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.

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

Thesis Committee:

Suwabun Chirachanchai
(Assoc. Prof. Suwabun Chirachanchai)

Wasu Kamchaisatian
(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 ^{1}H nuclear magnetic resonance spectroscopy (^{1}H 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 จิรชาญชัย และ นายแพทย์วสุ กำชัยเสถียร 43 หน้า

งานวิจัยนี้นำเสนอการพัฒนาอนุพันธ์ของไคโตซานที่สามารถละลายน้ำได้โดยการติดหมู่พอลิเอทิลีนไกลคอลโมโนเมทธิลอีเทอร์และคอลิคเอสิดในระบบที่เป็นน้ำ-แอลกอฮอล์เพื่อใช้เป็นระบบนำส่งสารที่ก่อให้เกิดอาการแพ้ สมบัติการละลายน้ำของอนุพันธ์ของไคโตซานขึ้นกับมวลโมเลกุลของไคโตซาน และ พอลิเอทิลีนไกลคอลโมโนเมทธิลอีเทอร์ และอัตราส่วนโมลของไคโตซานต่อพอลิเอทิลีนไกลคอลโมโนเมทธิลอีเทอร์ต่อคอลิคเอสิด การวิเคราะห์โครงสร้างด้วยอินฟราเรดและนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ยืนยันว่าไคโตซานติดหมู่พอลิเอทิลีนไกลคอลโมโนเมทธิลอีเทอร์และคอลิคเอสิดด้วยเปอร์เซ็นต์การแทนที่หมู่พอลิเอทิลีนไกลคอลโมโนเมทธิลอีเทอร์และหมู่คอลิคเอสิดบนสายโซ่ไคโตซานประมาณ 20-30 เปอร์เซนต์ อนุพันธ์ของไคโดซานเป็นนาโนสเฟียร์มีขนาด 40 นาโนเมตร และขนาดของนาโนสเฟียร์ใหญ่ขึ้นเป็น 200 นาโนเมตรเมื่อผสมสารละลายอนุพันธ์ไคโตซานและสารละลายไรฝุ่นซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดอาการแพ้ต้นแบบ เมื่อจากการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน การทดสอบการกระตุ้นภูมิคุ้มกันเบื้องต้นโดยลิมโฟไซต์ทรานฟอร์เมชั่น พบว่ามีเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ถูกกระตุ้นด้วยอนุพันธ์ของไคโตซานที่ตรึงสารที่ก่อให้เกิดอาการแพ้มีการเจริญเติบโตน้อยกว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ถูกกระตุ้นด้วยสารที่ก่อให้เกิดอาการแพ้

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 suggustions 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 Incoporation	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 *in vitro* culture with (a) **2a**, (b) dust mite, and (c) **2a** incorporating with allergen.	29