesulfonic acid. Oleoyl chloride (0.4 mL) was then added into the chitosan solution with vigorous stirring. The reaction mixture was stirred at room temperature for 5 h and then crushed ice (150 g) was added to stop the reaction. The acidic mixture was dialyzed against DI-water for 1 day to remove most of the acid, followed by neutralizing the remaining acid with NaHCO_3 . The mixture was then continuously dialyzed against DI-water for another 3 days. Lyophilization of the mixture afforded the *N,O*-oleoyl chitosan as a powder.

2.2.2. Synthesis of QCS

Five grams of powdered *N,O*-Oleoyl chitosan was dissolved in 40 mL of 1% (v/v) acetic acid. Glycidyltrimethyl ammonium chloride (GTMAC) (3 mL) was then added. The mixture was refluxed at 52 °C for 6 h. After cooling to room temperature the clear solution was dialyzed against DI-water for 3 days, and then lyophilized to give powdered QCS. The structure of the obtained QCS was confirmed by ATR-FTIR and ^1H -NMR spectroscopy.

2.3. Preparation of liposomes and cisplatin-loaded liposomes

Since the cisplatin is poor solubility drug, in this study, we prepare the aqueous cisplatin by dissolving in silver nitrate. An aqueous solution of cisplatin was prepared in accordance with the procedure from a previous study [30]. The cisplatin solution was prepared by adding 60 mg (0.02 mmol) of cisplatin to 1 mL of silver nitrate solution (66.2 mg/1 mL, 0.39 mmol). The suspension was heated at 60 °C for 3 h, and then stirred at room temperature overnight. The mixture was centrifuged at 16,000 rpm for 15 min to remove insoluble AgCl . The supernatant was collected and filtered through a 0.2 μm filter, yielding a clear solution of aqueous cisplatin ($\text{cis}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2$) for use in loading experiments. Cisplatin loaded-liposome-2% QCS were fabricated using a thin film method as follows: lecithin, 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[amino(polyethylene glycol)-2000] (ammonium salt) (PE-PEG) and QCS modified-phospholipid (9:1:1.5 mg) were dissolved in a 10 mL mixture of chloroform-diethyl ether (3:1 v/v). The solvent was removed by rotary evaporation at 25 °C under 50–100 kg/cm² nitrogen flow to obtain a thin lipid film. The film was rehydrated with 5 mL of phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) and aqueous cisplatin (100 μg of cisplatin/1 mg of lipid) with shaking. The particle size of liposome samples was reduced using a Liposo-Fast™-10 discontinuous extruder (Avestin Inc, Ottawa, Canada) operating at 200 bar, 15–20 cycles with a 200 nm pore size polypropylene membrane (Millipore GmbH, Eschborn, Germany). Cisplatin-loaded liposomes were concentrated by ultracentrifugation (Optima L-100 XP Ultracentrifugation Beckman Coulter; California, USA) at 80,000 rpm, 25 °C for 1.5 h. The pellets were collected and then re-dispersed in PBS. Loading of cisplatin was quantified through measurement of platinum concentrations using atomic absorption spectroscopy (Perkin Elmer PinAAcle 900F, MA, USA). Liposome controls (bare liposomes, Lip) were obtained by undertaking the preparation method without cisplatin loading.

2.4. Physicochemical characterization of liposomes

Morphologies of Lip and Lip-QCS particles were investigated using Atomic Force Microscopy (AFM). Five microliters of liposome sample was placed on a mica slide and allowed to dry for up to 15 min under vacuum, followed by further drying in a desiccator

overnight. All images were recorded at room temperature with a scanning speed of 1.0 Hz using AFM (Seiko SPA400, Chiba, Japan). Measurements were carried out using silicon rectangular cantilevers with a spring constant of 20 N/m². The topology images were used to determine the morphologies of the obtained liposomes.

The hydrodynamic diameter, polydispersity index (PDI) and zeta potential of liposomes were determined using dynamic light scattering (DLS) (NanoZS4700 nanoseries, Malvern Instruments, Malvern, UK). Liposome samples were diluted with 1 mL of filtered distilled water. PDI and zeta potential values were obtained as the average of three measurements at 25 °C. The refractive indices of liposomes and water were set at 1.42 and 1.33, respectively.

2.5. In vitro mucoadhesive testing of Lip-QCS by the mucin-particle method

The adsorption of mucin on the surface of Lip and Lip-QCS was measured using the protocol of Takeuchi et al., 2005 to evaluate the *in vitro* mucoadhesive properties of each [31]. Colloidal mucin was firstly prepared in particulate form as follows; 1% w/v mucin type III was added to pH 6.8 Tris buffer and the mixture stirred continuously for 10 h. The suspension was incubated at 37 °C overnight, then the mucin particle size was reduced by ultrasonication (VCX750, Sonics & Materials, Inc., CT USA) to a range of 200–300 nm. Particles were then purified by centrifugation at 4000 rpm for 20 min to separate colloidal mucin out of large precipitants. One milliliter aliquots of 1% (w/v) mucin suspension were mixed with different concentrations (0.025–0.2% w/w) of liposome solution under mild magnetic stirring. The particle size and zeta potential values of these suspensions were then measured using dynamic light scattering (DLS) (NanoZS4700 nanoseries, Malvern Instruments, Malvern, UK).

2.6. Cellular internalization of Lip and Lip-QCS

Internalization of liposomes was monitored using flow cytometry in SiHa. For visualization of liposome uptake into cells, conventional Lip and Lip-QCS were labeled with Dil dye tracer (Invitrogen, Paisley, UK) at a ratio of 1:1000 v/v. Dil-labeled Lip and Dil-labeled Lip-QCS were obtained after labeling. Cells were cultivated in 6-well plates until they reached 90% confluence, after which they were washed with PBS and then incubated with 2.5 mg/mL of Dil-Lip for 24 h. After incubation, the cells were washed 3 times with PBS to remove unbound liposomes. Internalization signals were analyzed using a flow cytometer (BD FACSCalibur™, BD biosciences, CA, USA) at excitation and emission wavelengths of 488 and 600 nm, respectively.

2.7. In vitro drug release study

The experiment was performed to evaluate the amount of cisplatin released from liposome vesicles compared with free liposome. Five milliliter of liposome suspension was loaded in dialysis bag with a molecular weight cutoff at 500 Dalton, Cellulose Ester Irradiated Membrane (Spectra/Por CE, Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA, USA) and immersed in 100 mL of PBS, which was accurately controlled under shaking condition of 150 rpm at 37 °C in shaking incubator. At fixed time intervals, 1 mL of the samples was withdrawn from the receptor phase and replaced with equal volumes of medium of PBS buffer. The amount of cisplatin was determined by ICP-OES compared with the platinum standard. The measurements were performed in triplicate.

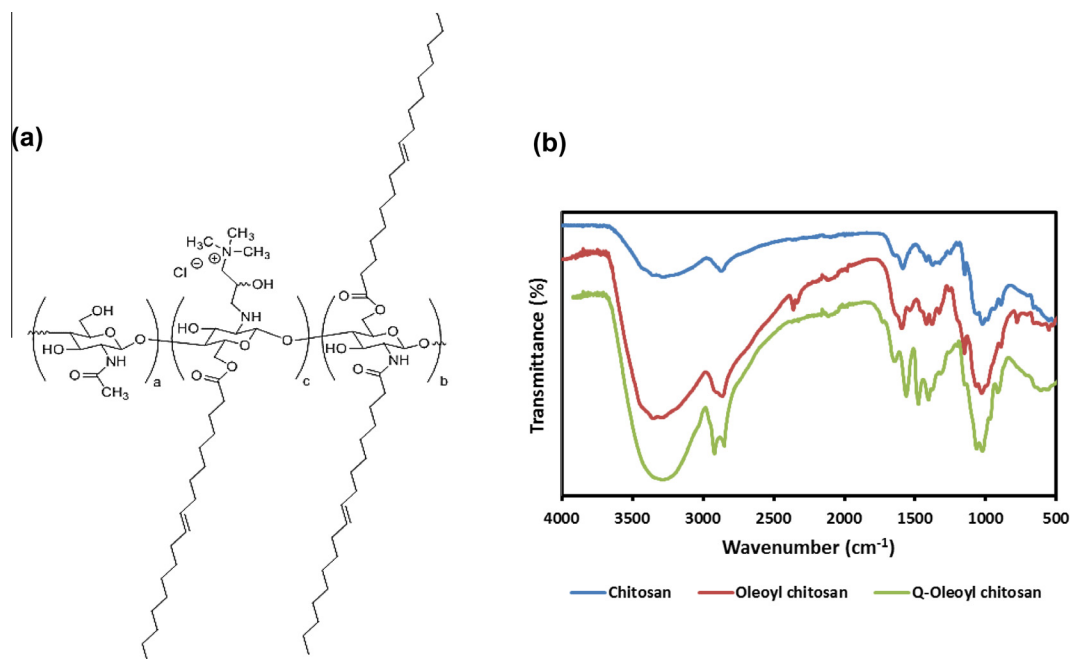


Fig. 1. Structure of quaternized N,O-oleoyl chitosan (a) and ATR-FTIR spectra of chitosan, N,O-oleoyl chitosan and quaternized N,O-oleoyl chitosan (b).

2.8. Apoptosis assays

Cellular apoptosis was examined by determination of caspase-3 activity. The cisplatin-loaded Lip-QCS, and free cisplatin were treated with 4-day old spheroids at a level of 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of cisplatin concentration. The treated spheroids were incubated for different

time periods (12, 24, and 72 h) followed by determination of the caspase-3 activity using the ApoLive-Glo Multiplex assay (Promega, WI, USA).

2.9. Spheroid toxicity of Lip-QCS

In order to evaluate the cytotoxicity of cisplatin-loaded liposomes, a 3D model was used to mimic tumor mass. A 3D culture of SiHa cells was prepared. An initial seeding of 2×10^3 SiHa cells/well was added to each well of a 96 ultra-low attachment well plate (Corning Incorporated, MA, USA). Cells were grown for 4 days until the spheroid diameter was approximately $203 \pm 6 \mu\text{m}$. The spherical cells were treated with free cisplatin, cisplatin-loaded Lip-QCS or liposomes (Lip, or Lip-QCS) in the absence of cisplatin as controls. After 3 days of incubation, cells were harvested and the viability was determined by CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability assay (Promega, WI, USA). Data from the test samples were normalized with those of the untreated control for each condition, and expressed as a percentage (% viability).

3. Results and discussion

3.1. Characterization of N,O-oleoyl chitosan and its quaternized derivative

The preparation of N,O-acyl chitosan in methanesulfonic acid as solvent was performed according to the protocol reported by Sashiwa et al. [32]. In this study, chitosan was dissolved in methanesulfonic acid, and the oleoyl chloride was added dropwise. The homogenous mixture was neutralized with sodium hydrogen carbonate, and then dialyzed and lyophilized to obtain the N,O-oleoyl chitosan having O-substitution as the major product (Fig. 1a). A noteworthy point is that obtaining both a moderate degree of N,O-acyl substitution, and moderate molecular weight is necessary to ensure that the material shows high biological activity. Although selective O-acylation of chitosan in methanesulfonic acid (believed due to protonation of the primary amino group) has been reported [33], the chemical structure of the

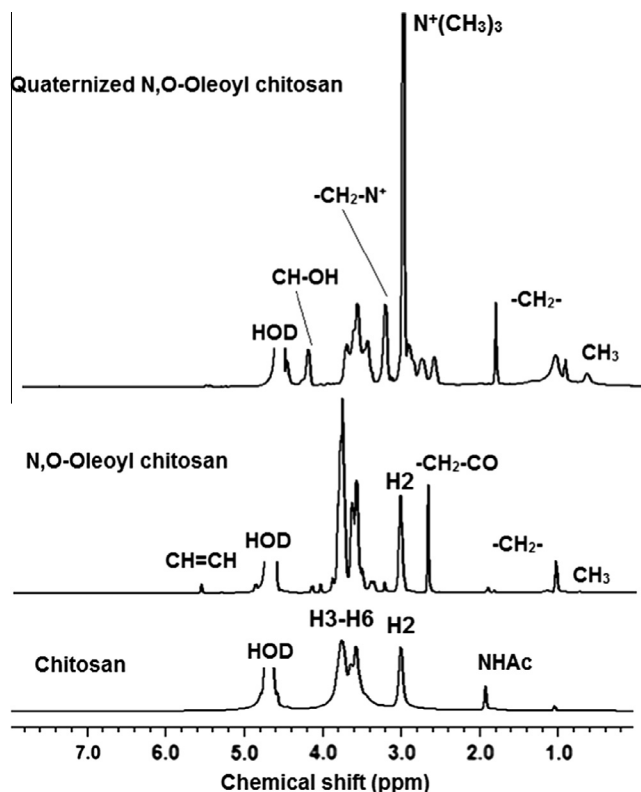


Fig. 2. ^1H NMR spectra of chitosan, N,O-oleoyl chitosan and quaternized N,O-oleoyl chitosan.

material has not been fully characterized. To address the chemical structures of chitosan and its derivatives were characterized by ATR-FTIR. Fig. 1b displays the ATR-FTIR spectra of chitosan, N,O-oleoyl chitosan and quaternized N,O-oleoyl chitosan. The characteristic absorption at $4000\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ is due to OH and NH_2 group stretching frequencies. The absorption bands at 1647 and 1375 cm^{-1} correspond to the C=O and C-O stretching of the amide groups, whereas the absorption band at 1585 cm^{-1} is attributed to N-H amino group deformation. Moreover, the chitosan spectrum shows absorption bands at 1149, 1057 and 1022 cm^{-1} which correspond to C-O-C and C-O stretching. The ATR-FTIR spectrum of N,O-oleoyl chitosan exhibits clear absorption bands at 2924, 2854, 1464 and 1182 cm^{-1} due to the presence of methylene $-\text{CH}_2-$ groups, and the absorption at 777 cm^{-1} relates to the $=\text{C-H}$ bending of the oleoyl group. The spectrum of quaternized N,O-oleoyl chitosan exhibits a diagnostic absorption at 1477 cm^{-1} , arising from C-H stretching of the methyl substituent of the quaternary ammonium groups.

In comparison with the ^1H NMR spectra of chitosan which contains no aliphatic protons, that of N,O-oleoyl chitosan exhibits a singlet at δ 0.77 ppm, a broad multiplet at δ 1.08–1.94 ppm, and a doublet of doublet at δ 5.56 ppm due to the presence of the methyl, methylene, and methine protons of the oleoyl group, respectively, while the spectrum of quaternized N,O-oleoyl chitosan was similar to that of N,O-oleoyl chitosan except for additional proton signals at δ 2.88, 3.11, 3.34 and 4.32 ppm due to the glycidyltrimethyl ammonium moieties (Fig. 2) [34]. From the ^1H NMR spectra, the degree of N,O-substitution (DS) was calculated using the following equation:

$$\text{DS} = (\text{IMt}/2)/(\text{IH2}),$$

where IMt represents the total area (integration) of the oleoyl group methine protons, and IH2 represents the peak area of C2 protons from the chitosan backbone. Based on ^1H -NMR spectra, the degree of N,O-substitution (DS) value was calculated using the equation. The DS value was found to be 0.025 which was in good agreement with that obtained from elemental analysis. The degree of quaternization (DQ) for the prepared quaternized N,O-oleoyl chitosan was determined by potentiometric titration with silver nitrate (AgNO_3) solution, and found to be $70 \pm 3\%$ [35].

3.2. Morphological and physicochemical characterization of liposomes

The hydrodynamic size and surface charges for Lip, Lip-QCS, and cisplatin-loaded liposomes (Lip-QCS-cis) were determined and are shown in Table 1. Lip has a mean diameter of $141.7 \pm 1.8\text{ nm}$ and a

Table 1

Physicochemical characteristics of liposomes.

Sample	Size ^a (nm)	PDI ^a	Zeta potential ^a (mV)	Drug loading ^b (%)
Lip	141.7 ± 1.7	0.1 ± 0.0	-7.3 ± 0.5	–
Lip-QCS	171.5 ± 0.8	0.1 ± 0.0	11.7 ± 0.7	–
Lip-QCS-cisplatin	164.6 ± 1.0	0.2 ± 0.0	0.6 ± 0.0	27.6 ± 0.8

PDI = polydispersity index.

^a The standard deviations were obtained from triplicates during size measurements.

^b The standard deviations were obtained from three independent experiments.

polydispersity index (PDI) of 0.1 ± 0.0 , and exhibits a slightly negative zeta potential ($-7.3 \pm 0.5\text{ mV}$). The incorporation of 2% QCS into liposomes resulted in an increase in diameter, and change in zeta potential from negative to positive. This result confirmed the insertion of a hydrophobic component, the oleoyl group, into the phospholipid bilayer, and decoration of positive charges from QCS onto the liposome surface as reflected by the positive zeta potential value. Lip-QCS proved suitable for loading of cisplatin, although it is known that cisplatin is strong hydrophobic drug. The cisplatin in this study was transferred to aqueous form by dissolving in AgNO_3 . Therefore, the aqueous cisplatin would be encapsulated in the inside liposome core. However, the charge of size and zeta potential probably influenced the non-encapsulated cisplatin remained in the suspension.

AFM was employed to investigate the morphologies of Lip and Lip-QCS particles although under these conditions the liposome samples were dehydrated. The images identified that liposome nanoparticles have discrete and spherical shapes (Fig. 3) and no significant differences between the size and shape of Lip and Lip-QCS particles are noticeable.

3.3. Mucoadhesive test

Incorporation of quaternized N,O-oleoyl chitosan into liposomes resulted in the Lip-QCS particles having a positively charged surface, as described above. The presence of surface chitosan results in the liposomes having mucoadhesive properties. To confirm this, the interactions between Lip-QCS and mucin particles were investigated using the sub-micron mucin method. For control mucin, particle sizes and zeta potentials were in the range of 260–280 nm and -5 mV , respectively. Changes in zeta potential and particle diameter were monitored as mucin particles were mixed with various concentrations of Lip-QCS. The binding of mucin

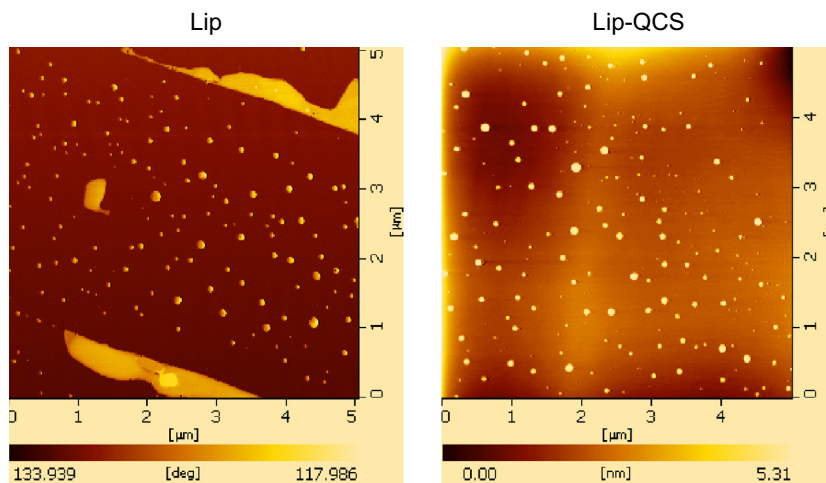


Fig. 3. AFM images of liposome (lip) and chitosan incorporated liposome (lip-QCS).

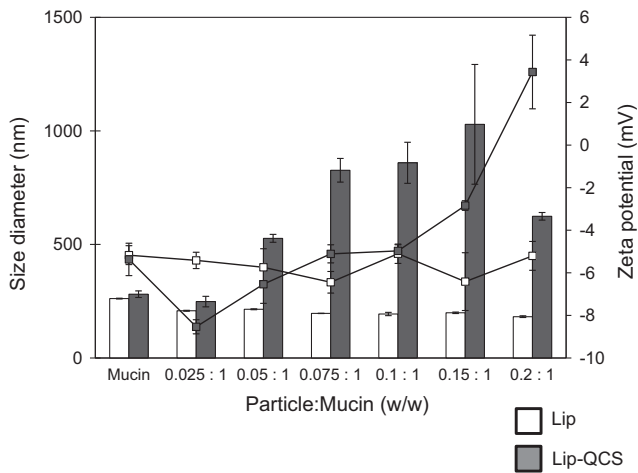


Fig. 4. Mucoadhesive assay of liposomes. Size and zeta potential of liposome:mucin complexes in various amounts of liposome.

particles and Lip-QCS resulted in complex formation, as reflected by changes in surface charge and particle size. Considering particle size, the diameter was observed to increase with Lip-QCS quantity, until micron-sized particles of the complex were obtained (Fig. 4). This change is dependent on the amount of supplemented Lip-QCS, indicating that Lip-QCS has a binding affinity for mucin. Remarkably, control Lip showed no significant changes in size on testing

with mucin. Monitoring of the surface charge also confirmed that Lip-QCS particles are mucoadhesive. Increases in zeta potential value were observed on treatment of Lip-QCS with mucin. Additionally, complexation resulted in observable turbidity, with the level of turbidity being significantly higher for complexation between mucin and Lip-QCS over that of the Lip control.

3.4. Intracellular uptake of Lip and Lip-QCS

To investigate the intracellular uptake of Lip-QCS, the amount of liposome entry into SiHa cells was evaluated using flow cytometry. The experiment was conducted at 24 h post-transfection, with the percentage internalization being 76.6% and 89.6% in Lip and Lip-QCS, respectively. These results indicated that intracellular uptake of Lip-QCS was considerably higher than that of Lip, an observation related to the cationic Lip-QCS surface charge inducing electrostatic interactions with the SiHa cellular membrane, and subsequent endocytosis. In contrast the negatively charged Lip surface promotes electrostatic repulsion with the cellular membrane, retarding endocytosis [36]. In summary, the surface charge is an important factor for liposome-mediated cellular internalization, and these results correlate well with those previously reported [37,38].

3.5. Encapsulation efficiency and loading capacity of cisplatin in Lip-QCS

To examine the role of Lip-QCS as a therapeutic drug carrier, we selected cisplatin as a model drug due to its importance in cancer

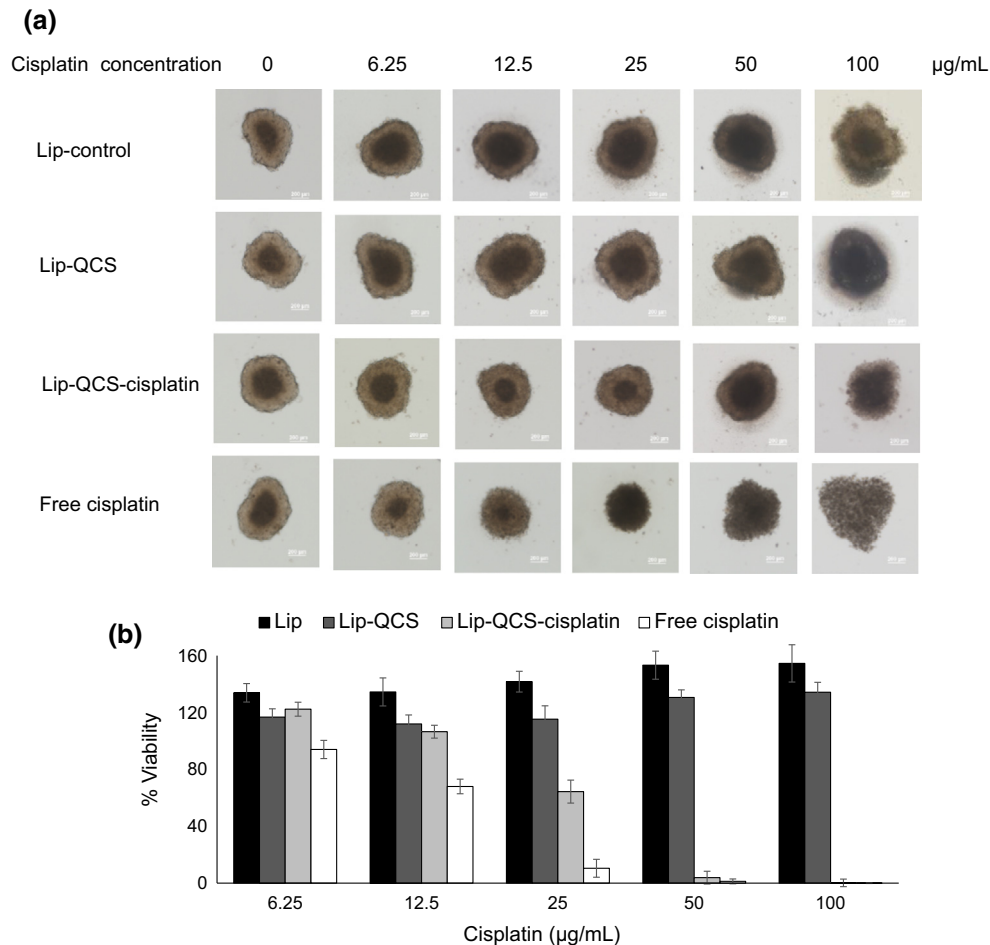


Fig. 5. Cytotoxicity test of liposomes and cisplatin on SiHa spheroid at 72 h-post treatment. Morphological change of 3D tumor spheroid occurred, resulting in destabilization forms after treated with cisplatin (a). Percentage of cell viability measuring from 3D tumor (b).

therapy. With an initial loading of cisplatin per lipid 104 $\mu\text{g}/\text{mg}$ the recovered yield (as analyzed by AAS) indicated a Pt-loading yield of 29 $\mu\text{g}/\text{mg}$, which is a 28% loading efficiency (Table 1). This result is consistent with those of Huo et al. [39], who developed a liposome formulation showing Pt-loading efficiency of 25% as the basis for a potent brain tumor treatment.

3.6. Therapeutic effect on 3D tumor model spheroids

To assess the therapeutic effect of Lip-QCS-cisplatin, *in vitro* assays on 3D spheroid cervical cancer models were undertaken. A 3D cervical cancer model was obtained by seeding 2000 SiHa cervical cancer cells into each well of an ultra-low attachment 96 well-plate. Cells were allowed to aggregate and form 3D spheroids for 3 days, to reach a tumor volume of $2.1 \pm 0.2 \times 10^7 \mu\text{m}^3$. The spheroid cultures were exposed to the drug and liposome samples, with subsequent incubation (72 h). Cell viability was determined and compared among spheroids treated with Lip, Lip-QCS, Lip-QCS-cisplatin and free cisplatin. Fig. 5a shows the effect of various cisplatin concentrations on spheroids, compared to the untreated control. Morphological change of 3D tumor spheroid occurred, resulting in destabilization forms which could be observed after treatments with cisplatin and Lip-QCS-cisplatin. The percent viability of each individual spheroid sample was determined, as shown in Fig. 5b. After 72 h-post treatment the viability of cells treated with Lip-QCS-cisplatin and free cisplatin showed a dose dependent decrease while no cytotoxic effect was evident in those treated with Lip, or Lip-QCS alone. Lip-QCS-cisplatin has lower toxicity and is less effective on spheroids compared to free cisplatin, believed attributable to the difference in bio-distribution between free cisplatin and liposome containing cisplatin [40,41]. Furthermore, some previously reported studies have shown that encapsulated drugs are released through controlled mechanisms prolonging drug efficacy, whereas free drug molecules show rapid release profiles. Our results are consistent with previous studies in this area [42,43], however, these results highlight the development and use of an effective non-cytotoxic modified liposome that is suitable for drug loading. A key advance is to further modify the liposome to specifically target cellular uptake by tumor cells.

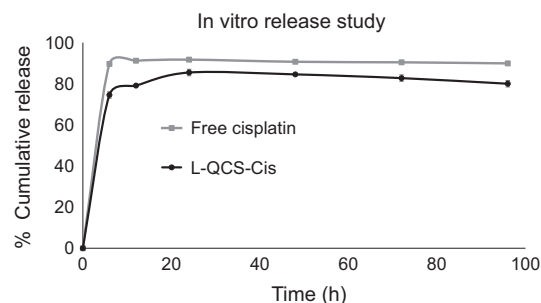


Fig. 6. *In vitro* drug release profile from free cisplatin and Lip-QCS-cisplatin. Data show mean $\pm$ SD (n = 3).

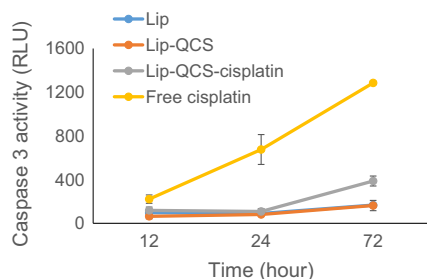
3.7. In vitro release study of Lip-QCS-cisplatin

To examine the cisplatin release profile, *in vitro* release study was performed with the free cisplatin and Lip-QCS-cisplatin at the initial concentration of cisplatin approximately 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Both free cisplatin and encapsulated cisplatin released from liposomes reached to the maximum% cumulative release profile at 48 h as follows; 79% and 91%, respectively (Fig. 6). The result indicated that encapsulation of cisplatin in liposome can slow and sustain the release of cisplatin. This could be due to retardation of drug release from liposome barrier.

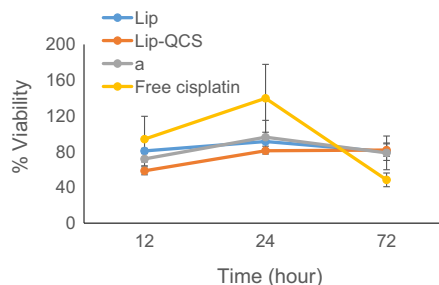
3.8. Apoptosis assay on cervical cancer spheroids

The therapeutic effects of cisplatin through cell apoptosis were observed by evaluation of caspase-3 levels expressed in cervical cancer. The study was done together with the observation of cell viability. Cells were grown for 4 days until the spheroid volumes were $3.6 \pm 0.2 \times 10^7 \mu\text{m}^3$. Caspase-3 activity was determined from spheroids treated with free cisplatin, and Lip-QCS-cisplatin at a concentration of 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The results indicated that apoptosis was induced as a time-dependent manner, within 72 h post-incubation. This correlates with the cell viability result, which also decreases in a time-dependent manner (Fig. 7a). For the non-correlated result of apoptosis and cell viability of free drug at 24 h

(a) Apoptosis in SiHa spheroid



Cell viability



(b) Live and dead staining

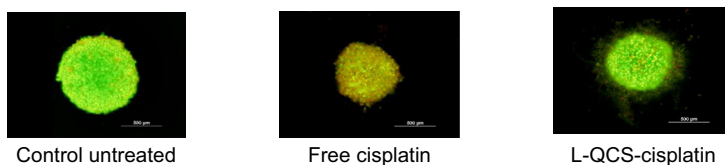


Fig. 7. The study on therapeutic effect on 3D tumor model spheroids. Apoptosis and tumor cell survival exhibit the retention of the effect of cisplatin-loaded in Lip-QCS (a). Imaging 3D tumor cell after live-dead staining indicated live (green) and dead (red) cells, study was done at 72 h post incubation (b). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

post treatment, It is possible that the level of activated caspase-3 was not ready yet to induce cell dead, so that we could detect the higher cell viability. Normally, caspase-3 plays the role to regulate other signaling molecules until the cell died. Therefore, in our result, we detected the high level of caspase-3 activity at 24 h after treatment which consequently decreased the cell viability at 72 h-post treatment. Moreover, we found that free cisplatin induced apoptosis in spheroids at a higher level compared to Lip-QCS-cisplatin, as a consequence of the slower release of cisplatin from the Lip-QCS (Fig. 7b). This result related to the *in vitro* release study of free cisplatin and Lip-QCS-cisplatin which exhibited an encapsulated form showing slower release of drug (Fig. 6), so that the therapeutic effect was delayed but more sustained therapeutic effects. Cisplatin needs to be initially released from the carrier to reach the tumor whereas free cisplatin is available for direct diffusion to the cancer cells. These results correspond well with those of drug cytotoxicity testing and are consistent with previous studies demonstrating that cisplatin-loaded nanoparticles are capable to induce apoptosis in cervical cancer cells via caspase-3 induction [44–46].

4. Conclusion

Several mucoadhesive nanocarriers have been reported, however, most of them are mainly focused on non-cancerous mucus-associated diseases [47–49]. In this study, we purposed the novel mucoadhesive nanocarrier, possessing cancer therapeutic effect against cervical cancer. An amphiphilic chitosan derivative, quaternized N,O-oleoyl chitosan (QCS) was designed and synthesized. QCS was incorporated into liposome vesicles, generating QCS-liposome (Lip-QCS). Cisplatin, a model drug, was loaded inside Lip-QCS. The multiple characteristics of Lip-QCS were studied including physicochemical, mucoadhesive and therapeutic effects. The presence of QCS-chitosan on the liposome surface enhances its mucoadhesive properties and may allow for more efficient targeting. Lip-QCS has the potential for use against cervical cancer as a component in vaginal formulations. Encapsulation of a hydrophobic chemotherapy drug such as cisplatin was achieved, and its therapeutic effects demonstrated in 3D cervical cancer models. This system is beneficial for the incorporation of the particle into other formulations such as gels, tablets or films for therapeutic applications, and to further increase the drug retention time.

Other advantages of in this delivery system are, first, it is very effective in intracellular internalization because the mechanism of cell entry of Lip-QCS occurs via endocytosis. Even Lip-QCS is a hybrid of chitosan and lipid-based nanocarrier, but the major component of the carrier is lipid-based. Thus, this system is considered as an effective carrier in cell trafficking. Contrastingly, chitosan-based nanocarrier is recognized as a polymeric-based which is not aggressive for cell entry [50]. Second, the presence of an amphiphilic chitosan on the carrier surface causes the carrier to become a site for conjugation with the targeting ligand to promote specific interaction of cell and nanoparticles. With this approach, Lip-QCS are feasible to be an active targeting nanoparticle which is useful for cancer therapy [51].

In conclusion, this drug delivery system is in the potential to specifically target the nanoparticles to mucus-associated cancerous cells. We have proposed the novel choice of mucoadhesive nanocarrier having the potency for cancer therapy. The system can be implemented in the development of drug for treating cervix or vagina-associated disease via local administration.

Acknowledgment

This research was financially supported by the Thailand Research Fund (TRF) (grant number RSA5680041), Thailand Center

of Excellence for Life Sciences (TCELS) and the National Nanotechnology Center (NANOTEC), Thailand (grant number P1450431).

References

- [1] A.H. Faraji, P. Wipf, Nanoparticles in cellular drug delivery, *Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009) 2950–2962.
- [2] T.C. Yih, M. Al-Fandi, Engineered nanoparticles as precise drug delivery systems, *J. Cell. Biochem.* 97 (2006) 1184–1190.
- [3] T.L. Andresen, S.S. Jensen, K. Jorgensen, Advanced strategies in liposomal cancer therapy: problems and prospects of active and tumor specific drug release, *Prog. Lipid Res.* 44 (2005) 68–97.
- [4] S. Mura, J. Nicolas, P. Couvreur, Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery, *Nat. Mater.* 12 (2013) 991–1003.
- [5] M. Amidi, E. Mastrobattista, W. Jiskoot, W.E. Hennink, Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62 (2010) 59–82.
- [6] A. Sosnik, J. das Neves, B. Sarmiento, Mucoadhesive polymers in the design of nano-drug delivery systems for administration by non-parenteral routes: a review, *Prog. Polym. Sci.* 39 (2014) 2030–2075.
- [7] P. Artursson, T. Lindmark, S.S. Davis, L. Illum, Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2), *Pharm. Res.* 11 (1994) 1358–1361.
- [8] G. Borchard, H.L. Lueben, A.G. de Boer, J.C. Verhoef, C.-M. Lehr, H.E. Junginger, The potential of mucoadhesive polymers in enhancing intestinal peptide drug absorption. III: Effects of chitosan-glutamate and carbomer on epithelial tight junctions in vitro, *J. Control. Release* 39 (1996) 131–138.
- [9] L. Kudsiova, M.J. Lawrence, A comparison of the effect of chitosan and chitosan-coated vesicles on monolayer integrity and permeability across Caco-2 and 16HBE14o-cells, *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 3998–4010.
- [10] S.R.G. Sandri, M.C. Bonferoni, F. Ferrari, M. Mori, C. Caramella, The role of chitosan as a mucoadhesive agent in mucosal drug delivery, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 22 (2012) 275–284.
- [11] P.R. Karn, Z. Vanic, I. Pepic, N. Skalko-Basnet, Mucoadhesive liposomal delivery systems: the choice of coating material, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 37 (2011) 482–488.
- [12] S. Zong, X. Wang, Y. Yang, W. Wu, H. Li, Y. Ma, W. Lin, T. Sun, Y. Huang, Z. Xie, The use of cisplatin-loaded mucoadhesive nanofibers for local chemotherapy of cervical cancers in mice, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 93 (2015) 127–135.
- [13] J. Feng, L. Lin, P. Chen, W. Hua, Q. Sun, Z. Ao, D. Liu, L. Jiang, S. Wang, D. Han, Topographical binding to mucosa-exposed cancer cells: pollen-mimetic porous microspheres with tunable pore sizes, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7 (2015) 8961–8967.
- [14] M. Yang, S.K. Lai, T. Yu, Y.Y. Wang, C. Happe, W. Zhong, M. Zhang, A. Anonuevo, C. Fridley, A. Hung, J. Fu, J. Hanes, Nanoparticle penetration of human cervicovaginal mucus: the effect of polyvinyl alcohol, *J. Control. Release* 192 (2014) 202–208.
- [15] R.N. Fichorova, J.G. Rheinwald, D.J. Anderson, Generation of papillomavirus-immortalized cell lines from normal human ectocervical, endocervical, and vaginal epithelium that maintain expression of tissue-specific differentiation proteins, *Biol. Reprod.* 57 (1997) 847–855.
- [16] M. Schiffman, P.E. Castle, J. Jeronimo, A.C. Rodriguez, S. Wacholder, Human papillomavirus and cervical cancer, *Lancet* 370 (2007) 890–907.
- [17] L.M. Ensign, R. Cone, J. Hanes, Nanoparticle-based drug delivery to the vagina: a review, *J. Control. Release* 190 (2014) 500–514.
- [18] A. Hussain, F. Ahsan, The vagina as a route for systemic drug delivery, *J. Control. Release* 103 (2005) 301–313.
- [19] K. Berginc, S. Suljakovic, N. Skalko-Basnet, A. Kristl, Mucoadhesive liposomes as new formulation for vaginal delivery of curcumin, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 87 (2014) 40–46.
- [20] Z.H. Siddik, Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance, *Oncogene* 22 (2003) 7265–7279.
- [21] B. Lippert, Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug, Wiley-VCH, 1999.
- [22] G. Giaccone, Clinical perspectives on platinum resistance, *Drugs* 59 (Suppl 4) (2000) 9–17, discussion 37–18.
- [23] M. Konishi, Y. Tabata, M. Kariya, A. Suzuki, M. Mandai, K. Nanbu, K. Takakura, S. Fujii, In vivo anti-tumor effect through the controlled release of cisplatin from biodegradable gelatin hydrogel, *J. Control. Release* 92 (2003) 301–313.
- [24] L. Galluzzi, L. Senovilla, I. Vitale, J. Michels, I. Martins, O. Kepp, M. Castedo, G. Kroemer, Molecular mechanisms of cisplatin resistance, *Oncogene* 31 (2012) 1869–1883.
- [25] C.J. Li, C.Y. Chu, L.H. Huang, M.H. Wang, L.F. Sheu, J.I. Yeh, H.Y. Hsu, Synergistic anticancer activity of triptolide combined with cisplatin enhances apoptosis in gastric cancer in vitro and in vivo, *Cancer Lett.* 319 (2012) 203–213.
- [26] J. Pracharova, T. Saltarella, T. Radosova Muchova, S. Scintilla, V. Novohradsky, O. Novakova, F.P. Intini, C. Pacifico, G. Natile, P. Ilik, Novel antitumor cisplatin and transplatin derivatives containing 1-methyl-7-azaindole: synthesis, characterization, and cellular responses, *J. Med. Chem.* 58 (2014) 847–859.
- [27] J. Das Neves, M.F. Bahia, Gels as vaginal drug delivery systems, *Int. J. Pharm.* 318 (2006) 1–14.
- [28] M.A. Alam, F.J. Ahmad, Z.I. Khan, R.K. Khar, M. Ali, Development and evaluation of acid-buffering bioadhesive vaginal tablet for mixed vaginal infections, *AAPS PharmSciTech* 8 (2007) E109.

- [29] V.M. Ndesendo, V. Pillay, Y.E. Choonara, E. Buchmann, D.N. Bayever, L.C. Meyer, A review of current intravaginal drug delivery approaches employed for the prophylaxis of HIV/AIDS and prevention of sexually transmitted infections, *AAPS PharmSciTech* 9 (2008) 505–520.
- [30] S. Guo, L. Miao, Y. Wang, L. Huang, Unmodified drug used as a material to construct nanoparticles: delivery of cisplatin for enhanced anti-cancer therapy, *J. Control. Release* 174 (2014) 137–142.
- [31] H. Takeuchi, J. Thongborisute, Y. Matsui, H. Sugihara, H. Yamamoto, Y. Kawashima, Novel mucoadhesion tests for polymers and polymer-coated particles to design optimal mucoadhesive drug delivery systems, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 (2005) 1583–1594.
- [32] H. Sashiwa, N. Kawasaki, A. Nakayama, E. Muraki, N. Yamamoto, H. Zhu, H. Nagano, Y. Omura, H. Saimoto, Y. Shigemasa, S. Aiba, Chemical modification of chitosan. 13. (1) Synthesis of organosoluble, palladium adsorbable, and biodegradable chitosan derivatives toward the chemical plating on plastics, *Biomacromolecules* 3 (2002) 1120–1125.
- [33] T. Seo, Y. Ikeda, K. Torada, Y. Nakata, Y. Shimomura, Synthesis of N, O-acylated chitosan and its sorptivity, *Chitin Chitosan Res.* 7 (2001) 212–213.
- [34] W. Sajomsang, P. Gonil, S. Tantayanon, Antibacterial activity of quaternary ammonium chitosan containing mono or disaccharide moieties: preparation and characterization, *Int. J. Biol. Macromol.* 44 (2009) 419–427.
- [35] P. Gonil, W. Sajomsang, U.R. Ruktanonchai, N. Pimpha, I. Sramala, O. Nuchuchua, S. Saesoo, S. Chaleawler-Umporn, S. Puttipatkhachorn, Novel quaternized chitosan containing β -cyclodextrin moiety: synthesis, characterization and antimicrobial activity, *Carbohydr. Polym.* 83 (2011) 905–913.
- [36] P. Chandaroy, A. Sen, P. Alexandridis, S.W. Hui, Utilizing temperature-sensitive association of Pluronic F-127 with lipid bilayers to control liposome-cell adhesion, *Biochim. Biophys. Acta* 1559 (2002) 32–42.
- [37] C.R. Dass, Improving anti-angiogenic therapy via selective delivery of cationic liposomes to tumour vasculature, *Int. J. Pharm.* 267 (2003) 1–12.
- [38] S. Krasnici, A. Werner, M.E. Eichhorn, M. Schmitt-Sody, S.A. Pahernik, B. Sauer, B. Schulze, M. Teifel, U. Michaelis, K. Naujoks, M. Dellian, Effect of the surface charge of liposomes on their uptake by angiogenic tumor vessels, *Int. J. Cancer* 105 (2003) 561–567.
- [39] T. Huo, R.F. Barth, W. Yang, R.J. Nakkula, R. Koynova, B. Tenchov, A.R. Chaudhury, L. Agius, T. Boulikas, H. Elleaume, R.J. Lee, Preparation, biodistribution and neurotoxicity of liposomal cisplatin following convection enhanced delivery in normal and F98 glioma bearing rats, *PLoS ONE* 7 (2012) e48752.
- [40] A.I.D.C. Junior, L.G. Mota, E.A. Nunan, A.J.A. Wainstein, A.P.D.L. Wainstein, A.S. Leal, V.N. Cardoso, M.C. De Oliveira, Tissue distribution evaluation of stealth pH-sensitive liposomal cisplatin versus free cisplatin in Ehrlich tumor-bearing mice, *Life Sci.* 80 (2007) 659–664.
- [41] M.S. Newman, G.T. Colbern, P.K. Working, C. Engbers, M.A. Amantea, Comparative pharmacokinetics, tissue distribution, and therapeutic effectiveness of cisplatin encapsulated in long-circulating, pegylated liposomes (SPI-077) in tumor-bearing mice, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 43 (1999) 1–7.
- [42] D. Ding, Z. Zhu, Q. Liu, J. Wang, Y. Hu, X. Jiang, B. Liu, Cisplatin-loaded gelatin-poly(acrylic acid) nanoparticles: synthesis, antitumor efficiency in vivo and penetration in tumors, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 79 (2013) 142–149.
- [43] X. Wang, X. Zhen, J. Wang, J. Zhang, W. Wu, X. Jiang, Doxorubicin delivery to 3D multicellular spheroids and tumors based on boronic acid-rich chitosan nanoparticles, *Biomaterials* 34 (2013) 4667–4679.
- [44] E. Asselin, G.B. Mills, B.K. Tsang, XIAP regulates Akt activity and caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells, *Cancer Res.* 61 (2001) 1862–1868.
- [45] C. Blanc, Q.L. Deveraux, S. Krajewski, R.U. Janicke, A.G. Porter, J.C. Reed, R. Jaggi, A. Marti, Caspase-3 is essential for procaspase-9 processing and cisplatin-induced apoptosis of MCF-7 breast cancer cells, *Cancer Res.* 60 (2000) 4386–4390.
- [46] K.M. Henkels, J.J. Turchi, Cisplatin-induced apoptosis proceeds by caspase-3-dependent and -independent pathways in cisplatin-resistant and -sensitive human ovarian cancer cell lines, *Cancer Res.* 59 (1999) 3077–3083.
- [47] J.D. Du, Q. Liu, S. Salentinig, T.H. Nguyen, B.J. Boyd, A novel approach to enhance the mucoadhesion of lipid drug nanocarriers for improved drug delivery to the buccal mucosa, *Int. J. Pharm.* 471 (2014) 358–365.
- [48] H. Abd El Azim, N. Nafee, A. Ramadan, N. Khalafallah, Liposomal buccal mucoadhesive film for improved delivery and permeation of water-soluble vitamins, *Int. J. Pharm.* 488 (2015) 78–85.
- [49] H. Duan, S. Lü, C. Gao, X. Bai, H. Qin, Y. Wei, X. Wu, M. Liu, Mucoadhesive microparticulates based on polysaccharide for target dual drug delivery of 5-aminosalicylic acid and curcumin to inflamed colon, *Colloids Surf. B* 145 (2016) 510–519.
- [50] R.K. Keswani, M. Lazebnik, D.W. Pack, Intracellular trafficking of hybrid gene delivery vectors, *J. Control. Release* 207 (2015) 120–130.
- [51] D. Liu, D.T. Auguste, Cancer targeted therapeutics: from molecules to drug delivery vehicles, *J. Control. Release* 219 (2015) 632–643.



Full Length Article

Characterization of liposome-containing SPIONs conjugated with anti-CD20 developed as a novel theranostic agent for central nervous system lymphoma



S. Saesoo^a, S. Sathornsumetee^{a,c}, P. Anekwiang^b, C. Treetidnipa^b, P. Thuwajit^{b,d},
S. Bunthot^a, W. Maneeprakorn^a, L. Maurizi^e, H. Hofmann^f,
Ruktanonchai Uracha Rungsardthong^a, N. Saengkrit^{a,*}

^a National Nanotechnology Center (NANOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Pathumthani 12120, Thailand

^b NANOTEC-Mahidol University Center of Excellence in Nanotechnology for Cancer Diagnosis and Treatment, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University 2 Wanglang Road, Bangkoknoi, Bangkok 10700, Thailand, Thailand

^c Departments of Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University 2 Wanglang Road, Bangkoknoi, Bangkok 10700, Thailand, Thailand

^d Departments of Immunology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University 2 Wanglang Road, Bangkoknoi, Bangkok 10700, Thailand, Thailand

^e Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne, UMR 6303 CNRS – Université Bourgogne Franche-Comté, BP 47870, F-21078 Dijon cedex, France

^f Powder Technology Laboratory, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), 1015 Lausanne, Switzerland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 June 2017

Received in revised form 19 October 2017

Accepted 1 November 2017

Available online 8 November 2017

Keywords:

Primary central nervous system lymphoma (PCNSL)

Blood brain barrier (BBB)

Brain lymphoma

Superparamagnetic iron oxide nanoparticle (SPIONs)

Rituximab

Anti-CD20

Liposome

Theranostics

ABSTRACT

Despite advances in neuroscience cancer research during the past decades, the survival of cancer patients has only marginally improved and the cure remains unlikely. The blood-brain barrier (BBB) is a major obstacle protecting the entry of therapeutic agents to central nervous system, especially for primary central nervous system lymphoma (PCNSL). Thus, the use of small nanoparticle as a drug carrier may be new strategies to overcome this problem. In this study, we fabricated liposome consisting of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) functionalized with anti-CD20 (Rituximab; RTX). The designed nanoparticles have a theranostic property which is not only to improve drug delivery, but also to offer diagnostic and monitoring capabilities. TEM images revealed the spherical shape of liposome with the approximately average diameters about 140–190 nm with slightly negatively charge surfaces. Superparamagnetic property of SPIONs-loaded liposomes was confirmed by VSM. Liposome colloidal could be prolonged at 4 °C and 25 °C storages. RTX conjugated liposome induced cell internalization and apoptosis effect in B-lymphoma cells. Drug targeting and therapeutic effect was investigated in BBB model. The result confirmed that liposome nanocarrier is required as a drug carrier for effectively RTX across the BBB.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Despite advances in the understanding of genetic and molecular abnormalities relating to cancer, and in development of new therapies, the prognosis of patients with primary central nervous system lymphoma (PCNSL) remains poor when compared to other lymphoma types (median survival 3–5 years) [1]. For immunocompromised patients, such as those with AIDS or in cases of organ transplantation, median survival times are often markedly reduced (typically less than 1 year) [2]. Due to this, and the rising incidence of PCNSL over the past decades there is a need to develop new

diagnostic and therapeutic strategies which are applicable to these patients, including the wider population [3].

PCNSL accounts for 3–5% of primary brain tumors in adults, and occurs with an incidence of 5 per 1,000,000 people in developed countries [1]. Most (>95%) PCNSL cases are of the diffuse large B-cell type. Genetic abnormalities in PCNSL cells are distinct from those occurring in other lymphomas; this factor may relate to observed differences in prognosis and treatment response [4]. Non-invasive imaging studies such as magnetic resonance imaging (MRI) and positron-emission tomography (PET) scans can support an initial diagnosis of PCNSL, however confirmation usually requires a stereotactic biopsy. Alternatively, cytology of cerebrospinal fluid, or ocular vitreous, may confirm diagnosis in 20–30% of patients. Diagnosis of AIDS-associated PCNSL represents an important challenge in clinical practice. Radiographic findings of PCNSL in immunocompromised patients are often indistinguish-

* Corresponding author.

E-mail address: nattika@nanotec.or.th (N. Saengkrit).

able from infections, particularly toxoplasmosis. In these cases, biopsies are often deferred until the empiric treatment for toxoplasmosis fails, causing delays in diagnosis. Therefore, non-invasive diagnostic approaches, such as neuroimaging probes, for PCNSL in AIDS patients may hasten diagnosis allowing early treatment. High-dose methotrexate (HD-MTX)-based chemotherapy regimens are the standard treatment for PCNSL [5], and these combined with other chemotherapies (cytarabine, procarbazine, vincristine, or ifosfamide) have been shown to provide superior results in some cases, although the higher toxicity is a serious issue. Rituximab (RTX), a monoclonal antibody against CD20, has demonstrated promising activity as a single agent in PCNSL [6], despite the inherent limitation of such a large molecule in traversing the blood-brain barrier [7,8]. Employing nanoparticles as a carrier for RTX may help overcome this challenge, and result in increased efficacy in PCNSL treatment.

The blood-brain barrier represents a major obstacle for drug delivery to the CNS [9,10]. The use of a small lipophilic carrier, such as a nanoparticle system, may overcome this problem, with nanoparticles allowing for improved drug delivery metrics as well as diagnostic and monitoring capabilities. This emerging molecular platform, “theranostics” [11], employs nanoparticle systems based on liposomes [12], micelles [13], and dendrimers [14] to protect drugs and deliver them to targets in a controlled manner. In addition, they can be decorated with “molecular antennae” such as antibodies or aptamers on their surface to allow target specificity. Imaging probes are an important group of theranostic particles: these can be detected in vivo through various imaging modalities [15]. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) and radioisotopically labeled nanoparticles are common imaging probes detectable by magnetic resonance imaging and positron emission tomography, respectively. Among the various nanoparticle classes available, liposomes have shown real promise in the treatment of brain disorders [16–18], having been shown to enhance the delivery of neuroprotective agents to the *peri*-infarct area in experimental ischemic stroke models [17,18]. Surface-modified liposomes have been developed to increase drug delivery into the brain. So far, surface conjugation of liposome with transferrin is a common BBB delivery system by exploiting transferrin receptors at the blood-brain barrier to mediate transcytosis of liposomes. [19]. Liposome conjugated with transferrin antibody containing P53 plasmid (SGT-53, SynerGene Therapeutics, USA) has been advanced into phase II clinical trial evaluation in patients with recurrent glioblastoma. In addition, transferrin-neuroprotective agents [20–22] have been tested in preclinical models of Alzheimer's disease.

Other surface modification platforms to improve BBB penetration of liposomes include lactoferrin [23], glucose [24] and glutathione [25]. At present, diagnosis and treatment of CNS lymphoma remains a significant challenge and represents an unmet clinical need. Diagnosis relies on brain biopsy. Non-invasive imaging technique that can aid diagnosis is urgently needed particularly for immunocompromised patients e.g. AIDS, whom clinical and conventional radiographic findings of CNS lymphoma are indistinguishable from other mimics such as toxoplasmosis. In addition, novel treatment strategies to improve survival outcome with less toxicity are critically required for patients with advanced age or poor functional status. In this study, we have successfully designed and fabricated a novel theranostic nanoparticle system consisting of liposome containing SPION (for tracking and treatment monitoring) functionalized with RTX (for specific targeting and treatment) and coated with a surfactant, tween 80 (to improve BBB penetration). In addition, our nanoparticle system has potential to exhibit anti-cancer immune response [26] and serve as a substrate (SPIONs) for thermal ablation.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Soybean lecithin (Soya Phosphatidylcholin; PC) was purchased from Degussa (Hamburg, Germany). 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol 2000)] (DSPEG-PE), and 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[4-(*p*-maleimidophenyl)butyramide] (MPB-PE, linker) were purchased from Avanti Polar Lipids, Inc (Alabama, USA). Lipid molecular structures used in this study were showed in Supplementary materials. Cholesterol was also obtained from Avanti Polar Lipids, Inc (Alabama, USA). Polysorbate 80 (Tween 80) was obtained from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Phosphate buffered saline (pH 7.4) (PBS; containing 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄), and Triton X-100 were obtained from Merck (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). Anti-CD20 (RTX) was purchased from Roche (Basel, Switzerland). Roswell Park Memorial Institute media (RPMI 1640) was from GIBCO Invitrogen (New York, USA). Fetal bovine serum (FBS) was obtained from Biochrom AG (Berlin, Germany). Trypsin-EDTA, L-glutamine, penicillin G sodium, streptomycin sulfate, and amphotericin B were obtained from Invitrogen Corp. (New York, USA). MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] was purchased from GIBCO Invitrogen (NY, USA). Dimethylsulfoxide (DMSO) was procured from Sigma-Aldrich, Inc. (Dorset, UK). The Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit was obtained from NeXins Research BV (Rotterdam, the Netherlands). Distilled water was generated using an ELGA system (PureLab Ultra, Illinois, USA). Z138C and Granta519 lymphoma cell lines were graciously provided by Dr. Siwanon Jirawatnotai (Bangkok, Thailand). SPIONs-PVA nanoparticles were synthesized from maghemite (γ -Fe₂O₃), affording SPIONs having a diameter less than 20 nm. All SPIONs were coated with PVA (Polyvinyl alcohol)-OH for stabilization [27–29] and called SPION-PVA.

2.2. Lymphoma cell cultivation

Granta and Z138C cell lines were cultured in RPMI 1640 medium. The medium was supplemented with 10% FBS containing 0.1 mM non-essential amino acids (100 μ g/ml L-glutamine, 100 μ g/ml streptomycin and 100 U/ml penicillin). Cells were grown and propagated in 75 ml T-flasks, and incubated at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. The medium was changed every other day.

2.3. Preparation of liposomes and conjugation of RTX

A series of liposome nanoparticles were prepared by conventional thin film hydration, which involved the mixing of PC, DSPEG-PE, Tween 80 and MPB-PE (linker) in various proportions, as indicated in Table 1. Each mixture was then dissolved in chloroform-diethyl ether (3:1 v/v, 10 ml), and upon solvent removal by rotary evaporation at 25 °C under 50–100 kg/cm² nitrogen flow thin lipid films were obtained. After drying, lipid films were rehydrated with 0.2 mg_{Fe}/ml of SPION-PVA dissolved in PBS (pH 7.4), and re-suspended with shaking at room temperature. Particle sizes of all liposome samples were reduced using a discontinuous extruder (Liposo-Fast™-10, Avestin Inc, Ottawa, Canada) operating at 200 bar pressure over 15–20 cycles, through a 200 nm pore size polypropylene membrane (Millipore GmbH, Eschborn, Germany). The SPIONs-PVA loaded liposomes were purified by centrifugation (TomyMX-301, Tokyo, Japan) at 9840 g for 30 min, prior to collection. The obtained pellets were re-suspended in PBS (pH 7.4) for measuring of SPION entrapment. Additionally, in order to obtain an optimized formulation for BBB delivery, the

Table 1Physicochemical characterization of liposomes and SPIONs encapsulation efficiencies (mean $\pm$ SD, $n = 3$).

Formulation	%w/w	Size (nm)		PDI		Zeta potential (mV)		% EE of SPIONs-PVA
		w/o SPIONs-PVA	w/t SPIONs-PVA	w/o SPIONs-PVA	w/t SPIONs-PVA	w/o SPIONs-PVA	w/t SPIONs-PVA	
Lip (liposome)	100	141.9 $\pm$ 1.0	129.9 $\pm$ 5.6	0.1 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.0	−0.1 $\pm$ 0.0	−2.3 $\pm$ 0.1	30.0 $\pm$ 4.1
Lip/PEG	90:10	169.7 $\pm$ 11.3	140.5 $\pm$ 16.2	0.1 $\pm$ 0.0	0.3 $\pm$ 0.0	−2.3 $\pm$ 0.3	−5.1 $\pm$ 0.7	27.3 $\pm$ 3.3
Lip/Tween80	90:10	161.0 $\pm$ 12.6	123.8 $\pm$ 19.5	0.2 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1	−0.3 $\pm$ 0.0	−2.7 $\pm$ 0.4	41.4 $\pm$ 0.0
Lip/PEG/Tween80	80:10:10	157.2 $\pm$ 9.1	136.4 $\pm$ 4.1	0.2 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0	−2.2 $\pm$ 0.2	−5.6 $\pm$ 0.7	45.6 $\pm$ 8.2
Lip/PEG/Tween80/Rituximab	79:10:10:1	182.0 $\pm$ 6.3	158.2 $\pm$ 13.3	0.2 $\pm$ 0.0	0.3 $\pm$ 0.0	−7.2 $\pm$ 0.4	−9.0 $\pm$ 0.1	44.6 $\pm$ 3.4

following liposome series were initially prepared: liposome (Lip), Lip/PEG, Lip/Tween80, Lip/PEG/Tween80, Lip/PEG/Tween80 and Lip/PEG/Tween80/RTX.

Immobilization of RTX was performed via chemical conjugation. Thiolated RTX was firstly prepared by mixing RTX with 2-iminothiolane at 25 °C for 30 min. The conjugation of RTX and liposomes was achieved via the coupling of thiolated RTX and MPB-PE onto the liposome surface. This required gradual addition of MPB-PE-liposomes into the freshly prepared thiolated RTX, followed by incubation of the solution at 4 °C overnight under nitrogen atmosphere, with continuous stirring. The resultant RTX conjugated liposomes were purified by ultracentrifugal sedimentation at 288,691 g for 90 min, and the obtained pellets were re-suspended and washed twice with PBS (pH 7.4). The amount of RTX bound on liposome can be identified by subtracting the calculated amount of unbound RTX from the initial amount that was added to the liposome solution. Based on this approach, we found that the value of RTX/lipid was approximately 180 μ g/mg.

2.4. Morphology and physicochemical characterization of liposomes

The morphology of liposomes was investigated using transmission electron microscopy (TEM). Samples were prepared by placing 5 μ l of liposome solution onto a 200-mesh carbon copper grid (EMS Equipment, Berks, UK). After 10 min, the droplet was removed from the edge of the grid using filter paper. Samples were dried by standing at room temperature prior to imaging: TEM (model JEM 2010; JEOL, Peabody, MA) accelerating voltage 120 KV, 50 K magnification.

Hydrodynamic diameter, polydispersity index (PDI) and zeta potential of liposomes were determined by dynamic light scattering (DLS) (NanoZS4700 nanoseries, Malvern Instruments, Malvern, UK). Twenty microliters of the samples were diluted with 1 ml of filtered distilled water prior to measurements being taken to eliminate viscosity effects caused by the ingredients. Hydrodynamic diameter (based on volume measurement), PDI and zeta potential were obtained from the average of three measurements at 25 °C. The refractive indices of liposomes and water were set at 1.42 and 1.33, respectively.

2.5. Determination of SPIONs-PVA encapsulation

The encapsulation of SPIONs-PVA within liposomes was quantified using the Prussian Blue assay, where samples were diluted for preparation of a calibration curve (at least 3 serial dilutions required). Particle iron concentrations ([Fe] in mg Fe mL^{−1}) were measured through a colorimetric assay. SPIONs-PVA were first digested by incubation overnight with an equal volume of 6 M HCl. Then, 25 μ l of digested particles was mixed with 50 μ l of 5% w/v K₄Fe(CN)₆·H₂O in water (freshly prepared and covered with aluminium foil). The sample was then shaken continuously for 15 min,

followed by measurement of the iron content, which measured from the reaction between K₄[Fe(CN)₆] and Fe³⁺ to give an intense blue product (Prussian blue, Fe₄[Fe(CN)₆]₃) whose optical density was measured at 690 nm using a microplate spectrophotometer (SpectraMAX2, Molecular Devices GmbH, CA, USA). The encapsulation efficiency was calculated using the equation below.

$$\%EE = \frac{\text{Total amount of determined SPION}}{\text{Initial amount of SPION loading}} \times 100$$

2.6. MTT assay

To evaluate the toxicity of SPIONs-PVA loaded liposomes, cells were plated in 96-well plates, each containing 90 μ l of RPMI with 10% fetal bovine serum at a density of 8000 cells/well. When the cultures had reached confluency (typically 24 h after plating) they were exposed to SPIONs-PVA loaded liposomes at SPIONs-PVA concentrations of 0.0005, 0.001, 0.0025, 0.005, 0.01 or 0.02 mg_{Fe}/ml. The treated cells were then incubated for 24 h at 37 °C in a CO₂ atmosphere. After washing twice with PBS (pH 7.4), 25 μ l of MTT solution was added into each well, followed by further incubation (4 h). The medium was then removed and replaced with 100 μ l of dimethylsulfoxide, followed by further incubation for 30 min at 37 °C. Following this, the absorbance of the colored solution was measured at 550 nm using a microplate reader (SpectroMAX, California, US), and the percentage cell viability was calculated and compared with that of the control.

2.7. Stability of liposomes

Liposome samples were stored in PBS (pH 7.4) at 4 °C, and 25 °C for prolonged periods to gauge their stability. Samples were taken periodically at intervals of 1, 3 and 4 months and liposome stability monitored using particle diameter, polydispersity index (PDI) and zeta potential measurements. Each measurement was performed in triplicate, and expressed as an average value.

2.8. Magnetization analysis by VSM

The magnetic properties of SPIONs-PVA and SPIONs-PVA loaded into Lip, Lip/PEG, Lip/Tween80 and Lip/PEG/Tween80/linker liposomes were assessed using vibrating sample magnetometry (VSM, LakeShore Model 7404, USA). For this, all samples were freeze-dried in liquid nitrogen and lyophilized under vacuum. The magnetic field was applied at 10 kOe in all measurements.

2.9. Cellular uptake of liposomes

Internalization of liposomes was monitored by confocal laser scanning microscopy (CLSM), and flow cytometry. To monitor liposome uptake, Lip/PEG-PE and Lip/PEG-PE/RTX were labeled with Dil dye tracer (Invitrogen, Paisley, UK) at a ratio of 1:1000 v/v. Granta

and Z138C cells (1×10^6 cells) were seeded onto sterilized glass coverslips and allowed to adhere overnight in a 6-well plate. At transfection, Dil labeled liposomes were added to the cells at a concentration of 0.4 mg/ml, which corresponds to the IC_{80} value indicating 80% cell viability. For CLSM, cell and liposome particles were incubated together for 2 h at 37°C under an atmosphere of 5% CO_2 . Cells were then washed twice with PBS (pH 7.4), fixed with 4% w/v paraformaldehyde for 10 min, and then twice washed again with PBS (pH 7.4). For cellular DNA staining, Hoechst dye (Molecular Probes, OR, USA) was diluted in PBS (pH 7.4) at a ratio of 1:1500 v/v, then incubated with the cells for 10 min. Cells were washed twice with PBS pH 7.4 after staining then observed under confocal microscope. Images were acquired using a laser scanning confocal microscope (Nikon, ECLIPSE Ti-Cls4 Laser Unit, Japan), using the 60 objective lens. SPIONs-PVA detection was achieved by reflecting laser scanning, with laser excitation at 488 nm.

Flow cytometry was employed to quantify cell internalization of liposomes. Cells were cultivated in 6-well plates until growth levels reached 80% confluence. After washing with PBS, cells were incubated with Dil-labeled SPION-PVA loaded liposomes (phosphatidyl choline: Dil 1:500 w/w) at a concentration corresponding to the IC_{80} value. Cellular internalization of liposomes was quantified with time: after incubation for 30 min, 1, 2 and 4 h unbound liposomes were removed by washing three times with PBS. At each time point, internalization signals were analyzed using a flow cytometer (BD FACS Calibur™, BD biosciences, CA, USA) at excitation and emission wavelengths of 488 and 600 nm, respectively.

2.10. Apoptosis assay

Cells treated with liposomes were double stained with AnnexinV-FITC (AV-FITC) and propidium iodide (PI) to detect apoptotic, and necrotic cells. AV-FITC/PI co-labeling was performed according to the standard protocol as recommended by the manufacturer (BD Pharmingen™, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Cells were seeded in a 6-well plate at a den-

sity of 1×10^6 cells/well, and were allowed to attach for 24 h. After medium refreshment, cells were exposed to either RTX, Lip, Lip/PEG-PE/SPIONs-PVA, Lip/PEG-PE/Tween80/SPIONs-PVA or Lip/PEG-PE/Tween80/SPIONs-PVA/RTX at a concentration corresponding to the IC_{20} for 24 h at 37°C . Cells were then detached using trypsin-EDTA solution, re-suspended in fresh medium, and centrifuged at 1000 rpm for 5 min. The obtained pellets were re-suspended in PBS (pH 7.4), centrifuged for a further 5 min (1000 rpm), and then collected and re-suspended in AnnexinV binding buffer. All samples were stained with 5 μl of AV-FITC and 10 μl of PI, and then incubated for 15 min in the dark at 25°C . After addition of 250 μl of AnnexinV binding buffer to each, cells were analyzed using flow cytometry (BDFACS Calibur™, BD biosciences, San Jose CA, USA). The flow cytometer was equipped with filters capable of detecting PI at excitation/emission wavelengths of 520/570 nm, while FITC was detectable at excitation/emission wavelengths of 485/535 nm. Results are presented in a dot plot of AV-FITC versus PI with quadrant gating. The percentage apoptosis in cells was determined using the FACSDiva software package.

2.11. In vitro model BBB of PCNSL for permeability and therapeutic testing

Permeability of the BBB can be gauged by measuring the transendothelial electrical resistance (TEER), which affords a direct relation to its structural integrity. An in vitro co-culture model of BBB was set up according to protocol of Imamura et al. [30]. For this, bEnd3 cells were seeded onto 0.4 μm pore size polyester membrane inserts (density of 20,000 cells/insert) contained in a 12-well plate transwell tray (Corning, NY, USA). The cells were allowed to grow on the membrane for 8 days, with the DMEM medium being changed every 2 days. With this system, the drug targeting, and therapeutic effect, of RTX and liposomes on B cell lymphoma cells was evaluated: for this, Granta cells were seeded at the bottom of the culture dish and were allowed to grow for 4 days. After this time the TEER values were monitored until they reached

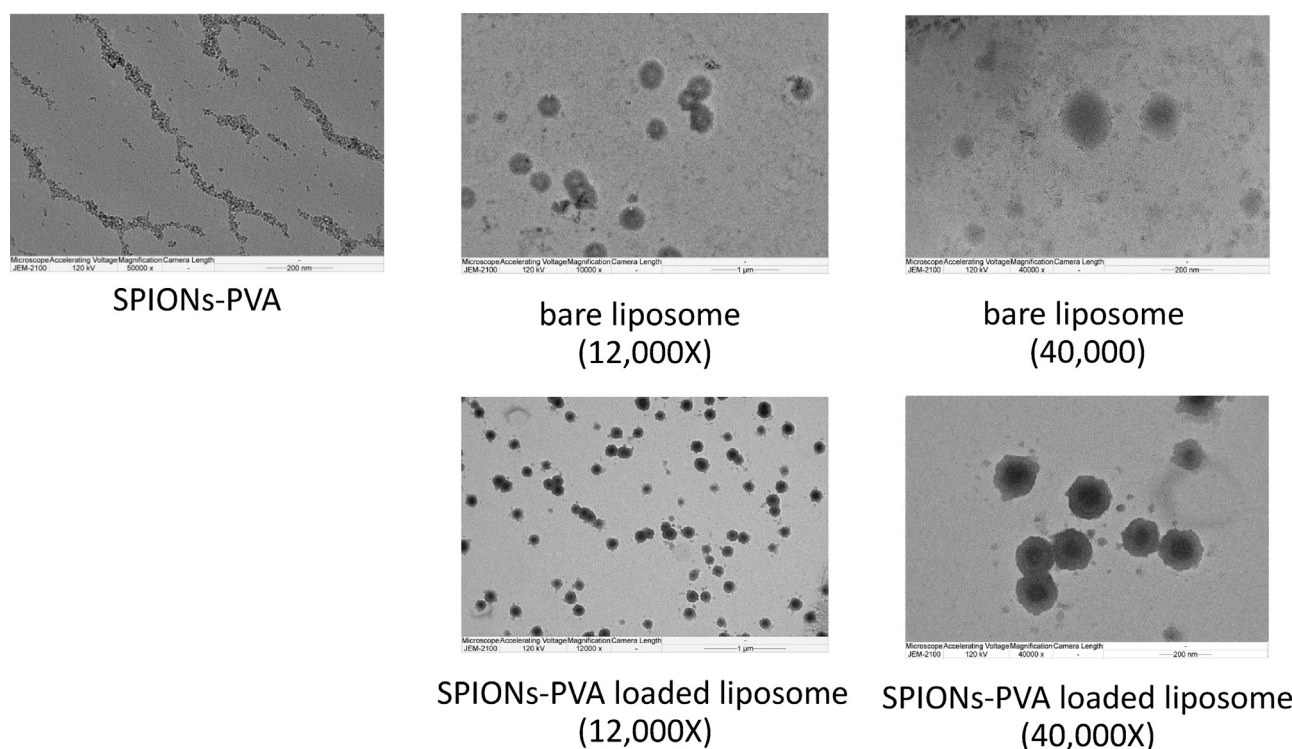


Fig. 1. SPIONs-PVA, liposome morphologies magnified by TEM at 12,000 and 40,000 magnification as indicated.

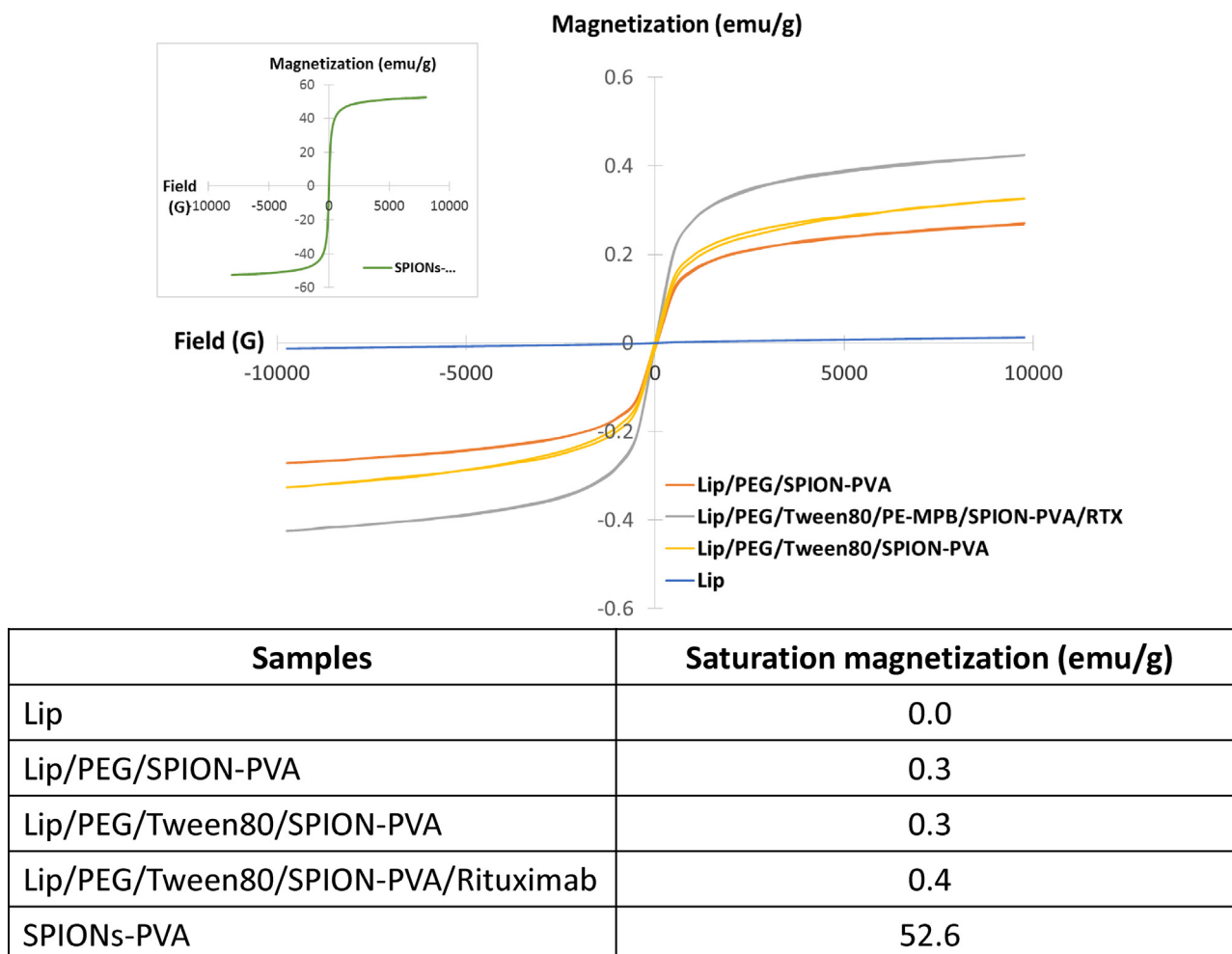


Fig. 2. Superparamagnetic properties of SPIONs-PVA, liposome and SPIONs-PVA-loaded liposome.

140–150 $\Omega \text{ cm}^2$ (approximately 7–10 days), after which the model was ready for use in testing. Testing involved loading either free RTX, Lip/PEG/Tween80/SPIONs-PVA or Lip/PEG/Tween80/SPIONs-PVA/RTX into separate apical compartments of the co-culture model, with final concentrations of RTX (17.5 $\mu\text{g/ml}$) coinciding with that of the IC_{50} of free RTX against Granta cells.

Determination of RTX concentrations in the membrane model was undertaken at set time points (1, 2, 3, 5, 7 and 24 h) using the PK ELISA Kit (MyBioSource, CA, USA), with harvesting of Granta cells at these times allowing evaluation of therapeutic effects. During the 24 h period, the TEER value was also monitored using a Millipore ERS-2 Voltammeter (Millipore, MA, USA) for analysis of the permeability efficiency.

2.12. MRI of mice bearing intracranial lymphoma xenografts

Approximately 1,000,000 cells in a volume of 10 μL were inoculated intracranially into five athymic nude mice (4–6 weeks old) to establish PCNSL model for preclinical experiments as previously described. Any mouse showing distress or neurological signs (lethargy, hemiparesis, ataxia or seizures) underwent MRI study approximately 48 h following tail vein injection of Lip/PEG/Tween20/SPIONs/RTX (100 μL ; SPION concentration of 0.3 mg/kg). Assessment was performed using an Ingenia 3 T human MRI (Philips, The Netherlands) with a wrist coil. T1 and T2 axial and coronal sequences were obtained. Mice were euthanized after MRI and brains were harvested for further analysis.

2.13. Statistical analysis

Data are presented as mean values $\pm$ standard deviation (SD). Differences among group means were determined by *t*-test followed by SPSS and *p*-values ($p < 0.05$) were taken as the level of significance.

3. Results and discussion

3.1. Morphology, physicochemical characterization and encapsulation efficiency

TEM was employed to observe sizes and morphologies of SPIONs-PVA, bare liposomes and SPIONs-PVA loaded liposomes. While all samples were dehydrated for imaging, the nanoparticles could be observed as having discrete spherical shapes (Fig. 1). Size averages estimated under TEM indicated that SPIONs-PVA nanoparticle was 7–10 nm with a narrow size distribution ($< 20 \text{ nm}$). Liposomes fabricated in the absence of added nanoparticles are spherical in shape but show slight, while SPIONs-PVA loaded liposomes exhibit a more pristine spherical profile as a result of tight cargo packing, and enhanced stability, under TEM voltage exposure.

Average hydrodynamic diameters, PDI and zeta potentials for bare, and SPIONs-PVA loaded liposomes were obtained using DLS, with data summarized in Table 1. In the absence of cargo, the diameters of Lip (control), Lip/PEG, Lip/Tween80,

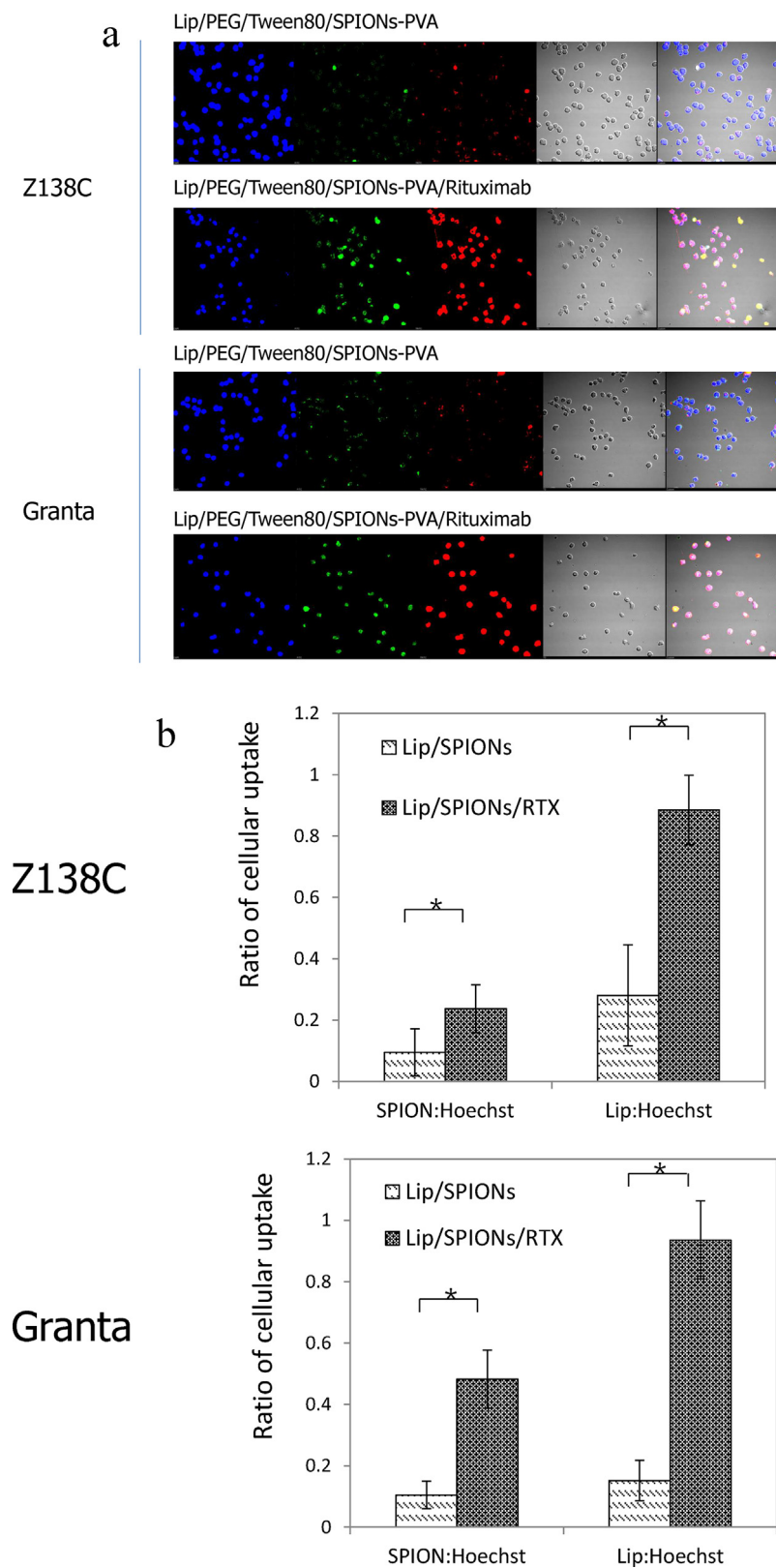


Fig. 3. Confocal imaging indicated liposome internalization in Z138c and Granta. Cell nuclei locations were indicated by Hoechst labeling (Blue), SPION nanoparticles were detected in green. Liposomes were labeled with Dil dye (Red). Signal intensities were detected after incubation of liposomes with cell for 2 h (a). Signal intensities of liposome entering into Z138c and Granta. (asterisk indicated the statistic difference (P-value < 0.05) (b)). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

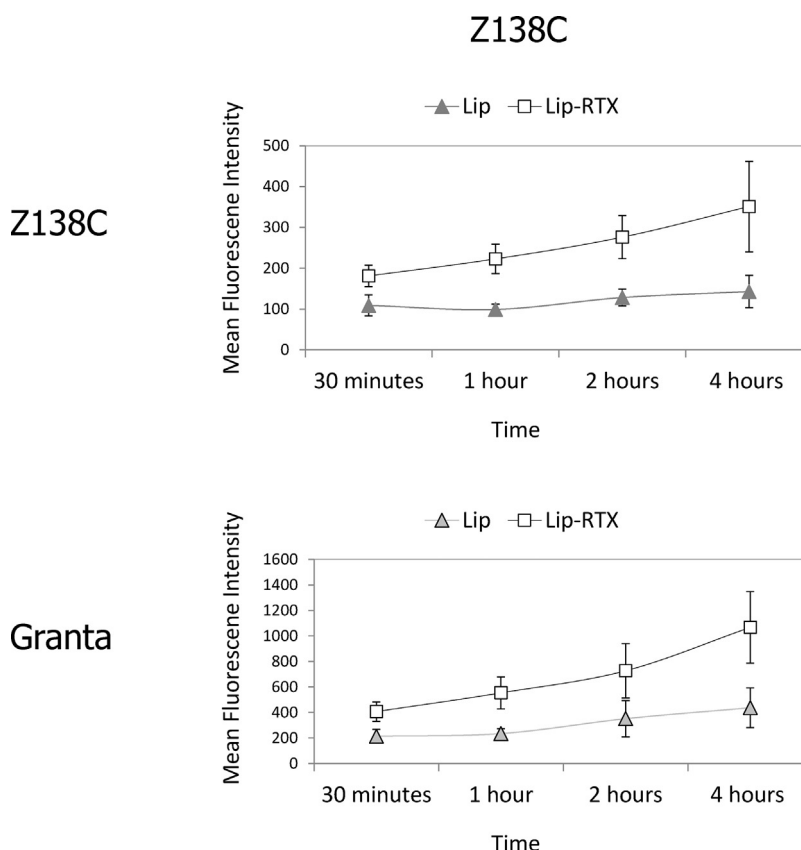


Fig. 4. Monitoring of liposome internalization in Granta and Z138c quantified by flow cytometry at 30 min, 1, 2 and 4 h. The data presented as a means fluorescence intensity detected in cells. (mean $\pm$ SD, $n = 3$).

Lip/PEG/Tween80 and Lip/PEG/Tween80/RTX liposomes were 141.9 ± 1.0 nm, 169.9 ± 11.3 nm, 161.0 ± 12.6 nm, 157.2 ± 9.1 nm and 182.0 ± 6.3 nm, respectively. Consistent with TEM results, loading of SPIONs-PVA induces liposome contraction, an effect perhaps related to strong hydrophilic interactions between liposome phospholipids and the PVA coating of SPIONs, which would underpin their stability under TEM conditions [31]. The PDI index of all liposomes, being in the range of 0.1–0.3, is indicative of homogeneity and narrow size distribution, which is again consistent with findings from TEM. Loading of SPIONs-PVA results in no significant changes in liposome surface charges. Surface modification of liposomes via RTX conjugation also did not affect their physicochemical properties: the zeta potential of bare liposome (Lip) was -0.1 mV, whereas that of Lip/PEG/Tween80/RTX became slightly negative (-7.2 mV) (Table 1).

SPIONs-PVA liposome loadings were quantified using the Prussian Blue assay as described in section 2.5. From this data encapsulation efficiencies (%EE) for each liposome formula were obtained (Table 1). A notable effect resulted from inclusion of Tween 80 into the liposome structure: this resulted in remarkably higher entrapment (higher %EE) of SPIONs-PVA relative to other liposome formulations. It is assumed that Tween80 incorporation into the film helps to promote liposome stability, and prevents egress of SPIONs-PVA during preparation [32].

3.2. Cytotoxicity of liposomes

In order to evaluate their safety, the toxicity of SPIONs-loaded liposome formulas was analyzed by MTT assay using Z138c as a lymphoma cell model. All liposomes showed concentration-dependent cytotoxicity, although no significant effects to cells were evident on exposure to bare SPIONs-PVA. Liposome solutions

having SPIONs-PVA concentrations less than 0.0025 mg/ml were considered safe, as exposure to these resulted in greater than 80% cell survival rates (Fig. S2). Higher cytotoxicities were found for Tween80 fabricated liposomes; addition of Tween 80 may enhance cellular uptake via ApoE ligand-mediated endocytosis [33]. However, for these systems cell viabilities are still in the acceptable range (over 70% viability) although optimization of liposome concentrations needs to be addressed to further their use in theranostic applications.

3.3. Stability of liposomes

In this study, we determined the stability of liposomes on storage at 4°C and 25°C . Particle diameter, PDI and zeta potential of Lip, Lip/PEG/Tween20/SPIONs and Lip/PEG/Tween20/SPIONs/RTX were measured periodically (1, 3 and 4 months) after storage (Table 1S). In regards to diameter and zeta potential of colloidal liposomes, for both temperatures all formulations were stable for up to 3 months. Liposome stability could be prolonged for a further month at 4°C , in contrast to results at 25°C which show dramatic changes in zeta potential during the 4th month of storage. This would indicate aggregation of liposome particles over time, as reflected by an increase in particle diameter. However, diameter increases, and zeta potential changes are less marked in Tween80 supplemented liposomes, the enhanced stability of these being consistent with previous work highlighting the use of Tween80 as a non-ionic surfactant to improve liposome stability [32]. However, the use of Tween80 needed to be optimized regarding to the toxicity of Tween 80 against B cell lymphoma as shown in Fig. S2. The optimization of the drug efficacy, cytotoxicity and drug stability need to be evaluated in the future for implementation.

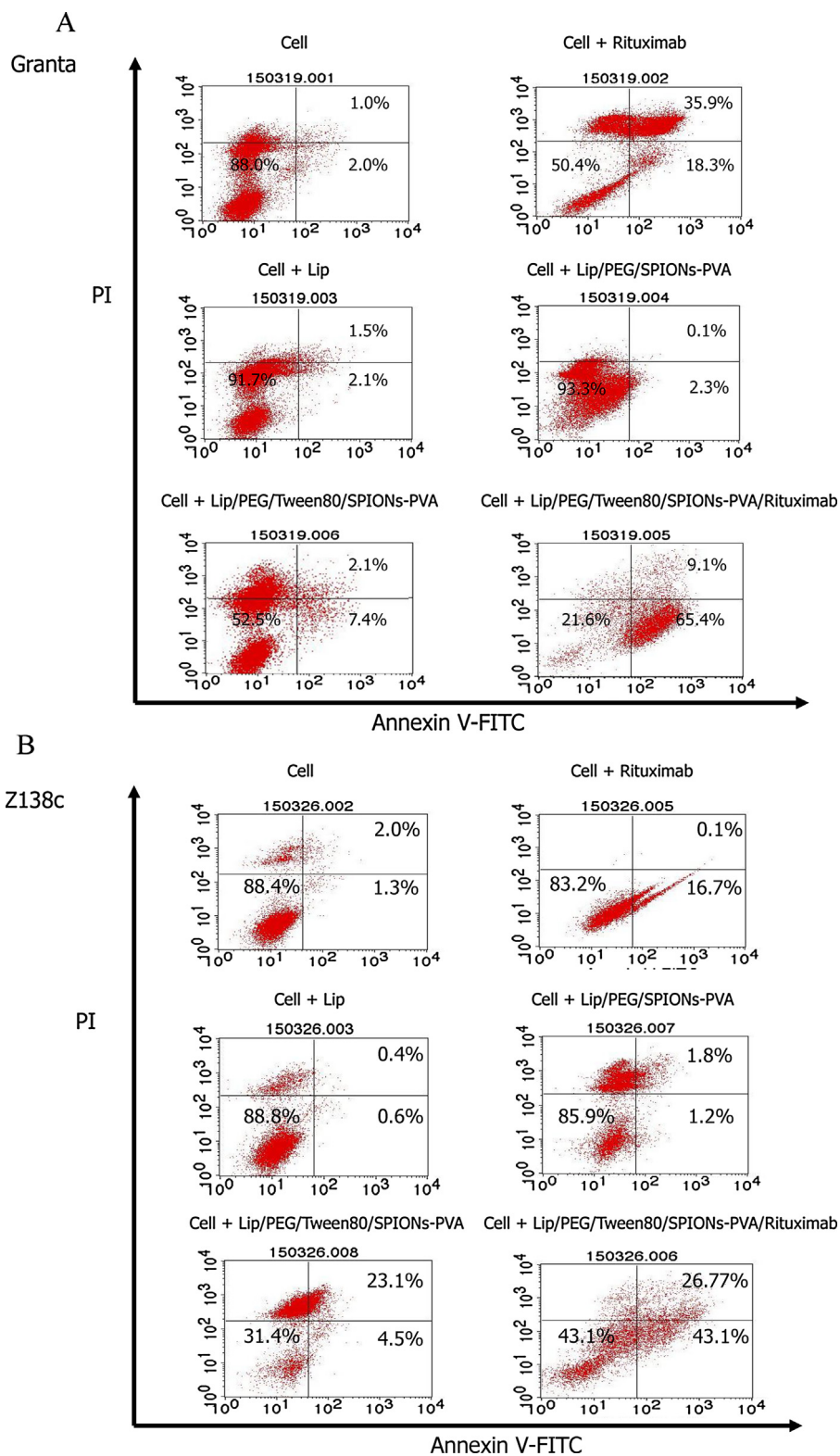


Fig. 5. Verification of therapeutic effect by apoptosis assay using flow cytometry in Z138c (a) and Granta (b).

3.4. Magnetic property analysis by vibrating scanning magnetometry (VSM)

Vibrating scanning magnetometry (VSM) was performed to confirm the superparamagnetic properties of SPIONs-loaded liposomes. Fig. 2 highlights magnetization curves, and saturation magnetization of SPIONs-PVA (inset in Fig. 2), and the series of

liposomes: Lip, Lip/PEG/SPION-PVA, Lip/PEG/Tween80/SPION-PVA, and Lip/PEG/Tween80/SPION-PVA/RTX. The hysteresis curves of SPIONs-loaded liposomes showed an absence of remanence, and this, in conjunction with the magnetization on average being zero, indicates that the SPIONs exhibit superparamagnetic behavior. Although the saturated magnetization value of SPIONs-PVA was found to be 52.6 emu/g, loading SPIONs-PVA into liposomes results

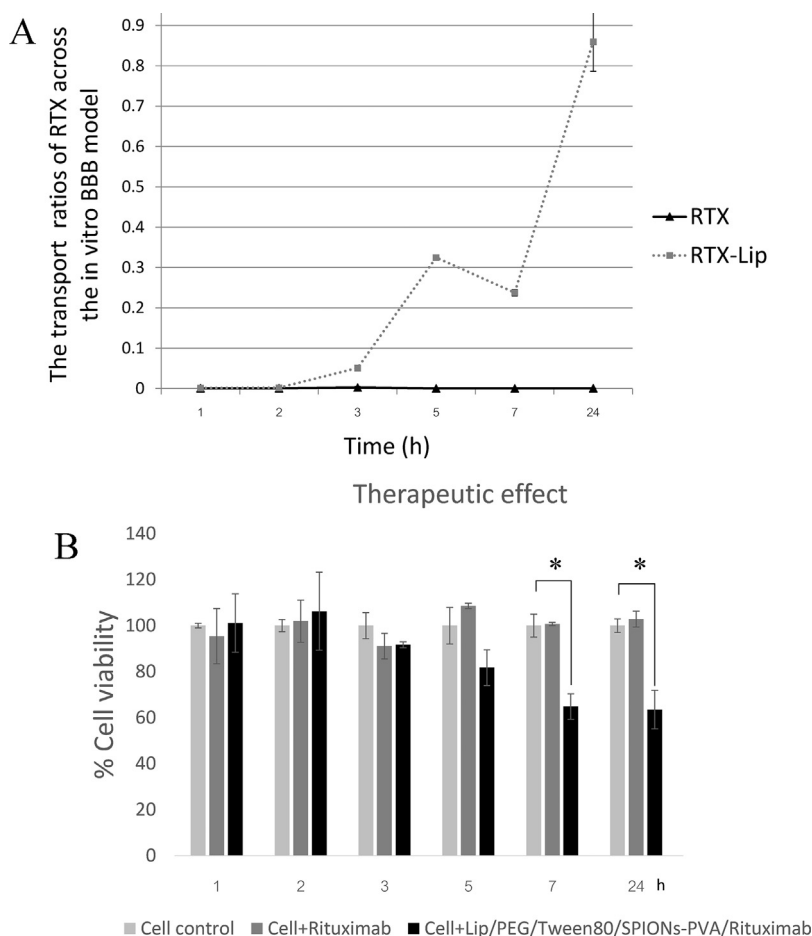


Fig. 6. Transportation ratio of RTX across BBB model observed at 1, 2, 3, 5, 7 and 24 h after application. (mean $\pm$ SD, $n = 3$) (a). Therapeutic effect of RTX delivered across BBB model on Granta cell indicated that RTX conjugated on liposome carrier effectively induced cytotoxic on cancer cells (asterisk indicated the statistic difference (P -value < 0.05) (b)).

in a drastic magnetization decrease (0.2–0.5 emu/g). This effect has been noted previously, for example in PVA coated magnetite magnetic [34], and silica coated magnetic nanoparticles [35]. The differences in saturation magnetization between colloidal magnetic nanocrystals and micelle- or polymer-encapsulated magnetic nanoparticles might depend on the amount of magnetic nanoparticles encapsulated inside the vesicles [36]. [36] In addition, the magnetization measurement is based on the mass of whole vesicles i. e. SPIONs-PVA loaded liposome which is at least 90% of the mass is not magnetic. Together with the increase of the vesicles size (from 8 nm of SPIONs-PVA to 120–160 nm of SPIONs-PVA loaded into Liposome), the magnetic response of the vesicles decrease resulting in dramatic decrease in the saturation magnetization of the vesicles. This magnetization range corresponds to those of SPIONs obtained from maghemite (γ -Fe₂O₃), the values of which are thought to be lower than those from magnetite (Fe₃O₄) [37]. These findings are a preliminary step in the characterization of these systems, however for actual implementation as theranostics further optimization of the magnetization value is necessary.

3.5. Liposome cellular internalization and uptake

Cellular uptake, and distribution of liposomes and SPIONs-PVA was monitored by confocal microscopy. Cells were treated with Lip/PEG/Tween80/SPIONs-PVA and Lip/PEG/Tween80/SPIONs-PVA/RTX, according to the protocol described in section 2.9. At

2 h post incubation, SPIONs-PVA were detectable within cells (as shown in green) by reflecting laser scanning (excitation at 488 nm) [38] while liposome nanoparticles appear red due to the presence of Dil (Fig. 3). Confocal imaging indicated that signal intensities of Lip/PEG/Tween80/SPIONs-PVA/RTX were significantly higher than those of Lip/PEG/Tween80/SPIONs-PVA, both in Z138c and Granta cell lines (Fig. 3a). The signal intensity data was quantified and confirm the statically differences (Supplementary material) (Fig. 3b). These results imply that conjugation of RTX promotes liposome internalization and provides evidence supporting that binding of RTX occurs selectively on CD-20 presenting lymphoma cells. Z-stack imaging analysis confirmed internalization of liposome. Cells was magnified to confirm the particle internalization under 60X (Fig. 3a and b).

To confirm targeting of RTX conjugates with CD-20 lymphoma cells, we then monitored the cellular uptake of liposomes quantitatively by flow cytometry. Lip/PEG/Tween80/SPIONs-PVA and Lip/PEG/Tween80/SPIONs-PVA/RTX were incubated with cultured cells, and uptake was monitored at times of 30 min, 1, 2, and 4 h. The signal intensity was quantitated by flow cytometry analysis indicate that cellular internalization of liposomes is time-dependent (Fig. 4). In both Granta and Z138c cell lines the signal intensity from Lip/PEG/Tween80/SPIONs-PVA/RTX proved higher than that resulting from Lip/PEG/Tween80/SPIONs-PVA, which confirmed that RTX functions as a specific antibody for selective binding to anti-CD20 receptors in lymphoma cells.

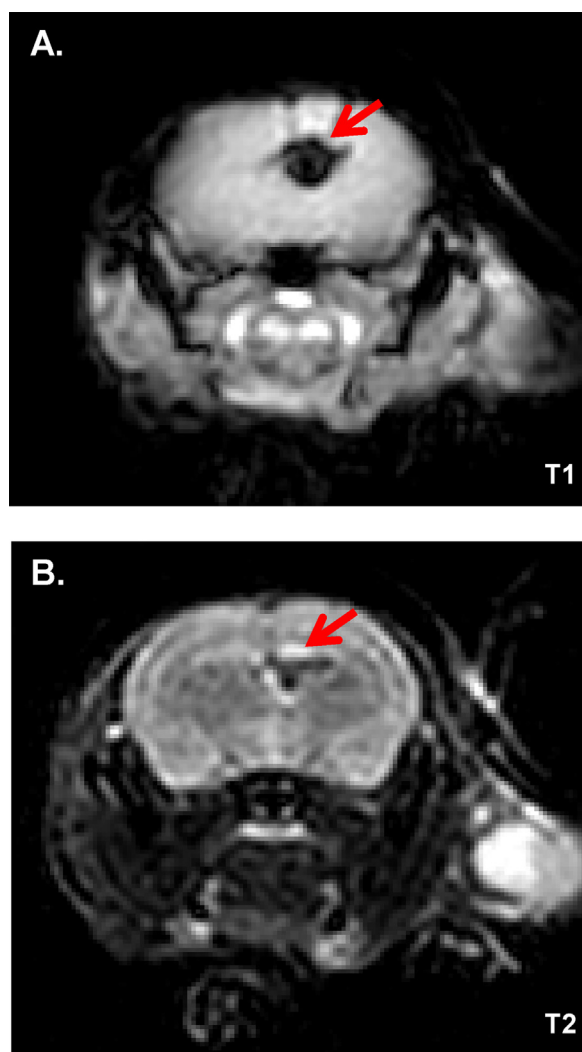


Fig. 7. SPIONs accumulation detected by T1 and T2-weight MRI in mice bearing intracranial lymphoma xenografts. (arrows indicated accumulated area).

3.6. Apoptosis induction by RTX conjugated liposomes

RTX is a mainstay in therapies for a broad variety of B-cell malignancies [39,40]. It induces direct apoptosis through binding to CD20 on the surface of lymphoma cells. In order to verify targeting, and therapeutic effects of Lip/PEG/Tween80/SPIONs-PVA/RTX, annexinV-FITC/PI staining was employed to monitor RTX-induced cell death. For this, Granta and Z138c cell lines were incubated with free RTX (7.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$), bare liposomes (Lip), Lip/PEG/SPIONs-PVA, Lip/PEG/Tween80/SPIONs-PVA and Lip/PEG/Tween80/SPIONs-PVA/RTX (at the IC_{80} concentration) for 24 h at 37 °C. Cells were then removed to determine the degree of apoptosis using flow cytometry. In Fig. 5a and b, the lower right quadrant shows annexin positive cells (early apoptotic stage) and the upper right quadrant shows annexin and PI positive cells (late stage apoptosis). Lip/PEG/Tween80/SPIONs-PVA/RTX induced apoptosis by a significantly high degree in both Granta and Z138c cells (by 65.4% and 43.1%, respectively), while free RTX resulted in lower levels of apoptosis induction (18.3% and 16.7% in Granta and Z138c cells, respectively). These results not only suggest that RTX exerts therapeutic effects, but also illustrates the effect of liposome conjugation on the efficacy of apoptosis induction. The presence of RTX on the surface of liposomes allows for advantageous binding with the target cells in addition to facilitating its cellular uptake, in line

with its role as a therapeutic agent. Notably, treatment of cells with RTX-free liposomes results in less than 10% apoptosis, suggesting that the carrier itself is relatively benign.

3.7. Transport of RTX across the BBB model

In order to demonstrate transportation of our formulated liposome across the BBB, an *in vitro* BBB model was established according to a previous protocol [30]. During the investigation (over 24 h), TEER values of the cell control were constantly maintained at 140–150 $\Omega \text{ cm}^2$. After model development, it was loaded with free RTX and Lip/PEG/Tween80/SPIONs-PVA/RTX, and these samples were allowed to pass the cell monolayer for a set time period. The extent of transported RTX was quantified by ELISA measurements at set time points, up to 24 h post-loading. The results revealed that free RTX is not readily transported through the BBB membrane, although liposomes act as a facile delivery system promoting cross-barrier transport (Fig. 6a). Tween 80 may play a crucial role in fabrication of this delivery system: previous work has highlighted its binding with ApoE on bEnd3 endothelial cells [33]. Concentrations of RTX detected across the membrane were time-dependent and were consistent with TEER values, except for the period at 5 h post incubation where the level of permeable RTX may have been affected by the charge on the bEnd3 endothelial membrane.

3.8. Evaluation of drug targeting therapeutic effect

As the ability of RTX to be transported across the BBB is a major factor dictating its therapeutic effects, the capacity of RTX to target Granta cells was evaluated in the BBB model by analysis of cellular viability. Free RTX and Lip/PEG/Tween80/SPIONs-PVA/RTX were loaded onto the BBB model, at an RTX concentration corresponding to the IC_{50} (17.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). At 24 h post incubation, Granta cells located at the basal layer were collected to evaluate cell viability, in comparison with the control. The results shown in Fig. 6b indicate that, during the incubation period, no therapeutic effects relating to free RTX were observed. In contrast, exposure to RTX-conjugated liposomes resulted in toxic effects after 5 h exposure with the targeting cell, with the level of toxicity being time-dependent. This result confirmed that effective delivery of RTX across the BBB requires a delivery system, and accordingly modified liposomes may be considered as an appropriate vehicle for promoting therapeutic effects.

3.9. MRI of intracranial lymphoma by Lip/PEG/Tween20/SPIONs/RTX

To investigate the potential for clinical use of Lip/PEG/Tween20/SPIONs/RTX to detect CNS lymphoma, we exploited the MRI to detect SPIONs in mice bearing intracranial lymphoma xenografts. Robust hypointense signal was observed on both T1- and T2-weighted sequences in the lymphoma xenografts approximately 48 h following intravenous injection of anti-CD20-liposome-SPIONs (Fig. 7). This signal abnormality was consistent with iron accumulation in the tumor and lent a support that our liposome-SPIONs with RTX conjugation may represent a new diagnostic approach for central nervous system lymphoma. Of note, there were no side effects such as behavioral changes observed in mice that received intravenous injection of Lip/PEG/Tween20/SPIONs/RTX.

4. Conclusion

This is the first theranostic nanoparticle specifically developed for CNS lymphoma. This nanoparticle system consists of liposome containing SPION (for tracking and treatment monitoring)

functionalized with RTX (for specific targeting and treatment) and coated with a surfactant, tween 80 (to improve BBB penetration). We have successfully demonstrated that it can cross the blood-brain barrier and exert anti-lymphoma activities in an in vitro model. Preliminary imaging studies have confirmed that our nanoparticles can localize at human lymphoma xenografts in the brain of immunocompromised mice following systemic administration. Taken together, this new nanoparticle system has high potential for clinical translation to use in patients in primary CNS lymphoma and CNS metastasis from systemic lymphoma that still represent unmet clinical needs.

Acknowledgements

This work has been supported by the Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University and the National Nanotechnology Center (NANOTEC), NSTDA, Ministry of Science and Technology, Thailand through its program of Center of Excellence Network. S.S. is partially supported by Siriraj Research Faculty Development Fund and N.S. is partially supported by the Thailand Research Fund (TRF) (grant number RSA5680041).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.11.003>.

References

- [1] A. Behin, et al., Primary brain tumours in adults, *Lancet* 361 (9354) (2003) 323–331.
- [2] K. Subsaï, et al., Neurological complications in AIDS patients receiving HAART: a 2-year retrospective study, *Eur. J. Neurol.* 13 (3) (2006) 233–239.
- [3] J.E. Olson, et al., The continuing increase in the incidence of primary central nervous system non-Hodgkin lymphoma, *Cancer* 95 (7) (2002) 1504–1510.
- [4] H.W. Tun, et al., Pathway analysis of primary central nervous system lymphoma, *Blood* 111 (6) (2008) 3200–3210.
- [5] T. Batchelor, J.S. Loeffler, Primary CNS lymphoma, *J. Clin. Oncol.* 24 (8) (2006) 1281–1288.
- [6] T. Birnbaum, et al., Successful long-term control of lymphomatous meningitis with intraventricular rituximab, *J. Clin. Neurosci.* 21 (2) (2014) 356–358.
- [7] E.R. Gerstner, et al., Long-term outcome in PCNSL patients treated with high-dose methotrexate and deferred radiation, *Neurology* 70 (5) (2008) 401–402.
- [8] T. Batchelor, et al., Rituximab monotherapy for patients with recurrent primary CNS lymphoma, *Neurology* 76 (10) (2011) 929–930.
- [9] J. Bicker, et al., Blood–brain barrier models and their relevance for a successful development of CNS drug delivery systems: a review, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 87 (3) (2014) 409–432.
- [10] V.K. Gribkoff, L.K. Kaczmarek, The need for new approaches in CNS drug discovery: why drugs have failed, and what can be done to improve outcomes, *Neuropharmacology* 120 (2017) 11–19.
- [11] J. Kreuter, Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47 (1) (2001) 65–81.
- [12] W.T. Al-Jamal, K. Kostarelos, Liposomes: from a clinically established drug delivery system to a nanoparticle platform for theranostic nanomedicine, *Acc. Chem. Res.* 44 (10) (2011) 1094–1104.
- [13] H.-P. Chen, et al., A novel micelle-forming material used for preparing a theranostic vehicle exhibiting enhanced in vivo therapeutic efficacy, *J. Med. Chem.* 58 (9) (2015) 3704–3719.
- [14] D. et al. Luong, Polyvalent folate-dendrimer-coated iron oxide theranostic nanoparticles for simultaneous magnetic resonance imaging and precise cancer cell targeting, *Biomacromolecules* (2017).
- [15] A. Luchetti, et al., Monoclonal antibodies conjugated with superparamagnetic iron oxide particles allow magnetic resonance imaging detection of lymphocytes in the mouse brain, *Mol. Imaging* 11 (2) (2012) p. 7290–2011 (00032).
- [16] P. Ramos-Cabrera, F. Campos, Liposomes and nanotechnology in drug development: focus on neurological targets, *Int. J. Nanomed.* 8 (2013) 951–960.
- [17] R.M. Adibhatla, J. Hatcher, K. Tureyen, CDP-choline liposomes provide significant reduction in infarction over free CDP-choline in stroke, *Brain Res.* 1058 (1) (2005) 193–197.
- [18] P. Ramos-Cabrera, et al., Serial MRI study of the enhanced therapeutic effects of liposome-encapsulated citicoline in cerebral ischemia, *Int. J. Pharm.* 405 (1) (2011) 228–233.
- [19] M. Kapoor, S.L. Lee, K.M. Tyner, Liposomal drug product development and quality: current US experience and perspective, *AAPS J.* (2017) 1–10.
- [20] Z.-L. Chen, et al., Transferrin-modified liposome promotes α -mangostin to penetrate the blood–brain barrier, *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 12 (2) (2016) 421–430.
- [21] Y.C. Kuo, P.R. Chou, Neuroprotection against degeneration of SK-N-MC cells using neuron growth factor-Encapsulated liposomes with surface cereport and transferrin, *J. Pharm. Sci.* 103 (8) (2014) 2484–2497.
- [22] Y.-C. Kuo, C.-T. Wang, Protection of SK-N-MC cells against β -amyloid peptide-induced degeneration using neuron growth factor-loaded liposomes with surface lactoferrin, *Biomaterials* 35 (22) (2014) 5954–5964.
- [23] H. Chen, et al., Lactoferrin-modified procationic liposomes as a novel drug carrier for brain delivery, *Eur. J. Pharm. Sci.* 40 (2) (2010) 94–102.
- [24] F. Xie, et al., Investigation of glucose-modified liposomes using polyethylene glycols with different chain lengths as the linkers for brain targeting, *Int. J. Nanomed.* 7 (2012) 163.
- [25] A. Lindqvist, et al., Enhanced brain delivery of the opioid peptide DAMGO in glutathione pegylated liposomes: a microdialysis study, *Mol. Pharm.* 10 (5) (2012) 1533–1541.
- [26] S. et al. Zanganeh, Iron oxide nanoparticles inhibit tumour growth by inducing pro-inflammatory macrophage polarization in tumour tissues, *Nat. Nanotechnol.* 11 (11) (2016) 986.
- [27] C. Strehl, et al., Effects of PVA-coated nanoparticles on human T helper cell activity, *Toxicol. Lett.* 245 (2016) 52–58.
- [28] A. Petri-Fink, et al., Effect of cell media on polymer coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): colloidal stability, cytotoxicity, and cellular uptake studies, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 68 (1) (2008) 129–137.
- [29] A.R. Murray, et al., Oxidative stress and dermal toxicity of iron oxide nanoparticles in vitro, *Cell Biochem. Biophys.* 67 (2) (2013) 461–476.
- [30] S. Imamura, et al., The blood–brain barrier permeability of geissoschizine methyl ether in *Uncaria hook*, a galenic constituent of the traditional Japanese medicine yokukansan, *Cell. Mol. Neurobiol.* 31 (5) (2011) 787–793.
- [31] M. Chastellain, et al., Superparamagnetic silica-iron oxide nanocomposites for application in hyperthermia, *Adv. Eng. Mater.* 6 (4) (2004) 235–241.
- [32] B. Kronberg, et al., Preparation and evaluation of sterically stabilized liposomes: colloidal stability, serum stability, macrophage uptake, and toxicity, *J. Pharm. Sci.* 79 (8) (1990) 667–671.
- [33] S. et al. Wagner, Uptake mechanism of ApoE-modified nanoparticles on brain capillary endothelial cells as a blood–brain barrier model, *PLoS One* 7 (3) (2012) e32568.
- [34] S. Kayal, R. Ramanujan, Doxorubicin loaded PVA coated iron oxide nanoparticles for targeted drug delivery, *Mater. Sci. Eng. C* 30 (3) (2010) 484–490.
- [35] W.-Y. Rho, et al., Facile synthesis of monodispersed silica-coated magnetic nanoparticles, *J. Ind. Eng. Chem.* 20 (5) (2014) 2646–2649.
- [36] H. Mok, M. Zhang, Superparamagnetic iron oxide nanoparticle-based delivery systems for biotherapeutics, *Expert Opin. Drug Deliv.* 10 (1) (2013) 73–87.
- [37] W. et al. Wu, Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications, *Sci. Technol. Adv. Mater.* 16 (2) (2015) 023501.
- [38] M.A. Shevtsov, et al., superparamagnetic iron oxide nanoparticles conjugated with epidermal growth factor (sPION-egF) for targeting brain tumors, *Int. J. Nanomed.* (2014) p. 273.
- [39] J.P. Deans, H. Li, M.J. Polyak, CD20-mediated apoptosis: signalling through lipid rafts, *Immunology* 107 (2) (2002) 176–182.
- [40] R.P. Taylor, M.A. Lindorfer, Analyses of CD20 monoclonal antibody-mediated tumor cell killing mechanisms: rational design of dosing strategies, *Mol. Pharmacol.* 86 (5) (2014) 485–491.



Cell-based assay for characterizing cell adhesion properties of active targeted nanoparticles under static and flow condition using an integrated flow chamber

Katawut Namdee, Mattaka Khongkow, Supawadee Boonthod, Suwimon Boonrungsiman, Suwatchai Jarussophon, Pawinee Pongwan, Teerapong Yata, Nattika Saengkrit*

National Nanotechnology Centre (NANOTEC), National Science and Technology Development Agency, Thailand



ARTICLE INFO

Keywords:

Drug delivery systems
Cancer chemotherapy
Drug targeting
Image analysis
Flow chamber

ABSTRACT

Nanoparticle targeting of cancer cell surface markers to allow the specific delivery of chemotherapeutic agents is an attractive concept in cancer treatment. Prior to *in vivo* studies, newly developed nanomedicines must be tested in preclinical *in vitro* models fully representative of physiological conditions. The aim of this study was to develop an *in vitro* method for characterizing the cell binding properties of active targeting nanoparticles, using an integrated flow chamber. Anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) antibody conjugated liposome/PLGA hybrid nanoparticles were generated, characterized, and utilized in binding studies with three different VEGF-positive cancer cell lines, in addition to VEGF-negative fibroblasts. Binding, and subsequent VEGF expression was examined through immunostaining, confocal microscopy and Western blot analysis. Our results indicated that targeted and non-targeted nanoparticles cannot be distinguished under static *in vitro* cell binding conditions, but that selective binding of targeted nanoparticles to VEGF-positive cells was more prominent under conditions of laminar flow. The flow chamber described herein thus provides a platform for cell-based assays, allowing effective evaluation of cell adhesion using active targeted nanoparticles.

1. Introduction

Over the last few decades development of cancer treatments based on nanoparticle systems for drug delivery has generated intense interest [1]. Such nanoparticle platforms can be categorized as organic-based (e.g., liposomes, nanoemulsions, and biodegradable polymeric nanoparticles), inorganic-based (e.g., metallic nanostructures, silica nanoparticles, quantum dots), or organic-inorganic hybrid systems [2]. Of these, liposomes are the most extensively used in nanomedicine, as a therapeutic model, drug carrier, or diagnostic tool [3].

Recent efforts have focused on developing active targeted nanoparticles, formulated by modifying nanoparticle surfaces with antibodies, peptides, oligonucleotides or aptamers [4]. Of these targeting molecules, immunoglobulins G (IgG) and their derivatives are the most widely used targeting ligands for liposomes, being able to be covalently attached without affecting liposome integrity, or antibody function [5]. These active targeted nanoparticles are promising delivery vehicles for chemotherapeutics in cancer treatment, being able to increase drug efficacy, reduce the required drug dosage, and minimize cytotoxic drug side effects by ensuring specific delivery of payload [6,7]. As a

consequence, numerous active targeted nanoparticle platforms are being developed [8], although these require preclinical *in vitro* screening under physiological conditions to ensure their safety prior to use.

The main purpose of this study was to evaluate the cell adhesion of active targeted nanoparticle. Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA)/liposome hybrid nanoparticles were used as the nanocarrier, along with humanized anti-vascular endothelial growth factor (anti-VEGF) antibody as a targeting moiety. The VEGF-conjugated PLGA/liposome hybrid system was generated. Cell adhesion and uptake were observed under static and laminar flow conditions in cancer cell compared to fibroblast. For the flow condition, the experiment was done using an integrated flow chamber which is an effective device to determine cell adhesion characteristics under shear stress imitated blood circulation condition.

* Corresponding author.

E-mail address: nattika@nanotec.or.th (N. Saengkrit).

<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.03.018>

Received 28 June 2017; Received in revised form 23 January 2018; Accepted 10 March 2018

Available online 13 March 2018

1773-2247/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

2. Material and methods

2.1. Synthesis of nanoparticles

PLGA nanoparticles were prepared using a double emulsion solvent evaporation method (W/O/W) whereby PLGA in dichloromethane (1% w/w) was added to 1% aqueous PVA solution, followed by stirring for 2 h. The obtained PLGA nanoparticles were purified by centrifugation at 5313 g for 10 min, followed by 17,712 g for 10 min. The pelletized nanoparticles were collected and washed twice with PBS (pH 7.4) prior to freeze drying and storage at -20°C . Passive loading of PLGA nanoparticles into liposomes was carried out using a thin film hydration method (70 mg of lecithin and 0.1 mg of MPB-PE in 30 ml of diethyl ether), as previously described [9]. Conjugation of PLGA/liposome hybrids with anti-VEGF antibodies was performed using Traut's reagent; antibodies were first thiolated with 2-iminothiolane and then reacted with maleimide-activated liposomes following the manufacturer protocol (ThermoScientific, IL, USA) [10,11]. Control PLGA/liposome hybrids were prepared in the same manner, although without conjugation with anti-VEGF antibodies. For analysis under fluorescence microscope, the lipid compartment of liposome was labeled with Dil dye tracer (Invitrogen, Paisley, UK). Throughout this paper, the term "VEGF-targeted nanoparticle" is used to refer to anti-VEGF conjugated PLGA/liposomes. The term "control nanoparticle" refers to non-conjugated PLGA/liposomes.

2.2. Physical characterization of nanoparticles

After dilution with distilled water, the hydrodynamic size of prepared nanoparticles was measured using dynamic light scattering (NanoZS4700 nanoseries, Malvern Instruments, Malvern, UK) and reported as Z-average (d.nm) $\pm$ standard deviation, for three replicate samples. Zeta potentials were also determined and are reported as the mean value $\pm$ standard deviation, for three replicate samples. Sizes and morphologies of neat nanoparticles were also investigated using transmission electron microscopy (TEM).

2.3. Cell cultures

All cancer and fibroblast cell lines were maintained in complete D-MEM medium (GIBCO Invitrogen, NY, USA), supplemented with 10% FBS (Biocrom AG, Berlin, Germany), Penicillin (100 units/ml), Streptomycin (100 g/ml) and L-glutamine (2 mM). All these antibiotics was from Invitrogen Corp. (NY, USA).

2.4. Determination of level of anti-VEGF immobilization

Flow cytometry (BD FACSAria II, BD Bioscience, San Jose, CA, USA) was utilized for quantification of targeting ligand surface densities. For this, nanoparticles were stained using anti-human IgG-FITC (Sigma, St. Louis, MO, USA) at a 1:128 dilution factor following the recommended protocol. This involved mixing the samples with IgG-FITC solution and subsequent incubation at room temperature for 1 h. After centrifugation at 12,000 rpm (room temperature) for 15 mins and twice washing with PBS, all samples were subjected to flow cytometry. The measured fluorescence signal intensity correlates directly with the level of bevacizumab conjugated sites on the nanoparticles, as calibrated using a bead fluorescence standard (Sphero Rainbow Calibration Particles, BD Bioscience, San Jose, CA, USA).

2.5. Western blot analysis

Whole-cell extracts, as required for electrophoresis [12], were obtained by lysis of cells in RIPA buffer (Invitrogen, CA, USA). Anti-VEGF antibody (ab46154) was purchased from Abcam (MA, USA). Anti- β -Actin (C4: sc-47778) antibody was purchased from Santa Cruz

Biotechnology (TX, USA). Primary antibodies were detected using horseradish peroxidase-linked anti-mouse, or anti-rabbit conjugates, as appropriate (Dako, Glostrup, Denmark), and visualized using the ECL detection system (Amersham Biosciences, Pollards Wood, UK). D-MEM medium was obtained from GIBCO Invitrogen (NY, USA), with fetal bovine serum (FBS) manufactured by Biocrom AG (Berlin, Germany). Penicillin, streptomycin and L-glutamine were purchased from Invitrogen Corp. (NY, USA).

2.6. Immunofluorescence staining and confocal microscopy

Cells from each cancer cell line were seeded, on separate rounded-glass slides (10,000 cells/slide), and left to culture for 2 days. Cells were then fixed with 4% paraformaldehyde (Thermo Scientific, IL, USA) for 15 min prior to washing three times with cold PBS. All cells were then permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS for 10 min, and then blocked with 5% BSA for 30 min at room temperature. After incubation with a 1:250 dilution of primary antibody anti-VEGF in 1 mg/ml BSA/PBS overnight at 4°C , the slides were washed twice with PBS and then stained with a 1:500 dilution of Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor[®] 488) in 1 mg/ml BSA/PBS (ab150077, Thermo Scientific, USA) for 1 h in the dark at room temperature. Cells were then washed twice with 1% BSA, then 10%FBS/PSB, prior to nuclear staining (1 h) with Hoechst 33258 (1:2500 in 1%BSA, 10% FBS in PBS) in the dark at room temperature. All slides were then washed twice with PBS and stored in the dark prior to analysis by fluorescent or confocal microscopy.

2.7. Parallel plate flow chamber fabrication

All cancer cell lines were seeded and cultured in 6-well plates until 90% confluency was reached, prior to experiments. The *in vitro* flow adhesion assay employed a parallel plate flow chamber (PPFC), equipped with silicone rubber gaskets forming the flow channel (GlycoTech, MD, USA). Nanoparticles in PBS buffer were added and allowed to flow through the chamber, as in previous studies [13,14]. In brief, the flow chamber utilized a single straight flow channel (125 μm height) which was placed over the cultured cancer cells and vacuum-sealed to the flow deck. The wall shear rate (γ_w ; WSR) in the system may be calculated from the volumetric flow rate (Q) according to the equation:

$$\gamma_w (\text{s}^{-1}) = \frac{6Q}{wh^2}$$

where h is the channel height (125 μm), and w represents the channel width (1000 μm). The assays were conducted under laminar flow conditions through the channel at a WSR of 100 s^{-1} [15].

2.8. Nanoparticle binding measurements

Nanoparticles suspended in flow buffer (1% BSA in PBS, fixed concentration of 6.5×10^6 particles/mL), were introduced into the flow channel from an inlet reservoir (WSR 100 s^{-1}) via a syringe pump (ProSence NE-1000, Oosterhout, Netherlands). After 10 min, the system was washed with excess flow buffer, and nanoparticle adhesion was observed using an Olympus IX71 inverted microscope fitted with a digital camera (Olympus DP71). Digital data recording was achieved using the DP manager/controller software. Static assays were undertaken for comparative purposes. Cell lines as well as fibroblasts were incubated with nanoparticles (identical concentration to flow assays), after which unbound particles were removed by washing (three times) with flow buffer prior to observation by fluorescence microscopy. A schematic diagram of the flow chamber setup and fluorescence microscope system is shown in Fig. 1.

Particle binding densities ($\#/\text{mm}^2$) were obtained by manual counting of bound particles on cells after 10 min of flow. The obtained number was then divided by the area of the field of view (20x

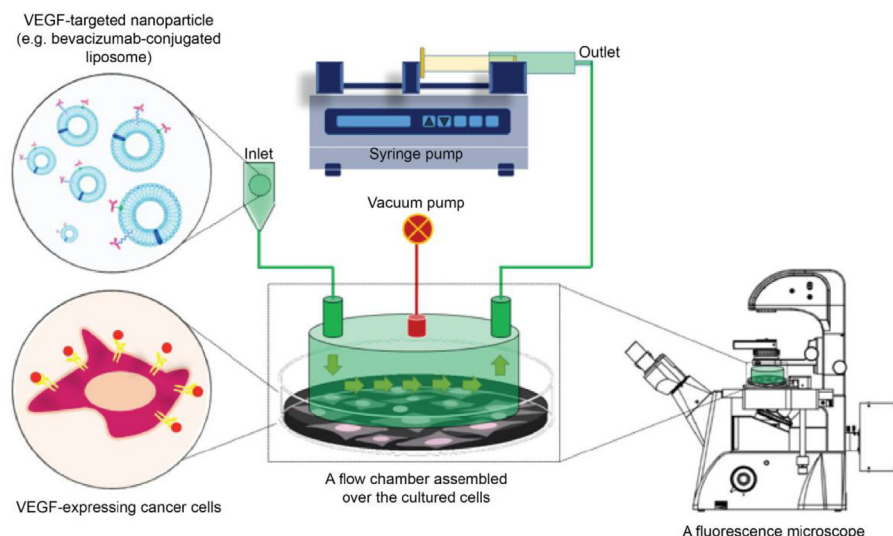


Fig. 1. Schematic diagram showing the arrangement of the flow chamber perfusion system. The instrument utilizes VEGF expressing cells cultured on a tissue culture plate. A flow chamber is then assembled over the cultured cells and VEGF-targeted nanoparticles are passed in flow over the cultured cells.

magnification, $A = 0.125 \text{ mm}^2$) [13]. In all experiments data was collected at a constant position, along the entire length of the chamber. Each data point thus represents an average binding density from at least three independent experiments, and includes at least 10 fields of view per experiment. Standard error bars were plotted unless otherwise stated. Differences in adhesion levels were analyzed using a student t-test, and one-way ANOVA with Tukey post-test. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Nanoparticle characterization

Hydrodynamic size-distributions of active targeted and control nanoparticles were analyzed by dynamic light scattering (Table 1). No significant differences in the hydrodynamic mean size were observed between VEGF-targeted and control nanoparticles, indicating that conjugation does not result in significant size increases. However, the zeta-potential of VEGF-targeted nanoparticles decreased in comparison with control nanoparticles, reflecting surface conjugation of the negatively charged anti-VEGF antibodies [16].

The surface density of conjugated anti-VEGF antibodies on nanoparticles was quantitatively determined by flow cytometry. As shown in Table 1, anti-VEGF antibodies were immobilized with high density on the surface of VEGF-targeted nanoparticles, but these were absent in the control, thus confirming successful surface modification.

TEM images of control, and anti-VEGF antibody conjugated nanoparticles are shown in Fig. 2. The average size of prepared nanoparticles was approximately 350 nm, although no morphological differences

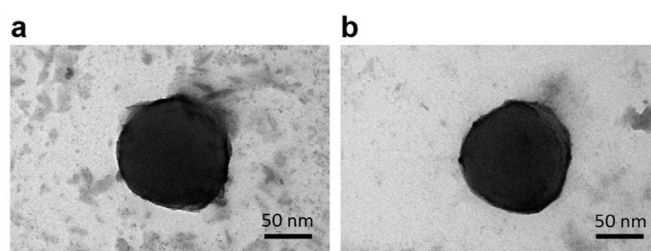


Fig. 2. TEM images of a) control (non-targeted), and b) VEGF-targeted nanoparticles.

were evident between the control (Fig. 2a) and VEGF-targeted nanoparticles (Fig. 2b), which both appear roughly spherical in appearance.

3.2. Analysis of VEGF protein expression in fibroblast and cancer cell lines

Western blotting was exploited to assess VEGF protein expression, specifically to allow comparisons between normal fibroblast cell lines and cancer cells. As shown in Fig. 3a, VEGF expression in fibroblast cells was significantly lower than in cancer cell lines. Therefore, we used fibroblasts as a representative of VEGF-negative cells in further experiments. VEGF expression was also confirmed by confocal microscopy (Fig. 3b), and in accordance with Western blot results, images revealed much higher expression in cancer cells over that in fibroblasts. Moreover, Z-stack images (as determined using ImageJ software) confirmed high VEGF expression levels in all cancer cell lines, in contrast to very low or barely detectable levels in normal fibroblast cells. To further verify these findings, immunofluorescence staining of cells was performed, which, on imaging, revealed significantly higher intensity fluorescent signaling profiles in cancer cells than in primary fibroblasts. Profiles of VEGF expression were calculated as an area average of fluorescence intensity, from 3 different fields. From this, VEGF expression profiles in HT29, Hela, A549 cancer cell lines were approximately 250, 200, 150 and 149, respectively, whereas fibroblasts exhibited far lower signaling levels (around 25) (Fig. 3c).

3.3. Effect of applied flow environment on kinetics of nanoparticle adhesion to VEGF-expressing cancer cells

To study the binding of nanoparticles to cancer cells, anti-VEGF conjugated nanoparticles in flow buffer were exposed to cultured cells under laminar flow through PPFC, and in comparative fashion under

Table 1
Hydrodynamic size, polydispersity index, and zeta-potential of prepared nanoparticles, and surface density of anti-VEGF antibodies. Nanoparticles were either unmodified (non-targeted) or conjugated (targeted) with anti-VEGF antibodies. Results are stated as averages $\pm$ standard deviations (SD).

Sample	Z-average (d.nm)	PDI ^a	zeta-potential (mV)	anti-VEGF Density ^b (sites/ μm^2)
Targeted	340.63 $\pm$ 0.59	0.30 $\pm$ 0.01	−1.24 $\pm$ 0.01	1700
Non-targeted	356.83 $\pm$ 3.91	0.35 $\pm$ 0.04	−0.39 $\pm$ 0.05	–

^a PDI-Polydispersity Index.

^b Density of surface ligands (anti-VEGF) as determined by flow cytometry.

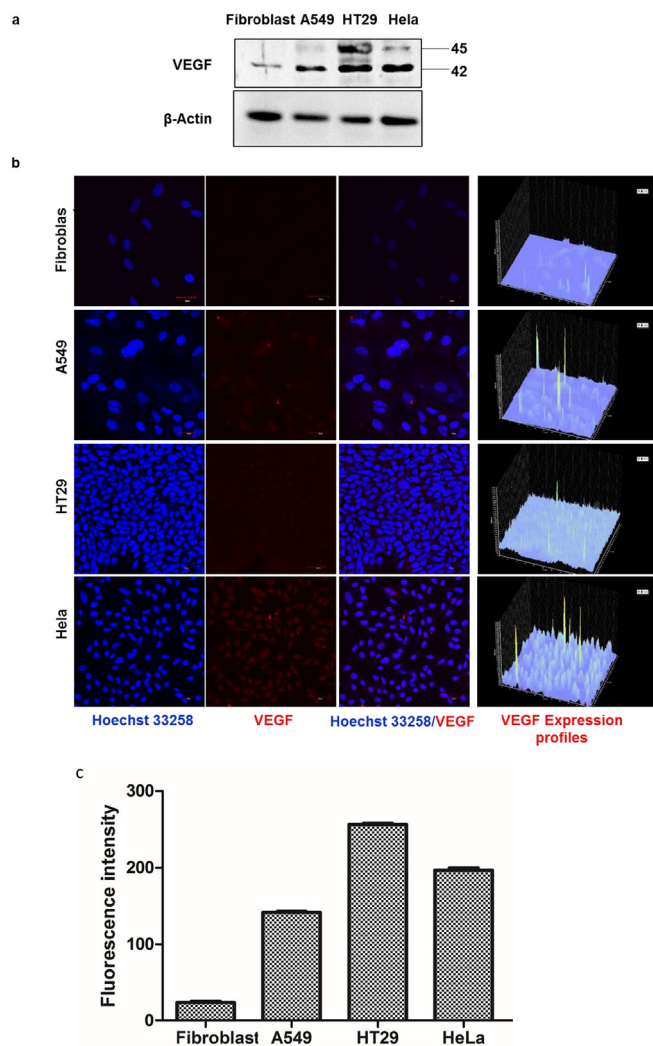


Fig. 3. Analysis of VEGF protein expression in three different cancer cell lines and fibroblasts. (a) Western blot analysis, (b) Representative images from confocal microscopy highlighting VEGF expression (first three columns). Nuclei are stained blue, and cells testing immunopositive for VEGF are red. Quantification of the VEGF expression level from Z-stack images using ImageJ software (the last column) (c) Quantification of fluorescence intensity for different cancer cell lines in comparison with fibroblasts. (A549 = lung carcinoma, HT29 = colorectal adenocarcinoma, and HeLa = cervical adenocarcinoma). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

static conditions. Overall, adhesion levels of targeted nanoparticles were significantly higher than those of non-targeted particles, for all cancer cell lines (Fig. 4a). HeLa cells exhibited highest binding levels ($110 \text{ \#}/\text{mm}^2$), while A549 and HT29 cell lines showed lower affinity for targeted particles ($44 \text{ \#}/\text{mm}^2$). The variations in degree of VEGF expression shown by different cancer cell lines are suggestive of disparities in the mode of interaction of these cell types with anti-VEGF conjugated nanoparticles under conditions of laminar flow.

In contrast (Fig. 4b), no differences in cellular adhesion were evident between active targeted and control nanoparticles under static conditions. However, overall binding densities under these conditions proved higher than those found in flow assays, due to the longer exposure time in the static environment, and absence of shear forces occurring in flow which could lead to particle detachment.

To further examine the targeting efficiency of anti-VEGF nanoparticles, the results discussed above were expressed as a ratio of targeted particle binding to that of non-targeted nanoparticles, shown in Fig. 5. Primary fibroblasts were employed as a control due to their low level of VEGF expression. From these results, the adhesion of targeted

nanoparticles was 3.8–4.9 times higher relative to non-targeted nanoparticles. Interestingly, no statistical significance of these ratios was observed among cancer cell lines, implying that nanoparticles show consistency in targeting efficiency for these cancer cell line, irrespective of differences in binding profiles. The targeting efficiency is dependent on anti-VEGF antibody surface site density as well as molecular interactions between antibodies and VEGF proteins on the cell surface.

4. Discussion

Advances in nanotechnology and cancer biology have led to the development of various nanocarrier-mediated anticancer agents. [17] A preclinical model that can accurately mimic physiological conditions is of utmost importance for evaluating interactions between these nanoengineered particles and their targeted cells [18–20].

It is well established that shear stress generated by blood flow in our circulatory system can lower the binding capacity of nanoparticle systems, reducing their therapeutic efficacy [21]. Enabling strong and selective binding of these nanoparticles is thus of great importance to their use in intravenously administered nanomedicines.

Cell-based assays to assess binding efficacies and selectivity have been developed for nanoparticle screening, in order to avoid large-scale and cost-intensive animal testing [22]. However, the static nature of these standard methods captures only certain aspects relevant to the *in vivo* environment. Accordingly, recent emphasis has been placed on utilizing microfluidic devices as a versatile tool to complement conventional assays [23–25].

One extensively used approach for targeted anti-cancer drug delivery takes advantage of elevated levels of VEGF expression in tumors. VEGF has been found in several tumor types, as well as tumor-associated endothelial cells during formation of new capillary blood vessels (angiogenesis) [26]. Therefore, the significance of VEGF in affecting tumor progression has made this process an appealing target for therapies related to these tumor types [27]. Several VEGF-targeted agents have been shown to benefit patients with advance-stage malignancies [28], with nanocarrier-mediated delivery of chemotherapeutics targeting VEGF, and applications of VEGF related molecular imaging being of interest [29]. A number of previous studies have demonstrated the use of VEGF-targeted nanoparticles as contrast agents for cancer detection and diagnosis [30], and as vehicles for the delivery of therapeutic agents for cancer treatment [31,32]: in both cases nanoparticle accumulation occurs in tumours expressing VEGF.

Herein, we present a simple and self-contained flow chamber together with standard cell culture plates for assessment of VEGF-targeting drug delivery systems under dynamic flow conditions. The device utilizes VEGF-expressing cells cultured in a culture dish, over which a suspension of VEGF-targeted nanoparticles is passed in a flow chamber. This allows for association or dissociation kinetics to be studied, providing estimates of the targeting efficacy of the nanoparticles for VEGF protein.

We engineered two PLGA/liposome nanoparticle systems (control, and antibody conjugated VEGF-targeted nanoparticles), evaluated their interactions with several cancer cell lines under laminar flow, and compared the results with those from conventional static culture assays. A significant difference was apparent in how nanoparticles interact with cells under both conditions.

Under static conditions, we observed non-specific adhesion of control nanoparticles to a layer of confluent VEGF-expressing cells. A possible explanation for this observation is the sedimentation effect [33,34], where particles in close proximity to cells may sediment, resulting in non-specific adherence.

The main advantage of flow chamber cell culture over static conditions relates to its greater similarity to the cellular physiological microenvironment [35]. Many previous studies have demonstrated the utility of flow chambers to complement standard cell-based assays. Such culture systems can be employed for characterization of drug

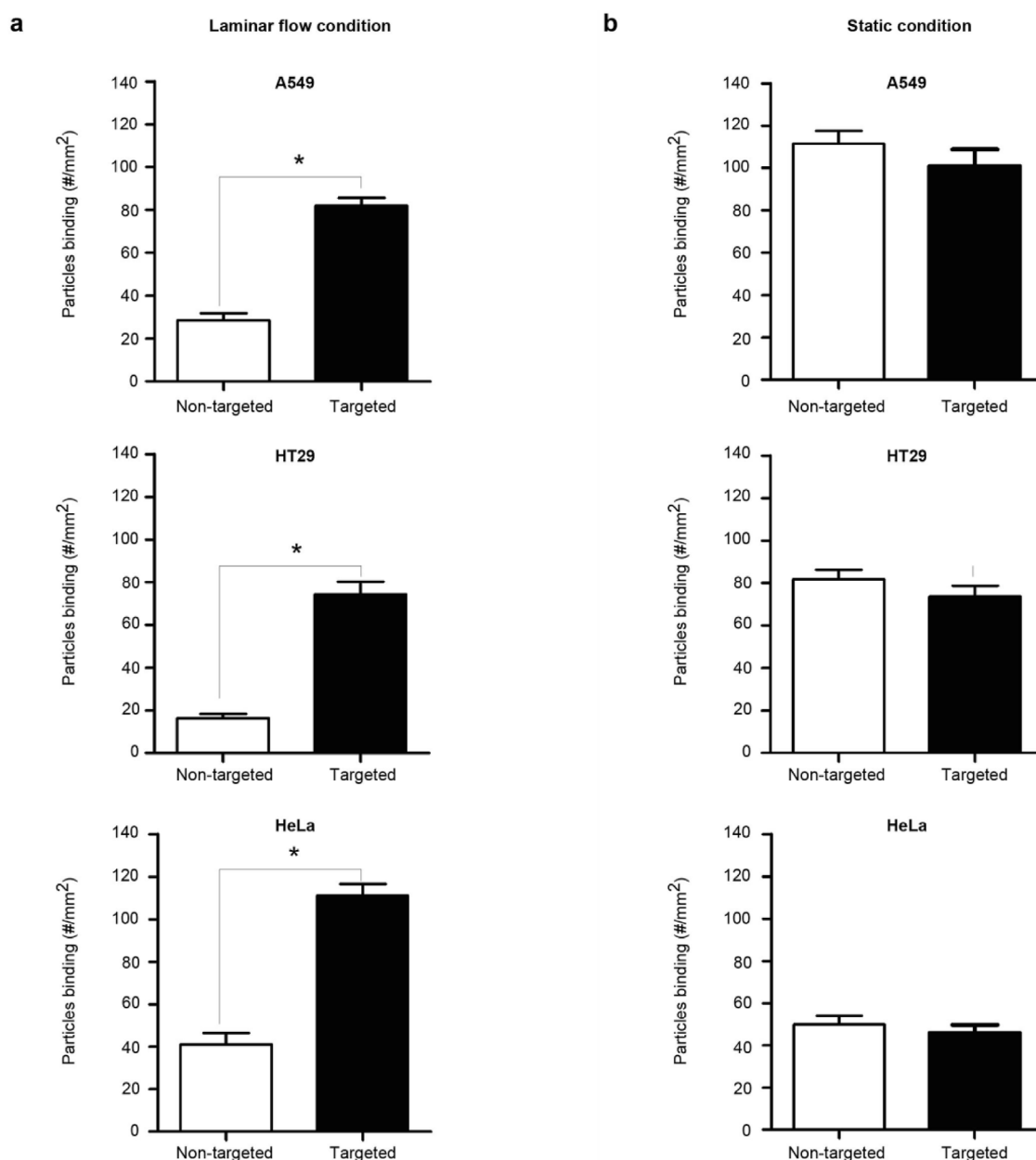


Fig. 4. Adhesion of nanoparticles to cancer cells under static or flow conditions.

VEGF-expressing cancer cells (A549, HT29, HeLa) were exposed to VEGF-targeted, or control, nanoparticles under flow conditions (a), or static conditions (b). Normal fibroblast cells were employed as negative control. Fluorescent labelling of nanoparticles allowed binding to cells to be visualized and analyzed by fluorescence microscopy. Particle concentration = 6.5×10^6 particles/mL. * = $p < 0.05$ relative to other groups via one-way ANOVA. $n \geq 3$.

absorption and evaluation of cytotoxicity [36], cell migration and invasion assays [37], and assessing cell-cell [38] and cell-particle interactions [39]. Specifically, the current study highlights how standard static cell assays can be complemented by an in-flow technique, which enables a more comprehensive assessment of the targeting ability of VEGF-targeted nanoparticles. Interestingly, our observations that VEGF-targeted nanoparticles were able to discriminate between targeted and non-targeted cells within the flow chamber suggests that laminar flow conditions may prevent non-specific binding via particle sedimentation, promoting desired specific interactions between anti-VEGF and VEGF proteins. The flow chamber device discussed here thus represents an appropriate cell-based method for evaluating the efficacy of VEGF-targeted drug delivery systems.

5. Conclusions

Nanoparticles which selectively bind to the VEGF protein can be used in diagnostic imaging and as vehicles for efficient anticancer drug delivery. We have developed anti-VEGF antibody conjugated nanoparticles which specifically bind to associated cancer cells. Liposomes, the most extensively used, and the most successful nanocarrier system for drug delivery known to date, were employed as carriers, in conjunction with the targeting anti-VEGF antibody. Anti-VEGF-conjugated liposomes were prepared, and their *in vitro* binding efficacy towards VEGF-expressing cancer cells was assessed under static, and flow, conditions. Results indicated that the prepared nanoparticles showed different levels of association with cells under each of these conditions. Additionally, nanoparticle-cell interactions under flow (shear stress) can be studied more efficiently than is possible under static conditions.

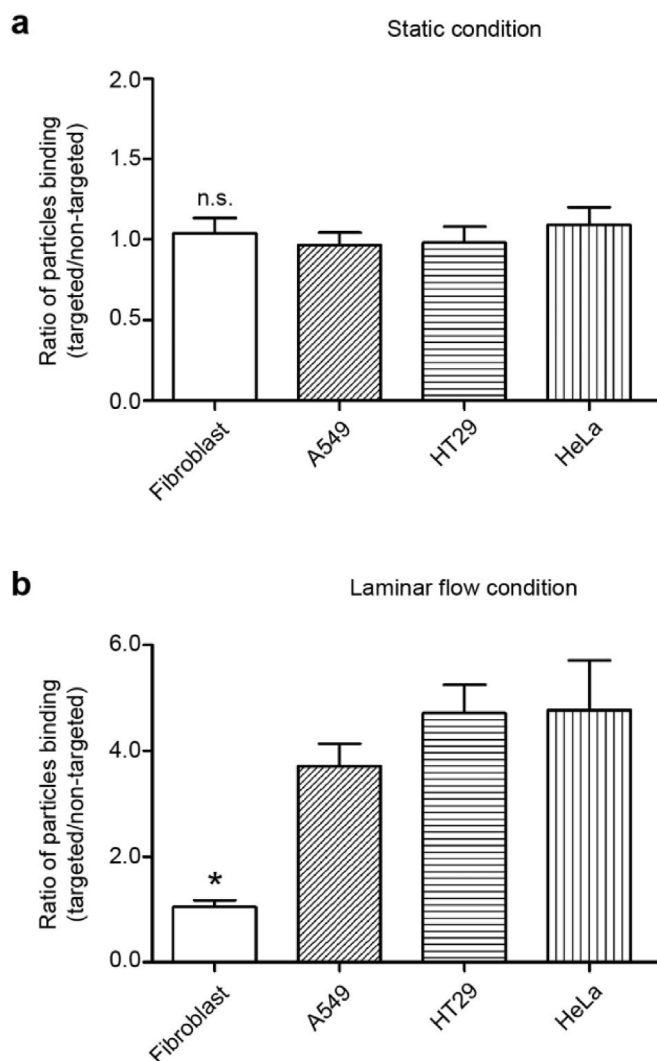


Fig. 5. Ratio of nanoparticle binding to cancer cell lines (targeted/non-targeted) under static or flow conditions.

Depiction of the ratio of particle binding (VEGF-targeted relative to control) in different cell lines with exposure condition. Primary fibroblasts were used as control. Particle concentration = 6.5×10^6 particles/mL. * = $p < 0.05$ relative to other groups via one-way ANOVA. $n \geq 3$.

Therefore, the flow model reported herein allows for more accurate information to be obtained from targeting assays, leading to potential improvements and optimization of cancer drug delivery systems prior to *in vivo* studies.

Disclosure

The authors declare no conflicts of interest in this work.

Acknowledgments

This research was financially supported by the Thailand Research Fund (TRF) (grant number RSA5680041), the National Nanotechnology Center (NANOTEC), and the National Science and Technology Development Agency (NSTDA, Thailand) (grant number P1300897).

References

- [1] T. Sun, Y.S. Zhang, B. Pang, D.C. Hyun, M. Yang, Y. Xia, Engineered nanoparticles for drug delivery in cancer therapy, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 53 (46) (2014) 12320–12364.
- [2] A.I. Lopez-Lorente, B.M. Simonet, M. Valcarcel, Analytical potential of hybrid nanoparticles, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (1) (2011) 43–54.
- [3] G. Bozzuto, A. Molinari, Liposomes as nanomedical devices, *Int. J. Nanomed.* 10 (2015) 975–999.
- [4] A.Z. Wang, F. Gu, L. Zhang, J.M. Chan, A. Radovic-Moreno, M.R. Shaikh, O.C. Farokhzad, Biofunctionalized targeted nanoparticles for therapeutic applications, *Expert Opin. Biol. Ther.* 8 (8) (2008) 1063–1070.
- [5] V.P. Torchilin, Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers, *Nat. Rev. Drug Discov.* 4 (2) (2005) 145–160.
- [6] F. Fay, C.J. Scott, Antibody-targeted nanoparticles for cancer therapy, *Immunotherapy* 3 (3) (2011) 381–394.
- [7] V.H. Shargh, H. Hondermarck, M. Liang, Antibody-targeted biodegradable nanoparticles for cancer therapy, *Nanomedicine (Lond)* 11 (1) (2016) 63–79.
- [8] J.D. Byrne, T. Betancourt, L. Brannon-Peppas, Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (15) (2008) 1615–1626.
- [9] N. Saengkrit, S. Saesoo, W. Srinuanchai, S. Phunpee, U.R. Ruktanonchai, Influence of curcumin-loaded cationic liposome on anticancer activity for cervical cancer therapy, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 114 (2014) 349–356.
- [10] R. Jue, J.M. Lambert, L.R. Pierce, R.R. Traut, Addition of sulphydryl groups to *Escherichia coli* ribosomes by protein modification with 2-iminothiolane (methyl 4-mercaptobutyrimide), *Biochemistry* 17 (25) (1978) 5399–5406.
- [11] R.R. Traut, A. Bollen, T.T. Sun, J.W. Hershey, J. Sundberg, L.R. Pierce, Methyl 4-mercaptobutyrimide as a cleavable cross-linking reagent and its application to the *Escherichia coli* 30S ribosome, *Biochemistry* 12 (17) (1973) 3266–3273.
- [12] A. Essafi, A.R. Gomes, K.M. Pomeranz, A.K. Zwolinska, R. Varshochi, U.B. McGovern, E.W. Lam, Studying the subcellular localization and DNA-binding activity of FoxO transcription factors, downstream effectors of PI3K/Akt, *Meth. Mol. Biol.* 462 (2009) 201–211.
- [13] K. Namdee, D.J. Sobczynski, P.J. Onyskiw, O. Eniola-Adefeso, Differential impact of plasma proteins on the adhesion efficiency of vascular-targeted carriers (VTCs) in blood of common laboratory animals, *Bioconjugate Chem.* 26 (12) (2015) 2419–2428.
- [14] P. Charoenphol, S. Mocherla, D. Bouis, K. Namdee, D.J. Pinsky, O. Eniola-Adefeso, Targeting therapeutics to the vascular wall in atherosclerosis—Carrier size matters, *Atherosclerosis* 217 (2) (2011) 364–370.
- [15] K. Namdee, D.J. Sobczynski, P.J. Onyskiw, O. Eniola-Adefeso, Differential impact of plasma proteins on the adhesion efficiency of vascular-targeted carriers (VTCs) in blood of common laboratory animals, *Bioconjug. Chem.* 26 (12) (2015) 2419–2428.
- [16] S.K. Li, M.R. Liddell, H. Wen, Effective electrophoretic mobilities and charges of anti-VEGF proteins determined by capillary zone electrophoresis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 55 (3) (2011) 603–607.
- [17] J. Shi, P.W. Kantoff, R. Wooster, O.C. Farokhzad, Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities, *Nat. Rev. Cancer* 17 (1) (2017) 20–37.
- [18] A. Albanese, P.S. Tang, W.C. Chan, The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 14 (2012) 1–16.
- [19] A.E. Nel, L. Mader, D. Velegol, T. Xia, E.M. Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova, M. Thompson, Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface, *Nat. Mater.* 8 (7) (2009) 543–557.
- [20] R.A. Petros, J.M. DeSimone, Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications, *Nat. Rev. Drug Discov.* 9 (8) (2010) 615–627.
- [21] H.E. Abaci, Y.I. Shen, S. Tan, S. Gerecht, Recapitulating physiological and pathological shear stress and oxygen to model vasculature in health and disease, *Sci. Rep.* 4 (2014) 4951.
- [22] R. Edmondson, J.J. Broglie, A.F. Adcock, L. Yang, Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors, *Assay Drug Dev. Technol.* 12 (4) (2014) 207–218.
- [23] M. Bjornmalm, Y. Yan, F. Caruso, Engineering and evaluating drug delivery particles in microfluidic devices, *J. Control. Release* 190 (2014) 139–149.
- [24] E.K. Sackmann, A.L. Fulton, D.J. Beebe, The present and future role of microfluidics in biomedical research, *Nature* 507 (7491) (2014) 181–189.
- [25] P.M. Valencia, O.C. Farokhzad, R. Karnik, R. Langer, Microfluidic technologies for accelerating the clinical translation of nanoparticles, *Nat. Nanotechnol.* 7 (10) (2012) 623–629.
- [26] S. Shinkaruk, M. Bayle, G. Lain, G. Deleris, Vascular endothelial cell growth factor (VEGF), an emerging target for cancer chemotherapy, *Curr. Med. Chem. Anticancer. Agents* 3 (2) (2003) 95–117.
- [27] G. Niu, X. Chen, Vascular endothelial growth factor as an anti-angiogenic target for cancer therapy, *Curr. Drug Targets* 11 (8) (2010) 1000–1017.
- [28] L.M. Ellis, D.J. Hicklin, VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity, *Nat. Rev. Cancer* 8 (8) (2008) 579–591.
- [29] W.J. Hsieh, C.J. Liang, J.J. Chieh, S.H. Wang, I.R. Lai, J.H. Chen, F.H. Chang, W.K. Tseng, S.Y. Yang, C.C. Wu, Y.L. Chen, In vivo tumor targeting and imaging with anti-vascular endothelial growth factor antibody-conjugated dextran-coated iron oxide nanoparticles, *Int. J. Nanomed.* 7 (2012) 2833–2842.
- [30] M.A. Abakumov, N.V. Nukolova, M. Sokolsky-Papkov, S.A. Shein, T.O. Sandalova, H.M. Vishwasrao, N.F. Grinenko, I.L. Gubsky, A.M. Abakumov, A.V. Kabanov, V.P. Chekhonin, VEGF-targeted magnetic nanoparticles for MRI visualization of brain tumor, *Nanomedicine* 11 (4) (2015) 825–833.
- [31] G.M. Kuesters, R.B. Campbell, Conjugation of bevacizumab to cationic liposomes enhances their tumor-targeting potential, *Nanomedicine (Lond)* 5 (2) (2010) 181–192.
- [32] R.L. Lecaros, L. Huang, T.C. Lee, Y.C. Hsu, Nanoparticle delivered VEGF-A siRNA enhances photodynamic therapy for head and neck cancer treatment, *Mol. Ther.* 24 (1) (2016) 106–116.
- [33] E.C. Cho, Q. Zhang, Y. Xia, The effect of sedimentation and diffusion on cellular

- uptake of gold nanoparticles, *Nat. Nanotechnol.* 6 (6) (2011) 385–391.
- [34] J. Cui, M. Faria, M. Bjornmalm, Y. Ju, T. Suma, S.T. Gunawan, J.J. Richardson, H. Heidari, S. Bals, E.J. Crampin, F. Caruso, A framework to account for sedimentation and diffusion in particle-cell interactions, *Langmuir* 32 (47) (2016) 12394–12402.
- [35] S. Halldorsson, E. Lucumi, R. Gomez-Sjoberg, R.M. Fleming, Advantages and challenges of microfluidic cell culture in polydimethylsiloxane devices, *Biosens. Bioelectron.* 63 (2015) 218–231.
- [36] D. Gao, H. Li, N. Wang, J.M. Lin, Evaluation of the absorption of methotrexate on cells and its cytotoxicity assay by using an integrated microfluidic device coupled to a mass spectrometer, *Anal. Chem.* 84 (21) (2012) 9230–9237.
- [37] S. Vedel, S. Tay, D.M. Johnston, H. Bruus, S.R. Quake, Migration of cells in a social context, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (1) (2013) 129–134.
- [38] Q. Ramadan, H. Jafarpoorchehab, C. Huang, P. Silacci, S. Carrara, G. Koklu, J. Ghaye, J. Ramsden, C. Ruffert, G. Vergeres, M.A. Gijs, NutriChip: nutrition analysis meets microfluidics, *Lab a Chip* 13 (2) (2013) 196–203.
- [39] M. Bjornmalm, M. Faria, X. Chen, J. Cui, F. Caruso, Dynamic flow impacts cell-particle interactions: sedimentation and particle shape effects, *Langmuir* 32 (42) (2016) 10995–11001.

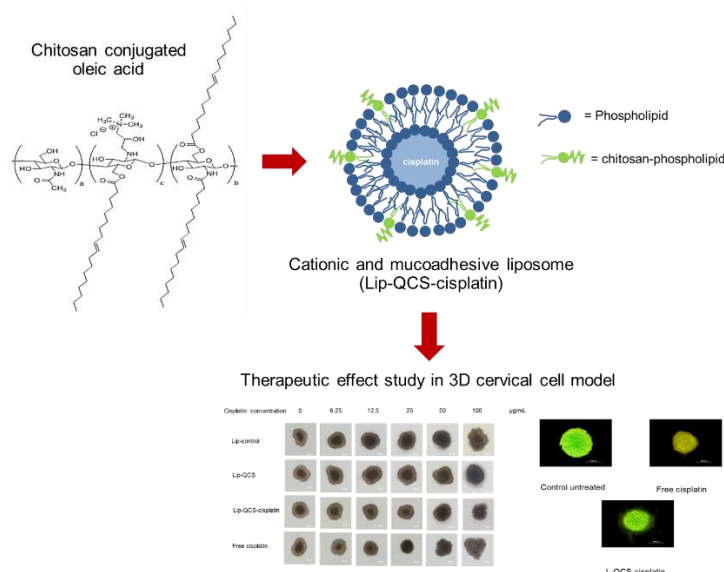
A hybrid System of Modified Chitosan and Liposome for Drug Delivery Against Cervical Cancer

Suphawadee Bunthot, Warayuth Sajomsang, Teerapong Yata,
Uracha Rungsardthong Ruktanonchai, Nattika Saengkrit

National Nanotechnology Center (NANOTEC), National Science and Technology
Development Agency (NSTDA), 111 Thailand Science Park, Pahonyotin Rd. Khlong
Luang, Pathumthani 12120, Thailand

Email address of presenting author: nattika@nanotec.or.th

In this study, we purposed the novel biomaterial nanocarrier, possessing cancer therapeutic effect against cervical cancer. An amphiphilic chitosan derivative, quaternized N,O-oleoyl chitosan (QCS) was designed and synthesized. QCS was incorporated into liposome vesicles, generating QCS-liposome (Lip-QCS). Cisplatin, a model drug, was loaded inside Lip-QCS. The multiple characteristics of Lip-QCS were studied including physicochemical property, mucoadhesive property and therapeutic effects. Encapsulation of a hydrophobic chemotherapy drug such as cisplatin was achieved, and its therapeutic effects demonstrated in 3D cervical cancer models. The result confirmed that the presence of QCS-chitosan on the liposome is able to promote the mucoadhesive properties, and allow for more efficient targeting at mucus membrane. Lip-QCS has the potential for use against cervical cancer as a component in vaginal formulations. In conclusion, the modified surface liposome has the potential to specifically target the nanoparticles to mucus-associated cancerous cells. This approach is applicable for the development of an effective drug delivery system for local or topical administration against cervical cancer which is a mucus-associated disease.



Fabrication concept of a hybrid modified chitosan and liposome generating Lip-QCS, a nanocarrier possesses mucoadhesive property. A Lip-QCS containing cisplatin showed the advantage in therapeutic of cervical cancer.

Liposome Surface Modifications for Selective Targeting in Cervical Cancer Drug Delivery

Nattika Saengkrit, Ph.D.

*National Nanotechnology Center (NANOTEC), National Science and Technology
Development Agency (NSTDA), Pathumthani 12120, Thailand*

Email: nattika@nanotec.or.th

Development of effective nanocarriers for drug delivery has become an important factor dictating advances in the field. Several types of nanocarriers having novel features aiding drug delivery to specific target sites, and to overcome biological barriers, have been designed. The advanced nanocarriers devised especially for tumor treatment include those that are stimuli-responsive, are active targeting, and have site-specific triggers for localized drug delivery. Many lipid and polymer-based nanoparticles have been studied as the basis for nanocarriers. Among lipid-based nanocarriers, liposomes are considered as the most conventional for use as drug carriers due to their practicality and biocompatibility, and the ability to regulate drug release. Additionally, both hydrophilic and hydrophobic drug cargo systems can be encapsulated within liposomes. However, liposomes have some limitations being that they are rapidly cleared and suffer from non-specific targeting, therefore, surface modification of these remains a key strategy for tailoring these for therapeutic use. Here, we purposed the novel liposomes for selective targeting against cervical cancer. Three different types of surface modified liposomes composed of a cationic, mucoadhesive and active targeting liposomes were generated. The efficiency of the delivery systems were evaluated by loading curcumin and cisplatin to investigate therapeutic effect.

Reference:

1. Saengkrit N, Saesoo S, Srinuanchai W, Phunpee S, Ruktanonchai UR. 2014. Influence of curcumin-loaded cationic liposome on anticancer activity for cervical cancer therapy. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 114:349-356.
2. Saesoo S, Bunthot S, Sajomsang W, Gonil P, Phunpee S, Songkhum P, Laohhasurayotin K, Wutikhun T, Yata T, Ruktanonchai UR, Saengkrit N. 2016. Phospholipid-chitosan hybrid nanoliposomes promoting cell entry for drug delivery against cervical cancer. *J Colloid Interface Sci*. 480:240-248.