

**CHITOSAN FUNCTIONALIZATION IN WATER:
A NOVEL APPROACH TO DEVELOP
A CHITOSAN-ALLERGEN DELIVERY SYSTEM**

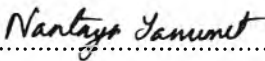
Kaewkan Wasanasuk

A Thesis Submitted in Partial Fulfilment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
The Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University
in Academic Partnership with
The University of Michigan, The University of Oklahoma,
Case Western Reserve University and Institut Français du Pétrole
2007


502036

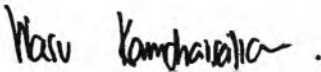
Thesis Title: Chitosan Functionalization in Water: A Novel Approach to Develop a Chitosan-Allergen Delivery System
By: Kaewkan Wasanasuk
Program: Polymer Science
Thesis Advisors: Assoc. Prof. Suwabun Chirachanchai
Wasu Kamchaisatian

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



..... College Director
(Assoc. Prof. Nantaya Yanumet)

Thesis Committee:


.....
(Assoc. Prof. Suwabun Chirachanchai)


.....
(Wasu Kamchaisatian, MD)


.....
(Assoc. Prof. Mongkol Sukwattanasinitt)


.....
(Dr. Rath Pichyangkura)

ABSTRACT

4872004063: Polymer Science Program

Kaewkan Wasanasuk: Chitosan Functionalization in Water:

A Novel Approach to Develop a Chitosan-Allergen Delivery System.

Thesis Advisors: Assoc.Prof. Suwabun Chirachanchai and

Wasu Kamchaisatian, MD 43 pp.

Keywords: Chitosan/ Nanosphere /Adjuvant /Allergen Delivery System

A water soluble chitosan derivative prepared by functionalizing chitosan with poly(ethylene glycol) monomethyl ether (mPEG) and cholic acid (CA) in a water-ethanol system for the use as allergen delivery system is proposed. The derivative is water soluble depending on the molecular weight of chitosan and mPEG and the mole ratios of chitosan:mPEG:CA. The structural analyses by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy (^1H NMR) confirm the conjugation of mPEG and CA with substitution degree to be about 20-30%. The derivative performs nanospherical shape with size 40 nm whereas the incorporation of a model allergen, the house dust mite, by mixing the aqueous solutions of the derivative and the house dust mite initiates larger nanosphere size to be 200 nm as observed by transmission electron microscope (TEM). A preliminary in vitro immune response test based on lymphocyte transformation shows that the lymphocytes cultured in CS-mPEG-CA incorporated with allergen have less proliferation than the one in allergen as observed from microscope.

บทคัดย่อ

แก้วกานต์ วาสนาสุข : การพัฒนาไคโตซานในระบบที่เป็นน้ำ : วิธีการใหม่เพื่อพัฒนาไคโตซานสำหรับการเป็นระบบนำส่งสารไคโตซาน-สารภูมิแพ้ (Chitosan Functionalization in Water: A Novel Approach to Develop a Chitosan-Allergen Delivery System) อ.ที่ปรึกษา : รศ. ดร. สุวบุญ จิราญชัย และ นายแพทย์วุฒ กำชัยเสถียร 43 หน้า

งานวิจัยนี้นำเสนอการพัฒนาอนุพันธ์ของไคโตซานที่สามารถละลายน้ำได้โดยการติดหมู่พอลิเอทิลีนไกลคอลลโมโนเมทิลอีเทอร์และคอลลิคแอซิดในระบบที่เป็นน้ำ-แอลกอฮอล์เพื่อให้เป็นระบบนำส่งสารที่ก่อให้เกิดอาการแพ้ สมบัติการละลายน้ำของอนุพันธ์ของไคโตซานขึ้นกับมวลโมเลกุลของไคโตซาน และ พอลิเอทิลีนไกลคอลลโมโนเมทิลอีเทอร์ และอัตราส่วนโมลของไคโตซานต่อพอลิเอทิลีนไกลคอลลโมโนเมทิลอีเทอร์ต่อคอลลิคแอซิด การวิเคราะห์โครงสร้างด้วยอินฟราเรดและนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ยืนยันว่าไคโตซานติดหมู่พอลิเอทิลีนไกลคอลลโมโนเมทิลอีเทอร์และคอลลิคแอซิดด้วยเปอร์เซ็นต์การแทนที่หมู่พอลิเอทิลีนไกลคอลลโมโนเมทิลอีเทอร์และหมู่คอลลิคแอซิดบนสายโซ่ไคโตซานประมาณ 20-30 เปอร์เซ็นต์ อนุพันธ์ของไคโตซานเป็นนาโนสเฟียร์มีขนาด 40 นาโนเมตร และขนาดของนาโนสเฟียร์ใหญ่ขึ้นเป็น 200 นาโนเมตรเมื่อผสมสารละลายอนุพันธ์ไคโตซานและสารละลายไครฟีนซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดอาการแพ้ต้นแบบ เมื่อจากการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน การทดสอบการกระตุ้นภูมิคุ้มกันเบื้องต้น โดยลิโพโซต์ทรานฟอร์เมชัน พบว่ามีเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ถูกกระตุ้นด้วยอนุพันธ์ของไคโตซานที่ตรงสารที่ก่อให้เกิดอาการแพ้มีการเจริญเติบโตน้อยกว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ถูกกระตุ้นด้วยสารที่ก่อให้เกิดอาการแพ้

ACKNOWLEDGEMENTS

This thesis work is partially funded by the Petroleum and Petrochemical college and the National Excellence Centre for Petroleum, Petrochemicals and Advanced Materials, Thailand.

The author would like to express her gratitude to her advisor, Associate Professor Suwabun Chirachanchai, who not only originated this work, but also gave her many suggestions, invaluable guidance, constructive criticism, constant encouragement, inspiration and vital help to accomplish the research.

She would like to give special thanks to her co-advisor, Wasu Kamchaisatian, MD, for the recommendation, strong support and helping complete the work.

She also wishes to express her grateful thanks to her thesis committees, Associate Professor Mongkol Sukwattanasinitt and Dr. Rath Pichyakura, for valuable comments.

She appreciates all Professors for the education at the Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University.

She is deeply indebted to Associate Professor Buncha Pulpoka (Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University) for his comments and helps in the NMR measurement and Research Centre, Faculty of medicine, Ramathibodi hospital for immune response test. She extends her appreciation to Seafresh Chitosan (Lab) Company Limited, Thailand, for the chitosan starting materials and technical services, National Metal and Materials Technology Center (MTEC) for particle size measurement.

In addition, she wishes to thank her seniors, for suggestions and encouragement throughout the work. She also would like to thank the College staff, and all her friends at the Petroleum and Petrochemical College.

Finally, she wishes to express her gratitude to her family for the education, understanding, and encouragement.

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 Schemes	ix
List of Figures	x
 CHAPTER	
I. INTRODUCTION	1
 II THEORETICAL BACKGROUND AND LITERATURE REVIEW	 3
 III EXPERIMENTAL	 12
3.1 Materials	12
3.2 Equipments	12
3.3 Methodology	13
3.3.1 Chitosan-HOBt Aqueous Solution	13
3.3.2 Preparation of Chitosan-mPEG-Cholic Acid	14
3.3.3 Allergen Incorporation	14
 IV CHITOSAN FUNCTIONALIZATION IN WATER: A NOVEL APPROACH TO DEVELOP A CHITOSAN- ALLERGEN DELIVERY SYSTEM	 16
4.1 Abstract	16

CHAPTER	PAGE
4.2 Introduction	17
4.3 Experimental	18
4.4 Results and Discussion	20
4.5 Conclusions	29
4.6 Acknowledgements	30
4.7 References	30
V CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS	32
REFERENCES	33
APPENDICES	39
Appendix A Chitosan functionalization with cholic acid	39
Appendix B Chitosan functionalization with deoxycholic acid	41
Appendix C Chitosan functionalization with mPEG and deoxycholic acid	42
CURRICULUM VITAE	43

LIST OF TABLE

TABLE		PAGE
CHAPTER III		
3.1	Mole ratio of chitosan:mPEG-COOH:CA in preparing 2, 3, 4, 5	14
CHAPTER IV		
4.1	Mole ratio of chitosan:mPEG-COOH:CA in preparing 2, 3, 4, 5	20
4.2	Solubility of 2a, 2b, 2c, 2d, and 2e	21

LIST OF SCHEMES

SCHEME	PAGE
2.1	3
2.2	4
2.3	6
2.4	7
2.5	8
2.6	11
3.1	15
4.1	19

LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
CHAPTER IV	
4.1 Gelation of (a) 3a , (b) 4a and (c) 5a	22
4.2 FTIR spectra of (a) chitosan and (b) 2a	23
4.3 NMR spectrum of 2a	24
4.4 TGA diagrams of chitosan and 2a , 2b , 2c , 2d , and 2e	25
4.5 TG-FTIR spectra of 2a from room temperature to 500 °C	25
4.6 (a) SEM micrograph of 2a with 100,000x magnification and (b) TEM micrographs of 2a with 80,000x magnification before allergen incorporation and (c) with 9,600x magnification after allergen incorporation.	26
4.7 SEM micrographs of (a) 3a with 200x magnification before allergen incorporation, after incorporation of (b) 3a with 7,500x magnification, (c) 3c with 7,500x magnification, and (d) 3e with 7,500x magnification	27
4.8 SEM micrographs of (a) allergen with 1,000x magnification and (b) 3c with 1,000x magnification after allergen incorporation	28
4.9 Micrographs of cells in <i>in vitro</i> culture with (a) 2a , (b) dust mite, and (c) 2a incorporating with allergen.	29