บทคัดย่อ

การศึกษานี้จึงมุ่งเป้าที่จะพัฒนาวัคซีนไข้หวัดใหญ่ H1N1 2009 ชนิดเชื้อตายสำหรับฉีดเข้ากล้าม โดยผลิตไวรัสจากไข่ไก่ฟักและผสมแอดจูแวนท์ในสูตรตำรับเพื่อช่วยลดปริมาณของแอนติเจนที่จะใช้ รวมทั้งจะทำให้ภูมิต้านทานตอบสนองต่อวัคซีนมีความครอบคลุมและมีอายุนาน ก่อนดำเนินการวิจัยจะทำการปรับปรุงห้องปฏิบัติการ ให้เป็นห้องชีวนิรภัยระดับ 2+ สำหรับเพาะไวรัส พบว่าระบบต่างๆของห้องปฏิบัติการที่ปรับปรุงแล้วผ่านเกณฑ์มาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการ BSL2+ และผ่านการรับรองการประเมินความเสี่ยงทางชีวภาพในระดับมหาวิทยาลัย

การเพาะไวรัสจากไข่ไก่ฟักและผลิตเป็นวัคซีนแอนติเจน จะผลิตจากหัวเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ H1N1 2009 สายพันธุ์วัคซีน A/California/07/09NYMC X-179A (H1N1) จาก US-CDC โดยการฉีดในไข่ไก่ฟัก (embryonated egg) เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อไวรัส และ Master seed เพื่อเตรียมไวรัสตั้งต้น พบความเข้มข้นของไวรัสโดยวิธี Hemagglutination Test = 256-512 และ 128 HAU/50 ul สำหรับหัวเชื้อไวรัส และ Master seed และโดยวิธี Plaque assay = 3.8 x 10^7 PFU/ml สำหรับ Master seed ตามลำดับ และพบว่าความเข้มข้นของไวรัสของ Master seed 0.5 HAU/ 200 ul/ 1 ใบ จะใช้เพิ่มจำนวนไวรัสในไข่ไก่ฟักแล้วให้ได้ปริมาณแอนติเจนสูงสุด และประหยัด Master seed มากที่สุดซึ่งจะนำไปใช้เพาะไวรัสจากไข่ไก่ฟัก จำนวนไข่ที่ดีที่สามารถเก็บน้ำไข่ได้เหลือประมาณ 90-96 ใบจากการเพาะไข่ 100 ใบ พบว่าปริมาณไวรัสที่ผ่านการกำจัดสิ่งเจือปนไม่ทำให้ไวรัสสูญเสียไป แต่พบว่าการทำให้เข้มข้นขึ้น มีผลทำให้ปริมาณไวรัสสูญเสียไป 26.5% จากนั้นสามารถทำให้เชื้อตายจากการตรวจสอบเชื้อตาย ตามวิธีการของ CDC โดยสารเคมีที่ใช้ คือ Beta-propiolactone แล้วทำให้ไวรัสแอนติเจนบริสุทธิ์ โดยขั้นตอน Affinity chromatography พบว่ามีการสูญเสียค่อนข้างมากและขั้นตอน Tangential Flow Filtration จะมีการสูญเสีย 15.41% สำหรับแอนติเจนมาตรฐานและแอนติบอดีสำหรับตรวจวัดปริมาณแอนติเจน H1N1 2009 ที่จะได้จาก UK-CDC, Division of Virology, National Institute for Biological Standards and Control, United Kingdom

การเตรียมตำรับวัคซีนผสมแอดจูแวนท์ จะใช้แอดจูแวนท์ที่นำเข้าชนิดอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำจาก Infectious Disease Research Institute ประเทศสหรัฐอเมริกา ส่วนแอดจูแวนท์ชนิดอนุภาคที่ผลิตเองจะเลือกใช้ polylactide-co-glycolide (PLGA), ไคโตซาน (CS) และaluminium hydroxide ($Al(OH)_3$) มาเตรียมเป็นแอดจูแวนท์ชนิดอนุภาคขนาดไมโครเมตร โดยเทคนิค double emulsion solvent evaporation พบว่าอนุภาค PLGA มีขนาดต่างกันขึ้นกับตัวแปรของสูตรตำรับและเครื่องมือในการผลิต การกระจายขนาดค่อนข้างแคบ รูปร่างของอนุภาคจาก optical microscope และ SEM จะเห็นเป็นทรงกลม สักษณะพื้นผิวจาก AFM จะเรียบเมื่อไม่ได้เคลือบ แต่จะเป็นเจลเมื่อเคลือบด้วย CS และมีลักษณะขรุขระเมื่อเคลือบด้วย $Al(OH)_3$ ประจุบนพื้นผิวของอนุภาค PLGA จะเป็นค่า – และเปลี่ยนเป็น + เมื่อเคลือบ ปริมาณสารทำละลายอินทรีย์ที่หลงเหลือเข้าเกณฑ์มาตรฐาน

ตำรับวัคซีนที่เตรียมตามมาตรฐาน GMP เมื่อทดลองหาประสิทธิภาพของแอนติเจนที่เตรียมขึ้นเองและประสิทธิภาพของแอดจูแวนท์ ในหนู BALB/c mice เพศผู้ 16 ตัว พบว่าแอนติเจนที่ผลิตขึ้นเองนี้สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ให่เกิด HAI titer อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับตำรับน้ำกลั่น (α = 0.05) เมื่อเพิ่ม แอดจูแวนท์ Complete Freund's adjuvant พบว่า titer จะ

ขึ้นสูงมากกว่าเมื่อไม่มี แอดจูแวนท์อย่างเด่นชัดโดยเฉพาะเมื่อให้ dose ที่ 2 เมื่อใช้ TLR3 agonist เป็นแอดจูแวนท์ พบว่าสามารถเพิ่ม titer ได้เช่นกัน แต่ประสิทธภาพการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน จะน้อยกว่าการใช้ Complete Freund's adjuvant เมื่อทำการทดลองเพื่อหาประสิทธิภาพของแอนติเจนที่ผลิตขึ้น lot ใหม่และประสิทธิภาพของแอดจูแวนท์ Complete Freund's adjuvant ในหนู BALB/c mice เพศเมีย 12 ตัวเปรียบเทียบกับตำรับแอนติเจนที่ผลิตขึ้นเดิม พบว่า แอนติเจนที่ผลิตขึ้นใหม่นี้สามารถกระตุ้นภูมิค้มกัน ให่เกิด HAI titer อย่างมีนัยสำคัญ (α = 0.05) เมิอเพิ่ม Complete Freund's adjuvant ผลยืนยันการทดลองเดิมว่า Freund's complete adjuvant จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกระตุ้นให้ HAI titer สูงกว่าเมื่อไม่มี แอดจูแวนท์อย่างเด่นชัด เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของแอนติเจนที่เตรียม lot เดิมและไม่มีแอดจูแวนท์ใดๆ พบว่า แอนติเจนสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ให่เกิด HAI titer อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ที่ได้จะต่ำกว่าที่ได้กับหนูเพศผู้ แม้เมื่อทดสอบทางสถิติไม่พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (α = 0.05) ซึ่งโดยปกติแล้ว การตอบสนองของหนูเพศเมียมักให้ค่าสูงกว่าหนูเพศผู้ เนื่องจากระดับของ HAI titer ในหนูมีค่าไม่สูงพอที่จะศึกษาลิง

Abstract

The objective of this study was to develop intramuscular, inactivated influenza H1N1 2009 vaccine for clinical use by virus production from embryonated eggs and with adjuvant in order to reduce the amount of antigen used, to activate and prolonged both immune responses. Prior to virus experiment, the laboratory had to be renovated to meet the standard of Biosafety Level 2 enhance. It was found that all facility systems in the renovated laboratory substantially passed the requirement. Moreover, Conferment of Biosafety Certificate has been issued at university level.

Virus production from embryonated egg and antigen vaccine production were prepared from influenza H1N1 2009 virus, vaccine strain A/California/07/09NYMC X-179A (H1N1) from US-CDC. The obtained virus was injected into embryonated egg to prepare Pre-master Seed and Master Seed for initial virus preparation. The virus concentrations determined from hemagglutination test were 256-512 และ 128 HAU/50 50 ul for the Pre-master Seed and Master seed and from Plaque assay was 3.8 x 10^7 PFU/ml for Master seed, respectively. It was also found that the concentration of Master Seed 0.5 HAU/ 200 ul/egg would increase the number of virus in embryonated egg to obtain the highest amount of antigen, thus the most saving of Master Seed.. This concentration was to use in further virus production. The egg media could be collected from 90-96 good eggs out of 100 injected eggs. Elimination of contamination did not reduce the amount of virus but concentrating procedure lost 26.5% of virus. The inactivation was performed and confirmed by CDC method using beta-propiolactone. It was noted that there was much loss in affinity chromatography stage in virus purification while 15.4% loss was found in the tangential flow filtration stage. The standard antigen and antibody for determination of the amount of antigen H1N1 2009 was gifted from UK-CDC, Division of Virology, National Institute for Biological Standards and Control, United Kingdom

The formulation preparation of adjuvanted vaccine contained the imported adjuvant, o/w emulsion from Infectious Disease Research Institute, USA. The self-prepared, particulate adjuvants were obtained by using polylactide-co-glycolide (PLGA), chitosan (CS) and aluminium hydroxide ($Al(OH)_3$). Microparticles as adjuvants were prepared by double emulsion solvent evaporation technique. It was revealed that the PLGA particles had different sizes depended on the formulation parameters and equipment used. The size distribution expressed as uniformity was quite narrow. Particle appearance from optical microscope and SEM showed spherical shape. Surface morphology from AFM revealed smooth PLGA surface when not coated, but appeared as gel layer when coated with CS and rough surface when coated with $Al(OH)_3$. Surface charge of PLGA particles were – values and changed to + when coated. The inorganic solvent residue was within the standard requirement.

Vaccine formulations were prepared following GMP procedure. Efficay of the prepared antigen and commercial adjuvants were tested on 16 male Balb/c mice. It was found that the prepared antigen could significantly stimulate immune response detected from HAI titer when compared to distilled water (α = 0.05). When Complete Freund's adjuvant was added, the titer was higher especially after second dose. When TLR3 agonist was used as adjuvant, higher titer was also obtained but the titer was lower than when usung Complete Freund's adjuvant. Reproducibility of antigen was tested by comparing the first and second lot on 12 female Balb/c mice. The second lot of antigen also significantly produced higher titer than distilled water (α = 0.05). Addition of Complete Freund's adjuvant confirmed the efficiency of adjuvant when compared to non-adjuvant formulation. The first lot of antigen without adjuvant also could significantly induce immune response but with lower titer than when tested on male animals although there was no statistical difference (α = 0.05). Normally, immune response from female animals is higher than male animals. Due to low HAI titer obtained in mice, study on monkey was not pursued.