

**DEVELOPMENT OF PROTEIN DELIVERY SCAFFOLDS WITH
A SEPARATE DRUG CARRIER SYSTEM FOR
BONE TISSUE REGENERATION**



Parintorn Hariraksapitak


A Dissertation Submitted in Partial Fulfilment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy
The Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University
in Academic Partnership with
The University of Michigan, The University of Oklahoma,
and Case Western Reserve University

2009


520192

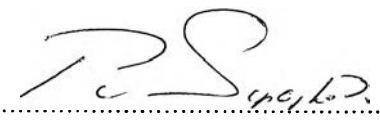
Thesis Title: Development of Protein Delivery Scaffolds with A Separate Drug Carrier System for Bone Tissue Regeneration
By: Parintorn Hariraksapitak
Program: Polymer Science
Thesis Advisors: Assoc. Prof. Pitt Supaphol
Assoc. Prof. Prasit Pavasant

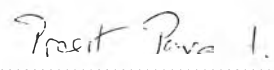
Accepted by the Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University, in partial fulfilment of the requirements for the Degree of Doctor of Philosophy.

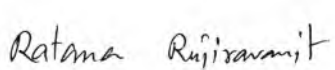

..... Dean
(Assoc. Prof. Pomthong Malakul)

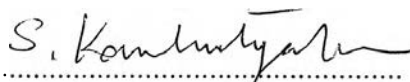
Thesis Committee:


.....
(Assoc. Prof. Pomthong Malakul)


.....
(Assoc. Prof. Pitt Supaphol)


.....
(Assoc. Prof. Prasit Pavasant)


.....
(Assoc. Prof. Ratana Rujiravanit)


.....
(Asst. Prof. Suttatip Kamolmatyakul)

ABSTRACT

4892002063: Polymer Science Program

Parintorn Hariraksapitak: Development of Protein delivery Scaffolds with a Separate Drug Carrier System for Bone Tissue Regeneration.

Thesis Advisor: Assoc. Prof. Pitt Supaphol and Assoc. Prof. Prasit Pavasant, 183 pp.

Keywords: Bone scaffolds/ Controlled release/ Bone protein/ Gelatin microspheres/ Poly(butylene succinate)/ α -chitin whisker

This study aimed to develop new drug delivery scaffolds to be used in tooth socket and investigate fabricating parameters which affect the desired characteristics of scaffold. Scaffolds of hyaluronan-gelatin (HA-Gel) blends and 1,6-diisocyanatohexane extended poly(1,4-butylene succinate) (PUSu-DCH) were fabricated by freeze-drying and particulate-leaching technique respectively. The α -chitin whiskers reinforced HA-Gel scaffolds exhibited variable behaviours by the different amount of whiskers adding. 2, 10, and 20-30% of whiskers improved strength, growth of bone cells, thermal resistance and biodegradation respectively whereas internal architecture and water absorption capability were not affected. The scaffold decelerated the release of crude bone protein at ~30-40% for the first 24 h when gelatin microspheres were integrated as a separate delivery device though the ionic interaction between molecule of protein and gelatin was not occurred by the absorptive protein loading method. The PUSu-DCH scaffold fabricated with salt particles of 200-400 μm at 35 wt% exhibited better mechanical, physical and biological properties than those at 25, 30 or 40 wt%, and controlled the release of serum protein as low as 20% of total within the first 24 h, under the condition of direct mix the protein with gelatin during the process of microspheres fabrication. The controlled release was simultaneously influenced by ionic interaction between molecules of gelatin and protein, proportion of HA and gelatin in the HA-Gel coating matrix and scaffolds' pore sizes. The designed scaffolds promisingly illustrated both scaffolding and controlled releasing functionalities for bone tissue regeneration.

บทคัดย่อ

ปริญทร หริรักษาพิทักษ์ : การพัฒนาโครงเนื้อเยื่อปลดปล่อยโปรตีนชนิดแยกตัวนำยา เพื่อใช้ซ่อมสร้างเนื้อเยื่อกระดูก (Development of protein delivery scaffolds with a separate drug carrier system for bone tissue regeneration) อ. ที่ปรึกษา: รศ. ดร. พิชญ์ สุภผล และ รศ. ดร. ประสิทธิ์ ภาสันต์ 183 หน้า

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาโครงเนื้อเยื่อปลดปล่อยยาชนิดใหม่ สำหรับใช้ซ่อมสร้างกระดูกเข่าฟัน และศึกษาถึงปัจจัยในการผลิตที่ส่งผลต่อคุณสมบัติของโครงเนื้อเยื่อที่ได้ โดยผลิตโครงเนื้อเยื่อจากวัสดุผสมไฮยารูโรแนน-เจลาตินด้วยวิธีแช่เยือกแข็ง-ระเหิด และจากโพลี 1,4 บิวทิลีนซัคซิเนตเชื่อมต่อด้วยไดไอโซไซยานาโตเฮกเซนด้วยวิธีกำจัดอนุภาคเกลือ พบว่าโครงเนื้อเยื่อไฮยารูโรแนน-เจลาตินที่เสริมแรงด้วยผลึกไคตินชนิดอัลฟา แสดงคุณสมบัติแตกต่างกันไปตามปริมาณผลึกไคตินที่เติม โดยผลึกไคตินปริมาณ 2, 10, และ 20-30% ทำให้คุณสมบัติของโครงเนื้อเยื่อดีขึ้นในด้านความแข็งแรง การยึดต่อการเจริญเติบโตของเซลล์กระดูก อุนสมบัติ และการย่อยสลายทางชีวภาพ ตามลำดับ แต่ปริมาณผลึกไคตินไม่มีผลต่อลักษณะโครงสร้างภายในโครงเนื้อเยื่อและความสามารถในการดูดซึมน้ำ โครงเนื้อเยื่อชนิดนี้สามารถควบคุมการปลดปล่อยโปรตีนที่สกัดจากกระดูกให้ช้าลง ~30-40% ภายใน 24 ชม.แรกได้ เมื่อสอดแทรกอนุภาคเจลาตินไมโครสเฟียร์ซึ่งเป็นตัวนำโปรตีนชนิดแยกส่วนไว้ภายใน ถึงแม้ว่าการบรรจุโปรตีนด้วยวิธีแพร่เข้าสู่อนุภาคเจลาตินไมโครสเฟียร์ภายหลังขึ้นรูปนั้น จะไม่เกิดการเกิดปฏิกิริยาออสโมนิกระหว่างโมเลกุลของโปรตีนกับเจลาตินก็ตาม ส่วนโครงเนื้อเยื่อโพลี 1,4 บิวทิลีนซัคซิเนตเชื่อมต่อด้วยไดไอโซไซยานาโตเฮกเซนที่ผลิตด้วยอนุภาคเกลือขนาด 200-400 ไมครอนในสัดส่วน 35% โดยน้ำหนักนั้น มีกล ายภาพ และชีวสมบัติที่ส่งเสริมการซ่อมสร้างกระดูกได้ดีกว่าสัดส่วน 25, 30 หรือ 40% และสามารถควบคุมการปลดปล่อยโปรตีนได้ในอัตราที่ต่ำกว่า 20% ของปริมาณโปรตีนทั้งหมดภายใน 24 ชม. แรก เมื่อบรรจุอนุภาคเจลาตินไมโครสเฟียร์ที่ผสมด้วยซีรัมโปรตีน ก่อนขึ้นรูปเป็นอนุภาคเข้าไปภายในโครงเนื้อเยื่อ ทั้งนี้การควบคุมการปลดปล่อยโปรตีนเป็นผลร่วมกันระหว่างการเกิดปฏิกิริยาออสโมนิกระหว่างโมเลกุลของโปรตีนกับเจลาติน สัดส่วนขององค์ประกอบในเมตริกวัสดุผสมไฮยารูโรแนน-เจลาตินที่ใช้ยัดอนุภาคเข้ากับโครงเนื้อเยื่อ และขนาดของรูพรุนในโครงเนื้อเยื่อ โครงเนื้อเยื่อที่ผลิตขึ้นสามารถทำหน้าที่เป็นทั้งตัวโครงเนื้อเยื่อและตัวปลดปล่อยยาสำหรับการซ่อมสร้างกระดูกได้ในเวลาเดียวกัน

ACKNOWLEDGEMENTS

Appreciation is expressed to those who have made contributions to this dissertation. First the author gratefully acknowledges his advisor, Associate Professor Pitt Supaphol and Associate Professor Prasit Pavasant, a debt of gratitude. They provide beneficial knowledge, suggestion, and counsel for the research. Their belief in my ability helped me study and work confidently right through success.

He gratefully acknowledges all faculty members and staffs at The Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University for their knowledge and assistance. Moreover she would like to give his special thanks to all members in his research group and all of his friends for their kind assistance

Asst. Prof. Pomthong Malakul, Assoc. Prof. Pitt Supaphol, Assoc. Prof. Prasit Pavasant, Assoc. Prof. Ratana Rujiravanit and Asst. Prof. Suttatip Kamolmatyakul are further acknowledged for being her dissertation committees, making valuable comments and suggestions.

He wishes to express her deep gratitude to her family for their unconditioned love, understanding and very supportive during all these years spent for his Ph.D. study.

Finally, he is grateful for the partial fund by the National Excellence Center for Petroleum, Petrochemicals, and Advanced Materials, the Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund Chulalongkorn University and Prince of Songkla University. I hereby express my appreciation for all valuable financial support.

TABLE OF CONTENTS

	PAGE
Title Page	i
Abstract (in English)	iii
Abstract (in Thai)	iv
Acknowledgements	v
Table of Contents	vi
List of Tables	viii
List of Figures	xii
Abbreviations	xix
 CHAPTER	
I INTRODUCTION	1
II LITERATURE REVIEW	5
III EXPERIMENTAL	18
VI MECHANICAL PHYSICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF SCAFFOLDS OF α-CHITIN WHISKERS REINFORCED HYALURONAN- GELATIN NANOCOMPOSITES	19
4.1 Abstract	19
4.2 Introduction	19
4.3 Experimental Section	22
4.4 Results and Discussion	27
4.5 Conclusion	36
4.6 Acknowledgements	36
4.7 References	36

CHAPTER		PAGE
V	DELIVERY OF CRUDE BONE PROTEIN FORM GELATIN MICROSPHERES AND MICROSPHERES INTEGRATED HYALURONAN- GELATIN BLENDED SCAFFOLD FOR BONE TISSUE REGENERATION	59
	5.1 Abstract	59
	5.2 Introduction	59
	5.3 Experimental Section	62
	5.4 Results and Discussion	67
	5.5 Conclusion	75
	5.6 Acknowledgements	75
	5.7 References	76
VI	EFFECTUAL DRUG-RELEASING POROUS SCAFFOLDS FROM 1,6-DIISOCYANATOHEXANE- EXTENDED POLY(1,4-BUTYLENE SUCCINATE) FOR BONE TISSUE REGENERATION	
	6.1 Abstract	91
	6.2 Introduction	91
	6.3 Experimental Section	93
	6.4 Results	99
	6.5 Discussion	102
	6.6 Conclusion	106
	6.7 Acknowledgements	107
	6.8 References	107

CHAPTER	PAGE
VII GELATIN MICROSPHERES IMPREGNATED POROUS SCAFFOLDS OF 1,6-DIISOCYANATOHEXANE- EXTENDED POLY(1,4-BUTYLENE SUCCINATE) FOR CONTROLLED RELEASE OF PROTEIN	129
7.1 Abstract	129
7.2 Introduction	130
7.3 Experimental Section	132
7.4 Results and Discussion	137
7.5 Conclusion	145
7.6 Acknowledgements	146
7.7 References	146
VIII CONCLUSION AND RECOMMENDATIONS	167
REFERENCES	170
CURRICULUM VITAE	183

LIST OF TABLES

TABLE		PAGE
CHAPTER II		
2.1	Growth factor commonly used in bone regeneration	8
CHAPTER IV		
4.1	Pores size of the α -chitin whiskers reinforced HA-Gel scaffolds determined from the transversal and longitudinal sections. a,b,c,d,e,f compared between sections of an individual specimen only at $p < 0.05$; One-Way ANOVA with Tukey HSD, $n = 50$	42
4.2	Mechanical properties of the α -chitin whiskers reinforced HA-Gel scaffolds. a,b,c,d compared among groups of specimen for a single property at $p < 0.05$; One-Way ANOVA with Dunnett T3, $n = 5$	43
4.3	Temperature ($^{\circ}\text{C}$) at 5, 25 and 50% weight loss (T-5%, T-25% and T-50% respectively) of the α -chitin whiskers reinforced HA-Gel scaffolds and the residual weight at 550 $^{\circ}\text{C}$	44
4.4	Indirect cytotoxicity evaluation of the as-prepared 0%CW and 30%CW HA-Gel scaffolds using human osteoblast cell line (SaOS-2). * $p < 0.05$; One-Way ANOVA Tukey HSD, $n = 4$	45
CHAPTER V		
5.1	Swelling ratio of the gelatin microspheres prepared with gelatin types A (a) and type B (b) at various pH	80

TABLE	PAGE
5.2 Encapsulating efficiency of the CBP and Loading capacity of the gelatin microspheres. a,b,c,d are significantly different at $p < 0.05$; One-Way ANOVA with Tukey HSD (Mean \pm SD, n=3)	81
5.3 Constant (k), releasing exponent (n) and correlation coefficient (r^2) of CBP release from gelatin microspheres and microspheres integrated HA-Gel scaffolds at three releasing intervals (n1,n2, and n3). k and n values were calculated with the least squares method	82
CHAPTER VI	
6.1 Porosity, pore volume, and pore size of the as-prepared PBSu-DCH scaffolds	111
6.2 Mechanical properties of the as-prepared PBSu-DCH scaffolds	112
6.3 Indirect cytotoxicity evaluation of the as-prepared 35xNaCl scaffolds using mouse calvaria-derived, pre-osteoblastic cells (MC3T3-E1)	113
6.4 Indirect cytotoxicity evaluation of the as-prepared 35xNaCl scaffolds using mouse calvaria-derived, pre-osteoblastic cells (MC3T3-E1) assessed with the LCH cytotoxicity assay	115
CHAPTER VII	
7.1 Encapsulating efficiency of the BSA-Rhod and Loading capacity of the as-prepared gelatin microspheres	153
7.2 Constant (k), kinetic exponent (n) and correlation coefficient (r^2) of the BSA-Rhod release for 24 h from gelatin microspheres	154

TABLE	PAGE
7.3 Constant (k), kinetic exponent (n) and correlation coefficient (r ²) of the BSA-Rhod release for 10 h from gelatin microspheres and BSA-Micros impregnated PBSu-DCH scaffolds	155

LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
CHAPTER II	
2.1	Process of gelatin production 13
2.2	Chemical structure of gelatin 14
2.3	Tetrasaccharide fragment of hyaluronan showing the disaccharide repeat units 14
2.4	Chemical structure (a) of chitin poly(N-acetyl-b-D-glucosamine) and (b) of chitosan (poly(D-glucosamine) repeat units 15
2.5	Chemical structure of Poly(1,4-Butylene Succinate) extended with 1,6-Diisocyanatohexane 17
CHAPTER IV	
4.1	Selected TEM images presenting the as-prepared chitin whiskers 46
4.2	Histogram illustrating distribution of the as-prepared chitin whiskers' length (a) and width (b) 47
4.3	The α -chitin whiskers reinforced HA-Gel nanocomposites scaffolds (The numbers symbolize wt% of chitin whiskers) 48
4.4	4.4.1 SEM images illustrating internal structure of the α -chitin whiskers reinforced HA-Gel scaffolds viewed on the transversal (1,3,5) and longitudinal section (2,4,6): (1,2) 0% CW, (3,4) 2% CW, (5,6) 5% CW 49
	4.4.2 SEM images illustrating internal structure of the HA-Gel scaffolds viewed on the transversal (7,9,11) and longitudinal section (8,10,12): (7,8) 10% CW, (9,10) 20% CW, (11,12) 30% CW 50

FIGURE	PAGE
4.5 Water absorption capability of the α -chitin whiskers reinforced HA-Gel scaffolds, at room temperature	51
4.6 Remaining weight of the α -chitin whiskers reinforced HA-Gel scaffolds after having been immersed in PBS or collagenase in various condition for 24 h. a,b,c, * at $p < 0.05$; One-Way ANOVA with Tukey HSD, $n = 4$	52
4.7 Infrared spectra of the gelatin, HA, α -chitin whiskers, and the α -chitin whiskers reinforced HA-Gel nanocomposites	53
4.8 TGA thermograms of the α -chitin whiskers reinforced HA-Gel scaffolds having different whisker contents, at 30-600°C, rate of temperature increase 10 °C/min, under N ₂ gas	54
4.9 DSC thermograms of the α -chitin whiskers reinforced HA-Gel scaffolds having different whisker contents, at 25-60°C, rate of temperature increase 10 °C/min, under N ₂ gas	55
4.10 Selected SEM images illustrating morphology of SaOS-2 that were seeded on the surface of the 30%CW HA-Gel scaffolds for 24 h. White arrows show the cytoplasmic processes of the cells	56
4.11 Selected SEM images illustrating morphology of SaOS-2 that were seeded on the surface of the 30%CW HA-Gel scaffolds for 7 days. White arrows show cells that fuse into the scaffolds	57
4.12 Evaluation of the SaOS-2 proliferation on the as-prepared 30%CW HA-Gel scaffolds *, +, #, $p < 0.05$; One-Way ANOVA Tukey HSD, $n = 4$	58

ABBREVIATIONS

HA	Hyaluronan, Hyaluronic acid
Gel	Gelatin
PBSu-DCH	poly(1,4-butylene succinate) extended with 1,6-diisocyanatohexane
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
CW	Chitin whisker
BSA-Rhod	Albumin from bovine serum conjugated with tetramethylrhodamine
CBP	Crude bone protein
IEP	Isoelectric point
PBS	Phosphate buffer saline
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
FBS	Fetal bovine serum
SFM	Serum-free medium
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide
DSC	Differential scanning calorimetry
TGA	Thermogravimetric analysis
SEM	Scanning electron microscope
TEM	Transmission electron microscope