



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่องการพัฒนาวัคซีนเชื้อตายไข้หวัดใหญ่ H1N1 2009 เพื่อใช้ทางคลินิก
Development of inactivated influenza HINI 2009 vaccine for
clinical use

ศาสตราจารย์ เกสซ์กรหญิง ดร. กาญจน์พิมล ฤทธิเดช

ภาควิชาวิทยาการเภสัชกรรมและเภสัชอุตสาหกรรม คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดร. สาธิต พิษญาวกูร

Department of Immunology and medicine, US armed forces Research Institute of Medical Science

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิง อรุณี ธิติธัญญานนท์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ศาสตราจารย์ นายแพทย์เกียรติ รักรัษฎธรรม

ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง รังสิณี มหานนท์

ภาควิชาปริทัศน์วิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดร. อนันต์ จงแก้ววัฒนา

ห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยาและเซลล์วิทยา ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

ที่ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ปีงบประมาณ 2552 (ธันวาคม 2552-พฤศจิกายน 2553)

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่เล็งเห็นความสำคัญของการพัฒนาการผลิตวัคซีนเพื่อให้ใช้ในประเทศ โดยให้การสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมด้วยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ประจำปีงบประมาณ 2552 แก่โครงการวิจัยเรื่อง “การพัฒนาวัคซีนเชื้อตายไข้หวัดใหญ่ H1N1 2009 เพื่อใช้ทางคลินิก” นอกจากนี้ขอกราบขอบพระคุณคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิที่ให้ข้อคิดเห็นและคำแนะนำอันเป็นประโยชน์ให้การวิจัยนี้

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

สืบเนื่องจากการแพร่ระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่ ในศตวรรษนี้ คือไข้หวัดใหญ่สเปน (H1N1) เมื่อปี 1918-1919 ไข้หวัดใหญ่เอเชีย (H2N2) เมื่อปี 1957-1958 ไข้หวัดใหญ่ฮ่องกง (H3N2) ปี 1968-1968 รวมทั้งไข้หวัดใหญ่ชนิดใหม่ H1N1 2009 ซึ่งมีการแลกเปลี่ยนจีโนมของไวรัสไข้หวัดใหญ่ของหมู นก และคน ทำให้นักวิทยาศาสตร์มีความกังวลว่าเชื้อไข้หวัดใหญ่ H1N1 2009 อาจจะมีการเปลี่ยนแปลงทางด้านพันธุกรรมซึ่งอาจนำไปสู่การเกิดโรครุนแรงในอนาคตข้างหน้าได้

วัคซีนจัดเป็นเครื่องมือปฐมภูมิในการป้องกันโรคต่างๆ ซึ่งทั่วโลกรวมทั้งองค์การอนามัยโรคได้ประกาศเพิ่มความสำคัญของการป้องกันโรคมากกว่าการรักษา สำหรับวัคซีนไข้หวัดใหญ่ H1N1 2009 ในปัจจุบันยังไม่มีการจัดจำหน่ายวัคซีนป้องกันโรคไข้หวัดใหญ่ H1N1 2009 ที่มีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ วัคซีนป้องกันโรคไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาลไม่แสดงการป้องกันต่อไวรัสโรคไข้หวัดใหญ่ H1N1 2009 ได้ ปัจจุบันบริษัทที่ผลิตและจำหน่ายวัคซีนระดับนานาชาติหลายบริษัทกำลังเร่งมือในการผลิตวัคซีนไข้หวัดใหญ่ H1N1 2009 สำหรับประเทศไทย องค์การเภสัชกรรมก็เร่งมือในการผลิตวัคซีนเช่นกันโดยจะผลิตวัคซีนไข้หวัดใหญ่ H1N1 2009 ชนิดเชื้อเป็นสำหรับพ่นจมูกด้วยการซื้อเทคโนโลยีจากประเทศรัสเซีย และเช่นกันกำลังการผลิตจะไม่เพียงพอ ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ

การศึกษานี้คณะผู้วิจัยซึ่งประกอบด้วยผู้เชี่ยวชาญจากหลากหลายสาขามีความมุ่งมั่นที่จะพัฒนาวัคซีนไข้หวัดใหญ่ H1N1 2009 ชนิดเชื้อตายสำหรับฉีดเข้ากล้ามเนื้อ โดยการผลิตไวรัสด้วยกรรมวิธีเพาะในไข่ไก่ฟักและนำเอาแอดจูแวนท์ซึ่งเป็นสารเสริมฤทธิ์ผสมในสูตรตำรับเพื่อช่วยลดปริมาณของแอนติเจนที่จะใช้ รวมทั้งจะทำให้ภูมิคุ้มกันตอบสนองต่อวัคซีนมีความครอบคลุมและมีอายุยาวนาน เพื่อเป็นทางเลือกหนึ่งให้รัฐในการผลิตวัคซีนโดยในกรณีมีการระบาดของโรคระลอกใหม่ โดยสามารถใช้กระบวนการผลิตของวัคซีนที่มีการผลิตที่องค์การเภสัชกรรมในปัจจุบันได้ นอกจากนี้ยังมีความรู้ที่ได้สามารถนำไปประยุกต์กับแอนติเจนและระบบนำส่งแอนติเจนอื่นๆ รวมทั้งเป็นการพัฒนาบุคลากรด้านวัคซีนให้เพียงพอับความต้องการของประเทศ ให้สามารถพึ่งพาตนเองได้

ก่อนดำเนินการวิจัยจะทำการปรับปรุงห้องปฏิบัติการที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ให้เป็นห้องชีวอนามัยระดับ 2+ สำหรับเพาะไวรัส ทำให้ได้ห้องปฏิบัติการที่ผ่าน เกณฑ์มาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการ BSL2+ และผ่านการรับรองการประเมินความเสี่ยงทางชีวภาพในระดับมหาวิทยาลัย การเพาะไวรัสจากไข่ไก่ฟักและผลิตเป็นวัคซีนแอนติเจน จะผลิตจากหัวเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ H1N1 2009 สายพันธุ์วัคซีน A/California/07/09NYMC X-179A (H1N1) ที่ได้รับการแนะนำจาก WHO และได้รับจาก US-CDC โดยการฉีดในไข่ไก่ฟัก (embryonated egg) โดยศึกษาได้ขั้นตอนเทคนิคการผลิตที่ให้ปริมาณไวรัสมากที่สุด และสามารถทำให้เชื้อตายจากการตรวจสอบเชื้อตาย ตามวิธีการของ CDC แล้วทำให้ไวรัสแอนติเจนบริสุทธิ์เพื่อใช้ในการเตรียมเป็นตำรับวัคซีน ทั้งนี้ได้เปรียบเทียบกับแอนติเจนมาตรฐานและแอนติบอดีสำหรับตรวจวัดปริมาณแอนติเจน H1N1 2009 ที่ได้จาก UK-CDC, Division of Virology, National Institute for Biological Standards and Control, United Kingdom ซึ่งได้มาตรฐานโลก

การเตรียมตำรับวัคซีนผสมแอดจูแวนท์ จะใช้แอดจูแวนท์ที่นำเข้าสู่ชนิดอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำจาก Infectious Disease Research Institute ประเทศสหรัฐอเมริกาที่ผ่านการทดสอบแล้วว่าปลอดภัย และได้พัฒนาสูตรตำรับแอดจูแวนท์ ชนิดอนุภาคขนาดไมโครเมตรที่ผลิตเองจาก polylactide-co-glycolide (PLGA), ไคโตซาน (CS) และ aluminium hydroxide, (Al(OH)₃) ซึ่งสารแต่ละชนิดได้ยอมรับให้ใช้ได้ ในเภสัชตำรับ และเตรียมโดยเทคนิค double emulsion solvent evaporation ซึ่งขั้นตอนไม่ยุ่งยาก และสามารถขยายการผลิตได้ง่าย อนุภาคทั้ง 3 ชนิด ที่ได้มีคุณสมบัติที่เหมาะสมทางเคมีฟิสิกส์ในการ เป็นแอดจูแวนท์ ซึ่งต้องศึกษาคุณสมบัติอื่นๆต่อไป

ตำรับวัคซีนที่เตรียมตามมาตรฐาน GMP เมื่อทดสอบหาประสิทธิภาพของแอนติเจนที่เตรียมขึ้นเองและประสิทธิภาพของ แอดจูแวนท์ ในหนู BALB/c mice เพศผู้ 16 ตัว พบว่าแอนติเจนที่ผลิตขึ้นเองนี้สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ให้เกิด HAI titer อย่าง มีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับตำรับน้ำกลั่น เมื่อเพิ่ม แอดจูแวนท์ Complete Freund's adjuvant พบว่า titer จะขึ้นสูง มากกว่าเมื่อไม่มี แอดจูแวนท์อย่างเด่นชัดโดยเฉพาะเมื่อให้ dose ที่ 2 เมื่อใช้ TLR3 agonist เป็นแอดจูแวนท์ พบว่าสามารถ เพิ่ม titer ได้เช่นกัน แต่ประสิทธิภาพการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน จะน้อยกว่าการใช้ Complete Freund's adjuvant เมื่อทำการ ทดลองเพื่อหาประสิทธิภาพของแอนติเจนที่ผลิตขึ้น lot ใหม่และประสิทธิภาพของแอดจูแวนท์ Complete Freund's adjuvant ในหนู BALB/c mice เพศเมีย 12 ตัวเปรียบเทียบกับตำรับแอนติเจนที่ผลิตขึ้นเดิม พบว่า แอนติเจนที่ผลิตขึ้นใหม่นี้สามารถ กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ให้เกิด HAI titer อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเพิ่ม Complete Freund's adjuvant ผลยืนยันการทดลองเดิมว่า Freund's complete adjuvant จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกระตุ้นให้ HAI titer สูงกว่าเมื่อไม่มี แอดจูแวนท์อย่างเด่นชัด เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของแอนติเจนที่เตรียม lot เดิมและไม่มีแอดจูแวนท์ใดๆ พบว่า แอนติเจนสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ให้ เกิด HAI titer อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ที่ได้จะต่ำกว่าที่ได้กับหนูเพศผู้ แม้เมื่อทดสอบทางสถิติ ไม่พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งโดยปกติแล้ว การตอบสนองของหนูเพศเมียมักให้ค่าสูงกว่าหนูเพศผู้ เนื่องจาก ระดับของ HAI titer ในหนูมีค่าไม่สูงพอที่จะตัดสินใจทำในลิง ทำให้คณะผู้วิจัยตัดสินใจยุติการทดสอบในลิง

ประโยชน์จากการศึกษาจะได้ขั้นตอนในการผลิตแอนติเจนเชื้อตายไข้หวัดใหญ่ H1N1 2009 จากไขไก่ฟักซึ่งยังไม่มีผู้ ศึกษามาก่อนในประเทศ ได้แอดจูแวนท์ชนิดอนุภาคที่มีขนาดไมโครเมตรที่ผลิตเองในประเทศด้วยกรรมวิธีที่ไม่ยุ่งยาก ได้สูตร ตำรับวัคซีนที่ผสมกับแอดจูแวนท์ Complete Freund's adjuvant ทำให้สามารถลดจำนวนแอนติเจนในตำรับ ทราบผลการ กระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์เล็ก รวมทั้งได้พัฒนา ผลิตและเกิดความร่วมมือของบุคลากรด้านวัคซีนซึ่งมีจำนวนน้อยมากใน ประเทศ และเป็นการเตรียมพร้อมเพื่อการพึ่งพาตนเองไม่เฉพาะเมื่อมีการระบาดของโรค

บทคัดย่อ

การศึกษานี้จึงมุ่งเป้าที่จะพัฒนาวัคซีนใช้หวัดใหญ่ H1N1 2009 ชนิดเชื้อตายสำหรับฉีดเข้ากล้ามเนื้อ โดยผลิตไวรัสจากไข่ไก่ฟักและผสมแอดจูแวนท์ในสูตรตำรับเพื่อช่วยลดปริมาณของแอนติเจนที่จะใช้ รวมทั้งจะทำให้ภูมิคุ้มกันตอบสนองต่อวัคซีนมีความครอบคลุมและมีอายุยาวนาน ก่อนดำเนินการวิจัยจะทำการปรับปรุงห้องปฏิบัติการ ให้เป็นห้องชีวอนามัยระดับ 2+ สำหรับเพาะไวรัส พบว่าระบบต่างๆของห้องปฏิบัติการที่ปรับปรุงแล้วผ่านเกณฑ์มาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการ BSL2+ และผ่านการรับรองการประเมินความเสี่ยงทางชีวภาพในระดับมหาวิทยาลัย

การเพาะไวรัสจากไข่ไก่ฟักและผลิตเป็นวัคซีนแอนติเจน จะผลิตจากหัวเชื้อไวรัสใช้หวัดใหญ่ 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 = 3.8×10^7 PFU/ml สำหรับ Master seed ตามลำดับ และพบว่าความเข้มข้นของไวรัสของ Master seed 0.5 HAU/ 200 ul/ 1 ใบ จะใช้เพิ่มจำนวนไวรัสในไข่ไก่ฟักแล้วให้ได้ปริมาณแอนติเจนสูงสุด และประหยัด Master seed มากที่สุดซึ่งจะนำไปใช้เพาะไวรัสจากไข่ไก่ฟัก จำนวนไข่ที่ดีที่สุดที่สามารถเก็บน้ำไข่ได้เหลือประมาณ 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 poly(lactide-co-glycolide) (PLGA), ไคโตซาน (CS) และ aluminium hydroxide (Al(OH)₃) มาเตรียมเป็นแอดจูแวนท์ชนิดอนุภาคขนาดไมโครเมตร โดยเทคนิค double emulsion solvent evaporation พบว่าอนุภาค PLGA มีขนาดต่างกันขึ้นกับตัวแปรของสูตรตำรับและเครื่องมือในการผลิต การกระจายขนาดค่อนข้างแคบ รูปร่างของอนุภาคจาก optical microscope และ SEM จะเห็นเป็นทรงกลม ลักษณะพื้นผิวจาก AFM จะเรียบเมื่อไม่ได้เคลือบ แต่จะเป็นเจดเมื่อเคลือบด้วย CS และมีลักษณะขรุขระเมื่อเคลือบด้วย Al(OH)₃ ประจุบนพื้นผิวของอนุภาค PLGA จะเป็นค่า - และเปลี่ยนเป็น + เมื่อเคลือบ ปริมาณสารทำลายอินทรีย์ที่หลงเหลือเข้าเกณฑ์มาตรฐาน

ตำรับวัคซีนที่เตรียมตามมาตรฐาน GMP เมื่อทดสอบหาประสิทธิภาพของแอนติเจนที่เตรียมขึ้นเองและประสิทธิภาพของแอดจูแวนท์ ในหนู BALB/c mice เพศผู้ 16 ตัว พบว่าแอนติเจนที่ผลิตขึ้นเองนี้สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ให้เกิด HAI titer อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับตำรับน้ำกลั่น ($\alpha = 0.05$) เมื่อเพิ่ม แอดจูแวนท์ Complete Freund's adjuvant พบว่า titer จะ

ขึ้นสูงมากกว่าเมื่อไม่มี แอดจูแวนท์อย่างเด่นชัดโดยเฉพาะเมื่อให้ dose ที่ 2 เมื่อใช้ TLR3 agonist เป็นแอดจูแวนท์ พบว่า สามารถเพิ่ม titer ได้เช่นกัน แต่ประสิทธิภาพการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน จะน้อยกว่าการใช้ Complete Freund's adjuvant เมื่อทำการทดลองเพื่อหาประสิทธิภาพของแอนติเจนที่ผลิตขึ้น lot ใหม่และประสิทธิภาพของแอดจูแวนท์ Complete Freund's adjuvant ในหนู BALB/c mice เพศเมีย 12 ตัวเปรียบเทียบกับตัวรับแอนติเจนที่ผลิตขึ้นเดิม พบว่า แอนติเจนที่ผลิตขึ้นใหม่นี้ สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ให้เกิด HAI titer อย่างมีนัยสำคัญ ($\alpha = 0.05$) เมื่อเพิ่ม Complete Freund's adjuvant ผลยืนยันการทดลองเดิมว่า Freund's complete adjuvant จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกระตุ้นให้ HAI titer สูงกว่าเมื่อไม่มี แอดจูแวนท์ อย่างเด่นชัด เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของแอนติเจนที่เตรียม lot เดิมและไม่มีแอดจูแวนท์ใดๆ พบว่า แอนติเจนสามารถ กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ให้เกิด HAI titer อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ที่ได้จะต่ำกว่าที่ได้กับหนูเพศผู้ แม้เมื่อทดสอบทางสถิติไม่พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($\alpha = 0.05$) ซึ่งโดยปกติแล้ว การตอบสนองของหนูเพศเมียมัก ให้ค่าสูงกว่าหนูเพศผู้ เนื่องจากระดับของ HAI titer ในหนูมีค่าไม่สูงพอที่จะศึกษาถึง

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 $\mu\text{g} \approx 128$ HAU/50 50 μl for the Pre-master Seed and Master seed and from Plaque assay was 3.8×10^7 PFU/ml for Master seed, respectively. It was also found that the concentration of Master Seed 0.5 HAU/ 200 μl /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 ($\text{Al}(\text{OH})_3$). 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 $\text{Al}(\text{OH})_3$. 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. Efficacy 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 ($\alpha = 0.05$). 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 using 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 ($\alpha = 0.05$). 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 ($\alpha = 0.05$). 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.

สารบัญเรื่อง

| | หน้า |
|---|------|
| กิตติกรรมประกาศ | 2 |
| บทสรุปสำหรับผู้บริหาร | 3 |
| บทคัดย่อ | 5 |
| สารบัญเรื่อง | 9 |
| สารบัญตาราง | 10 |
| สารบัญภาพ | 11 |
| คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย | 12 |
| บทนำ | 13 |
| วิธีดำเนินการวิจัย | 17 |
| ผลการผลการวิจัยและอภิปราย/วิจารณ์ | 26 |
| สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป ตลอดจนประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลการวิจัยที่ได้ | 45 |
| บรรณานุกรม | 48 |
| ภาคผนวก 1 | 51 |
| ภาคผนวก 2 | 60 |
| ภาคผนวก 3 | 63 |
| ภาคผนวก 4 | 65 |
| ภาคผนวก 5 | 68 |
| ภาคผนวก 6 | 82 |
| ภาคผนวก 7 | 90 |

สารบัญตาราง

| ตารางที่ | หน้า |
|---|------|
| 1 การระบาดของ H1N1 | 13 |
| 2 ความเข้มข้นและปริมาตรที่เตรียมของ Pre-Master seed และ Master seed | 25 |
| 3 ความเข้มข้นของไวรัสที่ได้เมื่อเริ่มด้วยไวรัส Master seed ปริมาณต่างๆ | 29 |
| 4 ปริมาณไวรัสที่เตรียมได้ และเปอร์เซ็นต์ของปริมาณไวรัสที่สูญเสียไปในแต่ละขั้นตอนของการกำจัดสิ่งเจือปนขั้นต้น และการทำให้เข้มข้นขึ้น | 30 |
| 5 ปริมาณ HA แอนติเจน (HAU) และปริมาณไวรัสที่สามารถติดเชื้อได้ (PFU) หลังจากทำให้เชื้อตาย | 30 |
| 6 ปริมาณไวรัส และเปอร์เซ็นต์ของปริมาณไวรัสที่สูญเสียไปในแต่ละขั้นตอนของการทำ Affinity chromatography | 31 |
| 7 ปริมาณไวรัส และเปอร์เซ็นต์ของปริมาณไวรัสที่สูญเสียไปในแต่ละขั้นตอนของการทำ TFF | 31 |
| 8 ตัวแปรสูตรตำรับ ลักษณะของอนุภาคและผลของ CS และ $Al(OH)_3$ ต่อขนาด การกระจายขนาด ประจุที่ผิว และปริมาณสารละลายอินทรีย์ที่หลงเหลือของสูตรตำรับที่คัดเลือก | 35 |

สารบัญภาพ

| รูปที่ | หน้า | |
|--------|--|----|
| 1 | แบบแสดงพื้นที่ก่อนปรับปรุง | 18 |
| 2 | แบบแสดงพื้นที่หลังจากปรับปรุง | 27 |
| 3 | แบบแสดงตำแหน่งที่ติดตั้ง manual pressure gauge (MP) | 28 |
| 4 | ผลของอัตราส่วน w/o ของ emulsion ปฐมภูมิ อัตราส่วน (w/o)/w ของ emulsion ทูติยภูมิ % PVA ของ emulsion ทูติยภูมิ และเครื่อง sonicator ต่อขนาดและการกระจายขนาดอนุภาค (กราฟแท่งที่ไม่มีและมีผลของแต่ละคู่ตามลำดับ) ของอนุภาค PLGA particles ที่เตรียมจาก probe sonicator และ bath | 33 |
| 5 | รูปลักษณะของอนุภาค PLGA ขนาด 1 μ m (A), 5 μ m (B), 15 μ m (C) และขนาด 1 μ m ที่เคลือบด้วย CS, 1C (D) และขนาด 1 μ m ที่เคลือบด้วย Al(OH) ₃ , 1A, (E) ภายใต้กล้อง optical microscope (x 20). | 36 |
| 6 | ภาพ SEM ของ PLGA, PLGA ที่เคลือบด้วย CS, 0.75% Al(OH) ₃ และ 1.5% Al(OH) ₃ conjugated PLGA particles (A to D, ตามลำดับ) ที่มีขนาดอนุภาค 1, 5 และ 15 μ m (1,2,3 ตามลำดับ) | 37 |
| 7 | ลักษณะผิวของ PLGA (A1), PVA (A2), PLGA ที่เคลือบด้วย CS (B1), CS (B2), PLGA ที่เคลือบด้วย 0.75% Al(OH) ₃ (C1) และ Al(OH) ₃ (C2) จากการใช้เทคนิค AFM | 38 |
| 8 | HAI titer จาก serum ของ BALB/c mice หลังการให้วัคซีนที่ประกอบด้วยแอนติเจนที่ผลิตขึ้นเอง (group 2), แอนติเจนที่ผลิตขึ้นเองและ complete Freund's adjuvant (group 2), แอนติเจนที่ผลิตขึ้นเองและ toll-like receptor 3 agonist (group 4) เปรียบเทียบกับน้ำกลั่น (group 1) | 41 |
| 9 | HAI titer จาก serum ของ BALB/c mice หลังการให้วัคซีนที่ประกอบด้วยแอนติเจนที่ผลิตขึ้นเอง lot ใหม่ และ lot เก่า (group 1, 2 ตามลำดับ) | 43 |

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

APCs = antigen presenting cells

M = macrophages

DCs = dendritic cells

BSL2+ = Biosafety Level 2 enhance

IM = intramuscular

CDC = Center of Disease Control

HAU = Hemagglutinin unit

PFU = plaque forming unit

ml = milliliter

PLGA = polylactide-co-glycolide

CS = chitosan

Al(OH)₃ = aluminium hydroxide

PVA = polyvinyl alcohol

SEM = scanning electron microscope

AFM = atomic force electron microscope

ug = microgram

o/w = oil in water

NA = neuraminidase

TFF = tangential flow filtration

FPLC = fast performance liquid chromatography

บทนำ

ในศตวรรษที่ผ่านมา ได้เกิดการระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่ 3 ครั้ง คือไข้หวัดใหญ่สเปน (H1N1) เมื่อปี 1918-1919 ไข้หวัดใหญ่เอเชีย (H2N2) เมื่อปี 1957-1958 และไข้หวัดใหญ่ฮ่องกง (H3N2) ปี 1968-1968 การระบาดใหญ่ทั้ง 3 ครั้งนี้ทำให้ผู้เชี่ยวชาญด้านโรคไข้หวัดใหญ่ส่วนใหญ่เชื่อว่าการระบาดจะเกิดเป็นวงจรโดยการระบาดครั้งถัดไปน่าจะถึงวงจรดังกล่าวแล้ว

ระหว่างเดือน มี.ค 2009 มีการรายงานโรคไข้หวัดใหญ่ชนิดใหม่ที่ประเทศเม็กซิโก โดยมีการแพร่หลายไปยังสหรัฐอเมริกา และประเทศอื่น ๆ ทั่วโลก โดยเชื่อกันว่าเป็นไวรัสสายพันธุ์ใหม่ซึ่งได้รับการเรียกชื่อว่า H1N1 2009 ไวรัสสายพันธุ์ใหม่นี้มีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของไวรัสไข้หวัดใหญ่ของหมู นก และคน โดยจะแสดงการเปลี่ยนแปลงของสารฮีแมกกากลูตินินและนิวรามิनिเดส เมื่อเปรียบเทียบกับไวรัส H1N1 สายพันธุ์เดิม แม้ไวรัสใหม่นี้จะไม่ก่อให้เกิดอันตรายขั้นรุนแรงมาก แต่การแพร่ระบาดในมนุษย์เป็นไปอย่างกว้างขวาง โดยวันที่ 12 กรกฎาคม 2009 องค์การอนามัยโลกได้ประกาศการระบาดของ H1N1 (ตามตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 การระบาดของ H1N1

| Pandemic | Year | Influenza A virus subtype | People infected (approx) | Deaths (est.) | Case fatality rate |
|---------------|--------------|---------------------------|--------------------------|----------------|--------------------|
| Spanish flu | 1918-1919 | H1N1 | 0.5-1 billion | 20-100 million | >2.5 % |
| Asian flu | 1956-1958 | H2N2 | | 2 million | <0.1 % |
| Hong Kong flu | 1968-1969 | H3N2 | | 1 million | <0.1 % |
| H1N1 2009 | Mar-Jul 2009 | H1N1 | 94,512 (lab confirm) | 429 | 0.45 % |

Note: Thailand confirm case 4,057, deaths 24,
: Seasonal influenza/year:
People infected = 0.34-1 billion, deaths ~ 250,000-500,000

ปัจจุบันเชื้อไข้หวัดใหญ่ H1N1 2009 ได้ระบาดไปมากกว่า 130 ประเทศ ซึ่งการระบาดนี้เกิดขึ้นอย่างกว้างขวางมากกว่าไข้หวัดใหญ่ธรรมดา ถึงแม้ว่าจะไม่ก่อให้เกิดโรครุนแรง แต่นักวิทยาศาสตร์มีความกังวลว่าเชื้อไข้หวัดใหญ่ H1N1 2009 อาจจะมีการเปลี่ยนแปลงทางด้านพันธุกรรมซึ่งอาจนำไปสู่การเกิดโรครุนแรงในอนาคตข้างหน้าได้

วัคซีนจัดเป็นเครื่องมือปฐมภูมิในการป้องกันโรคไข้หวัดใหญ่ H1N1 2009 อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีการจัดจำหน่ายวัคซีนป้องกันโรคไข้หวัดใหญ่ H1N1 2009 ที่มีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ วัคซีนป้องกันโรคไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาลไม่แสดงการป้องกันต่อไวรัสโรคไข้หวัดใหญ่ H1N1 2009 ได้ ปัจจุบันบริษัทที่ผลิตและจำหน่ายวัคซีนระดับนานาชาติหลายบริษัทกำลังเร่งมือในการผลิตวัคซีนไข้หวัดใหญ่ H1N1 2009 และมีการคาดการณ์ว่าจะไม่เพียงพอต่อความต้องการของโลก จนคาดการณ์ว่าอาจมีการแย่งชิงวัคซีนกันได้ หากการระบาดยังไม่บรรเทาลง สำหรับประเทศไทย องค์การเภสัชกรรมก็เร่งมือในการผลิตวัคซีนเช่นกันโดยจะผลิตวัคซีนไข้หวัดใหญ่ H1N1 2009 ชนิดเชื้อเป็นสำหรับพ่นจมูกด้วยการซื้อเทคโนโลยีจากประเทศรัสเซีย และเช่นกันกำลังการผลิตจะไม่เพียงพอ ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกาย ประกอบด้วย การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดที่มีมาแต่กำเนิด (innate immune responses) และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดที่ได้รับในภายหลัง (acquired immune responses) ซึ่งการตอบสนองชนิดหลังนี้ยังสามารถแบ่งย่อยออกได้อีก 2 ชนิดคือ การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิด humoral และชนิด cell-mediated โดยร่างกายจะพัฒนาการตอบสนองขึ้นหลังจากที่เกิดการติดเชื้อ ทั้งนี้เพื่อป้องกันการแพร่กระจายของจุลินทรีย์ก่อโรค และในขณะเดียวกัน ก็ทำหน้าที่กำจัดจุลินทรีย์ก่อโรคนั้นออกจากร่างกายด้วย จึงมีประสิทธิภาพในการป้องกันการติดเชื้อผ่าน “ความจำ” ของระบบภูมิคุ้มกัน โดยอาศัยการตอบสนองของ memory T และ B cells อีกด้วย (McNeela and Mills, 2001)

เป็นที่ทราบกันทั่วไปว่า การให้วัคซีนมีวัตถุประสงค์เพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่เพียงพอและยาวนานต่อการป้องกันโรคติดเชื้อ ในขณะที่วัคซีนที่ทำจากเชื้ออ่อนแรง (Live-attenuated vaccine) สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดี วัคซีนที่ทำจากการทำให้เชื้อตาย (Inactivated vaccine) ซึ่งสามารถแบ่งย่อยเป็น 2 ชนิด ทั้งตัวไวรัส (whole virus) และแบบชิ้นส่วนไวรัส (splitted virion) และวัคซีนชนิด subunit มักต้องการการเติมแอดจูแวนท์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ วัคซีนสำหรับกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันโรค ซึ่งมีใช้กันอยู่โดยทั่วไปนั้น เริ่มพัฒนามาจากวัคซีนแบบที่เรีย หรือไวรัส ชนิดเชื้อเป็น แต่ถูกทำให้อ่อนแรงลง แม้ว่าวัคซีนชนิดเชื้อเป็นนี้จะสามารถกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ทั้งชนิด humoral และชนิด cell-mediated ก็ตาม แต่ตัววัคซีนเอง อาจเปลี่ยนแปลงไปอยู่ในรูปที่มีฤทธิ์แรงขึ้น อันอาจก่อให้เกิดการติดเชื้อเสียเอง แทนการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ ในขณะที่วัคซีนเชื้อตาย และวัคซีนชนิด subunit ซึ่งแม้จะมีความปลอดภัยมากขึ้น แต่ก็สามารถกระตุ้นการตอบสนองได้เพียงเฉพาะชนิด humoral เท่านั้น โดยไม่กระตุ้นให้เกิดการตอบสนองชนิด cell-mediated ซึ่งจำเป็นต่อการกำจัดจุลินทรีย์ก่อโรคที่หลบซ่อนอยู่ภายในเซลล์ (Ada and Blanden, 1994; Ada, 2004) ยิ่งไปกว่านั้น วัคซีนชนิด subunit ซึ่งประกอบด้วยชิ้นส่วนของจุลินทรีย์ก่อโรค เฉพาะส่วนที่มีคุณสมบัติแอนติเจนเท่านั้น ยังมีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ค่อนข้างต่ำอีกด้วย (Stomi et al, 2005) จึงต้องการแอดจูแวนท์และ/หรือระบบนำส่งวัคซีนแอนติเจน ซึ่งสามารถเสริมการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อแอนติเจนนั้น ๆ ให้อยู่ในระดับที่น่าพอใจได้ ด้วยเหตุนี้จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องพัฒนาสูตรตำรับ วิธีการ หรือแนวทางในการให้วัคซีน เพื่อกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจน หรือจุลินทรีย์ก่อโรคที่รวดเร็ว ปลอดภัย และมีประสิทธิภาพ

นับตั้งแต่การค้นพบฤทธิ์เสริมการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (adjuvant activity) ในการป้องกันโรคติดต่อเชื้อของสารประกอบอะลูมิเนียมเมื่อ 80 ปี แล้ว สารต่าง ๆ กว่า 100 ชนิดได้ถูกทดสอบฤทธิ์นี้ทั้งใน pre-clinic และ clinic (Glenny et al., 1926, Vogel and Powel, 1995) พบว่ามีเพียงอะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์และอะลูมิเนียมฟอสเฟต ที่เป็นที่ยอมรับกันทั่วไปให้ใช้ได้ ในวัคซีนมนุษย์ กระนั้นสารทั้งสองนี้ยังได้รับการตรวจสอบอย่างเข้มข้นในระยะหลัง เนื่องจากพบว่า อาจเกี่ยวข้องกับการเกิด macrophagic myofasciitis (Gherardi et al., 2001) และแนวโน้มของพิษอะลูมิเนียมที่สะสมในร่างกายที่อาจเกี่ยวข้องกับ amyotrophic lateral sclerosis, โรคอัลไซเมอร์ และ dialysis-associated dementia (Petrovsky and Aguilar, 2004) ส่วนระบบอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำและ monophosphoryl lipid A เพิ่งเริ่มได้รับการยอมรับในกลุ่มประเทศสหภาพยุโรปให้ใช้ในวัคซีนสำหรับมนุษย์ได้เมื่อไม่นานมานี้ (O'Hagan and De gregorio, 2009)

เนื่องจากการสาธารณสุขมีแนวโน้มที่จะใช้วัคซีนเพิ่มขึ้นทั้งในรูปแบบการป้องกันและการรักษาโรคต่าง ๆ ดังนั้นการค้นหาสารหรือกลุ่มสารประกอบที่มีคุณสมบัติเป็นแอดจูแวนท์จึงเป็นไปอย่างเข้มข้น แอดจูแวนท์ที่ดี ควรมีคุณสมบัติคงตัวสูง สามารถละลายตัวได้ในร่างกาย ราคาถูก โดยตัวเองจะเฉื่อยไม่ก่อให้เกิดการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน แต่จะช่วยเสริมฤทธิ์ให้เกิดการกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่เหมาะสม ไม่ว่าจะเป็นชนิด cellular หรือ antibody immunity ขึ้นกับความต้องการในการป้องกันโรค (Ebelman, 1980) โดยแอดจูแวนท์จะทำหน้าที่เพิ่มการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของแอนติเจนทั้งชนิดบริสุทธิ์หรือชนิด recombinant ลดปริมาณแอนติเจนหรือจำนวนครั้งในการให้วัคซีนที่ใช้ป้องกันโรค เพิ่มประสิทธิภาพของวัคซีนในเด็กแรกเกิด ผู้สูงอายุ และ immuno-compromised persons รวมทั้งใช้เป็นระบบนำส่งแอนติเจน

มีการศึกษามากมาย ถึงการนำอนุภาค มาใช้เป็นแอดจูแวนท์และระบบนำส่งวัคซีนแอนติเจน เพื่อกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Singh and O'Hagan, 2003; Aguilar and Rodriguiz, 2007) เมื่อแอนติเจนหรือระบบนำส่งวัคซีนแอนติเจนในรูปของอนุภาคผ่านเข้าสู่ร่างกาย แอนติเจนหรือระบบนำส่งแอนติเจนนั้น จำเป็นต้องผ่านกระบวนการเปลี่ยนแปลง และกระบวนการนำเสนอแอนติเจน (antigen processing and presentation) โดยอาศัยการทำงานของกลุ่มเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่เรียกว่าเซลล์นำเสนอแอนติเจน (antigen presenting cells, APCs) เช่น มาโครฟาจ (macrophages, M) และเดนไดรติกเซลล์ (dendritic cells, DCs) เป็นต้น จึงจะสามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ (Zinkernagel, 2002) อันตรกิริยาระหว่างระบบนำส่งวัคซีนแอนติเจนหรืออนุภาค กับเซลล์นำเสนอแอนติเจนดังกล่าว จึงเป็นขั้นตอนสำคัญขั้นตอนแรกในการกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกาย ปัจจัยสำคัญประการหนึ่ง ซึ่งพบว่ามีผลต่อการเกิดอันตรกิริยาดังกล่าว ก็คือ คุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของระบบนำส่งวัคซีนแอนติเจน หรืออนุภาคนั้น ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งคุณสมบัติที่บริเวณผิวอนุภาค (Ahsan et al., 2002; Tabata and Ikada, 1988)

แอดจูแวนท์ที่มีการศึกษากันนอกจากกลุ่มอะลูมิเนียมแล้ว (Sokolovska, Hem and HogenEsch, 2007; Hansen et al 2007) สารในกลุ่มอนุภาคได้รับความสนใจมาก เนื่องจากให้การออกฤทธิ์นานแบบ depot effect และให้การกระตุ้นภูมิคุ้มกันทั้งแบบ cellular และแบบ humoral ตัวอย่างเช่น อิมัลชันทั้งชนิดน้ำในน้ำมันและน้ำมันในน้ำ, ลิโปโซม, polymeric microspheres, 15COMs®, virus-like particles กลุ่มอื่นๆได้แก่ พอลิแซ็กคาไรด์, nucleic acids, ซัยโตไคน (Aguilar and Rodriguer, 2007) โดยธรรมชาติของอนุภาคทั้งขนาดและโครงสร้างทางเคมีจะเป็นเครื่องตัดสินถึงประสิทธิภาพในการช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Jansen et al., 2005) โดยส่วนประกอบทางเคมีจะเป็นตัวช่วยตัดสินถึงประเภทของการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เช่นชนิดของ antibody ที่ B cells ผลิต และชนิดของซัยโตไคนที่ T cells ผลิต ทำให้ระบบนี้เป็นกลุ่มแอดจูแวนท์ ที่ได้รับการศึกษาวิจัยมากที่สุด โดยเฉพาะการเป็นแอดจูแวนท์สำหรับวัคซีนชนิดหน่วยย่อย (subunit) และชนิด DNA (Storni et al., 2005)

ระบบอิมัลชันทั้งชนิดน้ำในน้ำมันและชนิดน้ำมันในน้ำจัดเป็นแอดจูแวนท์ที่มีกลไกการเกิด depot ที่บริเวณที่ฉีด ปลดปล่อยแอนติเจนอย่างช้า และกระตุ้นเซลล์ที่ผลิตแอนติบอดี เดิมพบการเกิดอาการข้างเคียงจากการใช้ระบบอิมัลชันเป็นแอดจูแวนท์ เช่น บวมแดง เกิดตุ่มหนอง เป็นต้น (Aguilar and Rodriguez 2007) แต่ปัจจุบัน มีการพัฒนาระบบนี้โดยยังคงความเป็นแอดจูแวนท์ที่มีประสิทธิภาพ แต่มีความคงตัวมากขึ้นและเหนียวน้อยลง ทำให้ง่ายต่อการฉีดและลดการแพ้ โดยพัฒนาในรูปของระบบอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำให้มีขนาดระดับนาโนเมตร (Ott, Barchfeld and Van Nest, 1995) เช่น การพัฒนาแอดจูแวนท์เหล่านี้และนำมาตั้งเป็น

สูตรตำรับวัคซีนสำหรับป้องกัน HIV, มาลาเรียและมะเร็งเต้านม (O'Hagan et al,2002; Alonso et al, 2004; Hariharan and Hanna, 1998) โดยมีสูตรตำรับที่ได้รับการยอมรับในกลุ่มประเทศสหภาพยุโรปและผลิตออกจำหน่ายในรูปวัคซีนใช้ขวดใหญ่ตามฤดูกาล (Fluad®) และในรูปวัคซีนใช้ขวดใหญ่ H5N1 (Focetria®) ที่ได้รับการยอมรับในการระบาดโรค วัคซีนทั้งสองจะใช้ MF 59 ซึ่งเป็นระบบอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำที่มีขนาดระดับนาโนเมตรเป็นแอดจูแวนท์ (www.novartis.ch/downloads/.../2007_09_Novartis_for_BS.pdf, accessed Aug 4, 2009) และในรูปวัคซีนใช้ขวดใหญ่H5N1 (Prepandrix®, Pandemrix®) ที่ได้รับการยอมรับในการระบาดโรคที่ใช้ อิมัลชันน้ำมันในน้ำ (AS03) ผสมกับวิตามิน อี (O'Hagan and DeGregorio, 2009)

Monophosphoryl lipid A (MPL) เป็นไขมันที่ทำหน้าที่เป็น Toll-like Receptors (TLR 4) agonist โดย TLR เป็นโปรตีน transmembrane signaling ที่แสดงออกโดยเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม TLR มีความสำคัญในยุทธศาสตร์ของวัคซีนเนื่องจากการส่งผลเพิ่มจำนวน monocyte / macrophage and dendritic cells โดย TLR จะจดจำ pathogen-specific molecular patterns (PAMPs) แล้วควบคุมและเพิ่มระดับการตอบสนองของ B cell และ T cell (Baldrige and Crane, 1999) โดย การวิจัยมักใช้เป็นแอดจูแวนท์ผสมกับแอดจูแวนท์ตัวอื่นที่มีกลไกการออกฤทธิ์ต่างกันเพื่อเสริมฤทธิ์กัน (Wyde et al 2001; Giannini et al, 2006; Kazzaz et al, 2006, Wheeler 2006; Goto et al, 2009) เช่น สูตรตำรับวัคซีนสำหรับมาลาเรียโดยใช้ MPL ผสมกับ Alum (Garçon, Van Mechele and Wettendorff, 2006) MPL ผสมกับอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (Alonso, 2004) การใช้ MPL ผสมกับ Alum ในวัคซีนป้องกันโรคตับอักเสบบี ที่ได้รับการอนุมัติให้จำหน่ายแล้วในชื่อ Fendrix® (Aguilar and Rodriguez 2007) และในวัคซีนป้องกันโรคมะเร็งปากมดลูก ที่ได้รับการอนุมัติให้จำหน่ายแล้วในชื่อ Cervarix® (O'Hagan and De gregorio, 2009)

วัตถุประสงค์ของโครงการ

การศึกษานี้จึงมุ่งเป้าไปยังการพัฒนาวัคซีนใช้ขวดใหญ่ H1N1 2009 ชนิดเชื้อตาย โดยผลิตไวรัสด้วยกรรมวิธีเพาะในไข่ไก่ฟัก และพัฒนาสูตรตำรับวัคซีนเชื้อตายโรคไข้หวัดใหญ่ H1N1 2009 สำหรับฉีดเข้ากล้ามเนื้อตามรูปแบบปกติ รวมทั้งจะนำเอาแอดจูแวนท์ซึ่งเป็นสารเสริมฤทธิ์ผสมในสูตรตำรับเพื่อช่วยลดปริมาณของแอนติเจนที่จะใช้ รวมทั้งจะทำให้ภูมิคุ้มกันตอบสนองต่อวัคซีนมีความครอบคลุมและมีอายุยาวนาน เพื่อเป็นทางเลือกหนึ่งให้รัฐในการผลิตวัคซีนโดยในกรณีมีการระบาดของโรคระบาดใหม่หรือยังไม่สามารถใช้กระบวนการผลิต (production line) ของวัคซีนใช้สมองอักเสบ เจ อี ที่มีการผลิตที่องค์การเภสัชกรรมในปัจจุบันได้

ขอบเขตของการวิจัย

1. แอนติเจนจะผลิตจากไวรัสไข้หวัดใหญ่ H1N1 2009 เชื้อตาย โดยการเพาะในไข่ไก่ฟัก และแยกส่วนแอนติเจน
2. สูตรตำรับวัคซีนประกอบด้วยไวรัสเชื้อตายไข้หวัดใหญ่ H1N1 2009 และสารเสริมฤทธิ์ภูมิคุ้มกัน (แอดจูแวนท์) อิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำเปรียบเทียบกับสูตรที่ไม่มีแอดจูแวนท์
3. ผลิตแอดจูแวนท์ชนิดอนุภาค polylactide-co-glycolide ขนาดไมโครเมตร
4. การกระตุ้นภูมิคุ้มกันและความปลอดภัยของตำรับวัคซีนที่เตรียมได้จะศึกษาในหนู mouse และลิง โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ

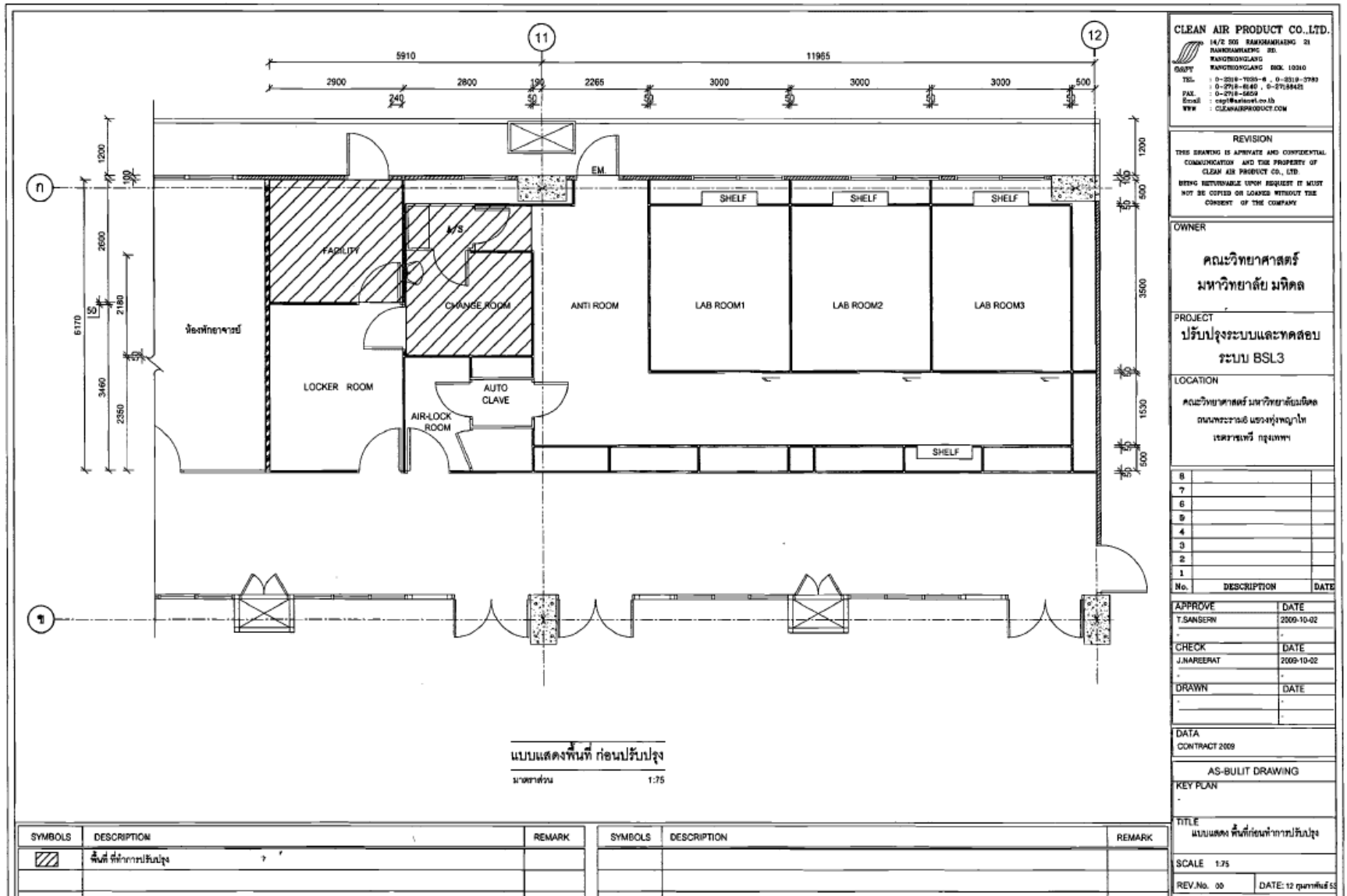
วิธีดำเนินการวิจัย

1. การปรับปรุงห้องปลอดภัยระดับ BSL2+

เนื่องจากการผลิตแอนติเจนจำเป็นต้องกระทำในห้องปลอดภัยระดับ BSL2+ จึงจำเป็นต้องปรับปรุงห้องปฏิบัติการที่ตั้งอยู่ที่คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล ดังแสดงในรูปที่ 1 ให้เป็นห้องชีววิทยาระดับ 2+ (Biosafety Level 2 enhance) โดยได้ดำเนินการปรับปรุงหลักๆ ดังนี้

1. ตรวจสอบรอยรั่วหมดทั้งหมด และทำการซ่อมแซม
2. เปลี่ยน HEPA filter ทั้งของ biosafety cabinet และ ในห้องทั้งหมด เนื่องจากมีอายุ 6 ปีแล้วและใช้การไม่ได้แล้ว
3. ติดตั้งเครื่องปรับอากาศในห้อง locker room และเจาะประตูที่ห้อง change room และ locker room เพื่อให้ทางเข้าออกเป็นคนละทาง และลดปัญหา condensing
4. นำอุปกรณ์ Air-shower ออก เนื่องจากไม่มีความจำเป็นต้องใช้ และเพื่อเพิ่มพื้นที่
5. ปรับระบบ automation ที่ควบคุมห้องให้มี mode กลางคืน ที่ค่อยๆ เพิ่มอุณหภูมิ และลดปริมาณอากาศไหลเวียนเพื่อลดปัญหา condensing ในเวลาเช้ามีด เนื่องจากตึกมีการปิด chiller อีกทั้งจะช่วยประหยัดไฟ
6. ตรวจสอบการทำงานของ biosafety cabinet ทั้ง 3 ตัว และปรับปรุงตามความเหมาะสม
7. ติดตั้ง manual pressure gauge ซึ่งมองเห็นได้สะดวก
8. ย้ายเครื่องสแกนบัตรเข้า-ออกห้องปฏิบัติการมาไว้ที่ประตูห้อง locker room
9. ทำการทดสอบระบบ ตรวจสอบ directional airflow
10. ทำการปรับปรุงเครื่อง autoclave 2 ประตู ซึ่งมีการติดตั้งอยู่แล้ว ให้สามารถใช้งานได้ตามปกติ เพื่อให้การเข้าของขยะติดเชื้อภายในห้องและการออกขยะที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว มีการเข้า-ออกต่างประตูกัน เพื่อเพิ่มความปลอดภัยมากขึ้น

เมื่อทำการปรับปรุงห้องปฏิบัติการชีววิทยาระดับ 2+ แล้ว ได้ดำเนินการทดสอบการทำงานของห้องเสมือนมีการใช้งานปกติเป็นเวลา 1-2 เดือน จากนั้นผู้เชี่ยวชาญจากบริษัทโกลบอลเทค จำกัด ได้ดำเนินการตรวจสอบระบบของห้องปฏิบัติการชีววิทยาระดับ 2+ ซึ่งประกอบด้วย การตรวจสอบการรั่วของ HEPA Filters ของห้องปฏิบัติการ HAPA Filters ของ Biosafety cabinet และ HEPA Filter ที่ติดตั้งตรงจุดก่อนปล่อยอากาศภายในห้องปฏิบัติการออกสู่อากาศภายนอกอาคาร การตรวจสอบค่าความดันภายในห้องต่างๆ ค่าอุณหภูมิ ค่าความชื้น ทิศทางการไหลเวียนของอากาศ และระบบอื่นๆ ที่จำเป็นต่างๆ ให้ได้ตามค่ามาตรฐาน นอกจากนี้ห้องปฏิบัติการที่ปรับปรุงใหม่ได้รับการผ่านการรับรองการประเมินความเสี่ยงทางชีวภาพเรียบร้อยแล้ว จากคณะกรรมการความปลอดภัยทางชีวภาพ ของคณะวิทยาศาสตร์ ยังต้องมีการดำเนินการขอคำรับรองการประเมินความเสี่ยงทางชีวภาพ ในระดับมหาวิทยาลัยด้วย



รูปที่ 1 แบบแสดงพื้นที่ก่อนปรับปรุง

2. การเพาะไวรัสจากไข่ไก่ฟักและผลิตเป็นวัคซีนแอนติเจน

2.1 หัวเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ H1N1 2009 สายพันธุ์วัคซีน

ดำเนินการขอหัวเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ H1N1 2009 ที่เป็นสายพันธุ์วัคซีน A/California/07/09NYMC X-179A (H1N1) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แนะนำโดย WHO และขอได้จาก US-CDC

ไวรัสที่ได้ นำไปเพิ่มจำนวนโดยการฉีดลงในไข่ไก่ฟัก (embryonated egg) ที่สะอาดอายุ 9 วัน แล้วบ่มไว้เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 37 °C หลังจากนั้นเก็บส่วนน้ำไข่เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อไวรัส (Pre-Master seed) ต่อมาได้ทำการเตรียม Master seed โดยวิธีการที่กล่าวมาข้างต้น เพื่อเตรียมไวรัสตั้งต้นที่จะใช้ในการเพาะไวรัสจากไข่ไก่ฟักและผลิตเป็นวัคซีนแอนติเจน ในเบื้องต้นได้ทำการตรวจวัดความเข้มข้นของไวรัสโดยการจับกันระหว่างโปรตีนบนผิวของไวรัส (Hemagglutinin) กับ Receptor บนผิวเม็ดเลือดแดงของห่าน (GRBC) ซึ่งเรียกว่าวิธี Hemagglutination Test และทำการวัดความเข้มข้นของไวรัสจากความสามารถในการติดเชื้อ (Infectious unit) โดยวิธี Plaque assay

2.2 การเพาะไวรัสจากไข่ไก่ฟักและผลิตเป็นวัคซีนแอนติเจน

2.2.1 การหาปริมาณไวรัสที่เหมาะสมที่ทำให้ได้จำนวนไวรัสสูงสุด

ไวรัส Master seed ที่ปริมาณต่างๆ (512 – 0.5 Hemagglutination units, HAU) ได้นำไปเพิ่มจำนวนโดยการฉีดลงในไข่ไก่ฟัก (embryonated egg) ที่สะอาดอายุ 11 วัน จำนวน 4 ใบต่อ 1 Dose แล้วบ่มไว้เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 37 °C หลังจากนั้นเก็บส่วนน้ำไข่มาตรวจสอบความเข้มข้นของ HAU ของไวรัส โดยวิธี Hemagglutination Test

2.2.2 การเพาะไวรัสจากไข่ไก่ฟัก การกำจัดสิ่งเจือปนขั้นต้น และการทำให้เข้มข้นขึ้น

เตรียมไวรัสที่มีความเข้มข้นจาก ผลการทดลองข้อ 2.2.1 แล้วเพิ่มจำนวนตามวิธีการที่กล่าวข้างต้น โดยใช้ไข่ไก่ฟักจำนวน 100 ใบ หลังจากบ่มเป็นเวลา 3 วัน น้ำไข่ผ่านการกำจัดเอาส่วนที่เป็น particle ขนาดใหญ่กว่าขนาดของไวรัสทิ้ง ขั้นตอนแรกนำไข่ผ่านการ centrifuge ที่ความเร็ว 4,000 rpm 5 นาที หลังจากนั้นส่วน supernatant จะนำมาปั่นที่ความเร็ว 10,000 rpm 15 นาที โดยทั้งสองขั้นตอนจะทำที่อุณหภูมิ 4 °C ส่วนที่เป็น pellet จะนำมาเติม 1.5 M NaCl แล้ววางบนน้ำแข็ง 1 ชั่วโมง เพื่อทำการดึงเชื้อไวรัสที่เกาะติดอยู่กับเศษก้อนเซลล์ออกมาอยู่ในสารละลาย หลังจากนั้นปั่นที่ 1,500 rpm 5 นาที เพื่อแยกส่วนตะกอนทิ้งไป (Hughes *et al*, 2007) ส่วน supernatant ได้นำไปรวมกับส่วน supernatant ที่ผ่านการปั่นที่ 10,000 rpm แล้วนำไปกรองด้วย sterile filter membrane ที่มี ขนาด 0.8 um และ 0.22 um ตามลำดับ แล้วทำให้เชื้อไวรัสเข้มข้นขึ้นโดยวิธี Tangential Flow Filtration (TFF) (1,000 KDa MWCO, Millipore) ในทุกๆ ขั้นตอนได้เก็บตัวอย่าง 200 – 1,000 ul เพื่อใช้ในการตรวจวัดความเข้มข้นของไวรัสโดยวิธี Hemagglutination Test และคำนวณปริมาณไวรัสที่สูญเสียไปในแต่ละขั้นตอน

2.2.3 การทำให้เชื้อตายและการทดสอบเชื้อตาย

หลังจากนั้นเชื้อไวรัสเข้มข้นได้นำมาทำการทำให้เชื้อไม่มีความสามารถในการติดเชื้อ แต่ส่วนของ Hemagglutinin ยัง active ตามวิธีการของ CDC โดยสารเคมีที่ใช้ คือ Beta-propiolactone หลังจากนั้น inactivated virus ได้ถูกนำมาตรวจสอบ

ว่าไวรัสไม่มีความสามารถในการติดเชื้อแล้ว ด้วยการใส่ไวรัสเชื้อตายใน MDCK cell culture เป็นเวลา 6 วัน ตรวจสอบพยาธิสภาพของเซลล์และวัดความเข้มข้นของไวรัสที่อาจผลิตออกมาในส่วนของอาหารของเซลล์ โดยวิธี Hemagglutination Test และ Plaque assay

2.2.4 การทำให้ไวรัสแอนติเจนบริสุทธิ์

เมื่อไวรัสตายแล้วจึงนำออกมาแยกโปรตีนอื่นๆออกจากไวรัสโดยใช้ Affinity Chromatography ซึ่งใช้ Cellufine Sulfate (Wolff MW *et al*, 2010) เป็นตัวจับกับไวรัส โดยใช้เครื่อง Fast Liquid Chromatography (FPLC) (GE) การเก็บไวรัสที่จับอยู่ใน column ทำโดยการล้างด้วย Buffer แล้วชะออกด้วย Buffer ที่มีเกลือ NaCl ที่ความเข้มข้นช่วง 0.1 – 3 Molar จากนั้นทำการกำจัดเกลือความเข้มข้นสูงออกจากไวรัสโดยวิธี Tangential Flow Filtration (300 KDa MWCO, Millipore) ไวรัสถูกเก็บใน Phosphate Buffer Saline (pH 7.2) ที่ 4°C เพื่อรอการตรวจสอบความบริสุทธิ์และวัดปริมาณ active HA แอนติเจนต่อไปก่อนที่จะนำไปทำให้แตก

3. แอนติเจนมาตรฐานและแอนติบอดีสำหรับตรวจวัดปริมาณแอนติเจน H1N1 2009

ในการตรวจวัดปริมาณ ความเข้มข้น และความจำเพาะของวัคซีนแอนติเจนที่เตรียมได้ จำเป็นต้องใช้แอนติเจนมาตรฐานและแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสายพันธุ์ของไวรัสเพื่อให้ความเข้มข้นที่วัดได้มีความถูกต้อง แม่นยำมากยิ่งขึ้น ทางคณะผู้วิจัยจึงได้ดำเนินการขอแอนติเจนและแอนติบอดีที่แนะนำโดย WHO และขอได้จาก UK-CDC, Division of Virology, National Institute for Biological Standards and Control, Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire, EN6 3QG, United Kingdom. standards@nibsc.hpa.org.uk

1. แอนติเจนมาตรฐานของไวรัสสายพันธุ์ A/California/07/09NYMC X-179A (H1N1) ซึ่งผ่านการเพิ่มจำนวนในเซลล์, Reference Lot number 09/174, ความเข้มข้น 45-55 ug HA / ml เตรียมเมื่อ 28 สิงหาคม 2552
2. แอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสสายพันธุ์ A/California/07/09NYMC X-179A (H1N1) ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่เตรียมในแกะแอนติบอดี Lot number 09/152 เตรียมเมื่อ 21 ก.ค. 2552

4. เตรียมตำรับวัคซีนผสมแอดจูแวนท์

4.1 แอดจูแวนท์ที่นำเข้า

ติดต่อบริษัท อีมีลชันซินดิเนอมน้ำมันในน้ำ (oil in water emulsion) จาก Infectious Disease Research Institute, Seattle ประเทศสหรัฐอเมริกา เพื่อนำมาผสมกับ แอนติเจนและผลิตเป็นวัคซีน ตามมาตรฐาน GMP โดยอีมีลชันที่ใช้มีรายงานว่าปลอดภัย รวมทั้งใช้ Complete Freund's Adjuvant จะนิยมใช้และมีจำหน่ายเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยในสัตว์ทดลอง แอดจูแวนท์อีกชนิดคือชนิด Toll-like Receptor 3 (TLR3) agonist ซึ่งมีการจำหน่ายจากต่างประเทศ

4.2 แอดจูแวนท์ชนิดอนุภาคที่คณะผู้วิจัยผลิตเอง

คณะผู้วิจัยคัดเลือกที่จะใช้ polylactide-co-glycolide (PLGA), ไคโตซาน (CS) และ aluminium hydroxide ($Al(OH)_3$) มาเตรียมเป็น แอดจูแวนท์ ด้วยเป็นสารที่มีความปลอดภัยและมีรายงานว่าสามารถเสริมฤทธิ์วัคซีนได้มาเตรียมเป็น แอดจูแวนท์ชนิดอนุภาคขนาดไมโครเมตร

4.2.1 แอดจูแวนท์ชนิดอนุภาคของ polylactide-co-glycolide (PLGA)

เตรียมอนุภาค PLGA ด้วยวิธีเทคนิค double emulsion solvent evaporation (Prieto et al., 1994) โดยมีตัวแปรของ สูตรตำรับเพื่อให้ได้ขนาดและคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ตามต้องการดังนี้

ก. อัตราส่วนปริมาตรของน้ำและน้ำมันใน emulsion ปฐมภูมิ

ข. ความเข้มข้นของ polyvinyl alcohol (PVA)

ค. อัตราส่วนปริมาตร emulsion ปฐมภูมิ:สารละลาย PVA

ง. ชนิดของเครื่อง sonicator ขณะเตรียม emulsion ทุติยภูมิ

ละลาย PLGA ให้ได้ 5% น้ำหนัก/น้ำหนักในสารทำละลาย dichloromethane (DCM) จากนั้นผสมน้ำลงใน 8 มล ของสารละลาย PLGA ให้ได้อัตราส่วนปริมาตร 1:2.5, 1:5 และ 1:10 โดยการใช้ probe sonicator มาตรฐานที่มี เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มม ที่ 20 output เป็นเวลา 10 วินาทีเพื่อให้เกิด w/o emulsion ปฐมภูมิ เติมสารละลาย polyvinyl alcohol (PVA) ความเข้มข้น 1%, 2% และ 4% น้ำหนักต่อปริมาตรลงใน emulsion ปฐมภูมิ ในอัตราส่วนปริมาตร emulsion ปฐมภูมิ: สารละลาย PVA ที่ 1:2 และ 1:4 เพื่อให้ได้ emulsions ทุติยภูมิโดยวิธี sonication แบบ bath sonicator หรือ probe sonicator จากนั้นทำให้เจือจางด้วย 1% น้ำหนัก/ปริมาตรของ PVA ในปริมาณ 100 มล แล้วระเหยสารทำละลายโดยการกวนที่ 500 รอบ ต่อนาทีเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างอนุภาคที่ได้ด้วยน้ำกลั่นและเก็บรวบรวมโดยการ centrifugation ที่ 10,000 g เป็นเวลา 5 นาที

4.2.2 แอดจูแวนท์ชนิดอนุภาคของ PLGA ที่เคลือบด้วยไคโตซาน (CS)

เตรียมโดยการเติม CS ความเข้มข้น 2% น้ำหนักต่อปริมาตรลงในอนุภาค PLGA ที่ได้ 4.2.1 ที่ centrifugation แล้ว หรือระหว่างการผสมในขั้นตอนการเจือจางด้วยสารละลาย PVA โดยปริมาตรของ CS ที่เติมจะให้เกินพอสำหรับการเคลือบ จากนั้น vortex เป็นเวลา 15 นาทีและเขย่าเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนการทิ้งไว้ข้ามคืน CS ส่วนเกินจะถูกแยกออกโดยการ centrifugation ที่ 10,000 g เป็นเวลา 5 นาที

4.2.3 แอดจูแวนท์ชนิดอนุภาคของ PLGA ที่เคลือบด้วย $Al(OH)_3$

จะทำการเติม $Al(OH)_3$ ความเข้มข้น 0.75% หรือ 1.5% น้ำหนักต่อปริมาตร ลงบนอนุภาคที่ centrifugation แล้วโดย ปริมาณของ aluminium = 0.85 มก สำหรับแต่ละ dose ของวัคซีนที่ใช้กับมนุษย์ตาม US code of federal regulations (610.15(a)) ที่อนุญาตไม่เกิน 0.85 มกต่อ dose

4.3 การประเมินคุณสมบัติของอนุภาค

4.3.1 ขนาดและการกระจายขนาด

ขนาดและการกระจายขนาดของอนุภาคจะทำการประเมินด้วยเครื่อง laser diffractometer (Mastersizer 2000, Malvern, UK) โดยการกระจายตัวอย่างในสารละลาย tween 80 ที่มีความเข้มข้น 1% ปริมาตร/ปริมาตร แล้วทำการ bath sonicate เพื่อการกระจายอนุภาคก่อนการอ่านค่าเป็นขนาด percentile size ที่ 10, 50 and 90% โดยรายงานเป็น D(v,0.1), D(v,0.5) และ D(v,0.9) การกระจายขนาดจะวัดเป็นค่า absolute deviation จาก median โดยรายงานเป็นค่า uniformity

4.3.2 รูปร่างของอนุภาค

รูปร่างของอนุภาคจะดูจาก optical microscopes (E200, Nikon Eclipse, Japan) แล้วจะดูจาก scanning electron microscopy (SEM, JEOL, JSM-5410LV, Jeol, Japan) ซึ่งตัวอย่างจะติดกับ specimen holder โดยใช้เทปกาวสองหน้า แล้วเคลือบด้วยทองคำก่อนนำไปส่องและถ่ายภาพ

4.3.3 ลักษณะพื้นผิวของอนุภาค

ลักษณะพื้นผิวของอนุภาคจะดูจาก atomic force microscopy (SPA 400-DFM, Seiko Instruments Inc., Japan) โดยตัวอย่างจะติดกับฟิล์มบางบนแท่นใส่และเรียบก่อนการให้ลำแสงเลเซอร์ บันทึกเป็นลักษณะพื้นผิวสามมิติ

4.3.4 ประจุบนพื้นผิว

วัดประจุบนพื้นผิวด้วย photon correlation spectrophotometer (Zetasizer nanoseries, Nano-ZS, Malvern, UK) โดยเจือจางตัวอย่างเป็น 2 มล แล้ววัดประจุบนพื้นผิวอนุภาคที่ 25 °ซ

4.3.5 ปริมาณสารทำละลายอินทรีย์ที่หลงเหลือ

วัดปริมาณสารทำละลายอินทรีย์ที่หลงเหลือในอนุภาค PLGA ที่คัดเลือกแล้วด้วยวิธี chromatography (Schimudzu GC-7AG, Japan) บรรจุตัวอย่าง 3 มล ใน vial แล้วปิดสนิทก่อนนำไปทำให้ร้อนที่ 50 °ซเพื่อระเหย dichloromethane ซึ่งจะถูกฉีดผ่าน 5% SE-30 column (3.3mm.x 2mm.) ภายใต้สภาวะดังนี้ : อุณหภูมิ column 50 °ซ, อุณหภูมิที่ฉีด 180 °ซ, อัตราการไหลของไนโตรเจน 20 มล/นาที เส้นกราฟมาตรฐานของความเข้มข้นต่างๆ ก็ดำเนินด้วยวิธีเดียวกัน

4.4 การเตรียมตำรับวัคซีนตามมาตรฐาน GMP

เตรียมตำรับวัคซีนผสมแอดจูแวนท์

แอดจูแวนท์ที่นำเข้า

เนื่องจาก แอดจูแวนท์ชนิด น้ำในน้ำมัน ยังไม่ได้มีการจัดส่งให้ จึงได้ใช้ Complete Freund's Adjuvant ซึ่งเป็น adjuvant ที่ประกอบด้วย mannide monooleate, paraffin oil และ Mycobacterium butyricum ที่ inactivate และทำให้แห้ง แล้ว Complete Freund's Adjuvant จะนิยมใช้และมีจำหน่ายเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยในสัตว์ทดลอง แอดจูแวนท์อีกชนิดคือ ชนิด Toll-like Receptor 3 (TLR3) agonist โดยนำมาผสมให้เข้ากันตามหลัก GMP ตำรับวัคซีนจะเตรียมจากแอนติเจนที่ทำให้บริสุทธิ์และทราบปริมาณความเข้มข้น ให้ได้ความเข้มข้นของ haemagglutinin (HA) 1 ug HA/0.1 ml

นอกจากนี้ยังเตรียมตัวรับวัคซีนซ้ำเพื่อศึกษาถึงความสามารถในการผลิตซ้ำ โดยได้เตรียมแอนติเจนขึ้นใหม่ตามกรรมวิธีเดิมทุกประการ และใช้ Complete Freund's Adjuvant โดยนำมาผสมให้เข้ากันตามหลัก GMP ตัวรับวัคซีนจะเตรียมจากแอนติเจนที่ทำให้บริสุทธิ์และทราบปริมาณความเข้มข้น ให้ได้ความเข้มข้นของ haemagglutinin (HA) 1 ug HA/0.1 ml

5. การทดสอบในสัตว์ทดลอง (หนู mice)

ในการศึกษาประสิทธิภาพของแอนติเจนและแอดจูแวนท์ หนู Balb/c mice อายุ 4 สัปดาห์ จำนวน 16 ตัวจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ ศาลาया จะถูกสุ่มมาใช้ในการศึกษาโดยแบ่งเป็น 4 กลุ่มดังนี้

1. น้ำกลั่นเป็น control (n=4)
2. วัคซีน H1N1 2009 split ความเข้มข้น 1 ug HA/0.1 ml ที่ไม่มีแอดจูแวนท์ (n=4)
3. วัคซีน H1N1 2009 split ความเข้มข้น 1 ug HA/0.1 ml ที่มีแอดจูแวนท์ Complete Freund's (n=4)
4. วัคซีน H1N1 2009 split ความเข้มข้น 1 ug HA/0.1 ml ที่มีแอดจูแวนท์ TLR3 agonist (n=4)

หนูแต่ละตัวจะถูกฉีดวัคซีนสูตรข้างต้นในปริมาตรครั้งละ 0.1 ml โดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อ 2 ครั้ง ณ วันที่ 0 และ ที่ 19

ในการศึกษาถึงความสามารถในการเตรียมซ้ำได้ หนู Balb/c mice เพศเมีย อายุ 10 สัปดาห์ จำนวน 12 ตัวจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ ศาลาया จะถูกสุ่มมาใช้ในการศึกษาโดยแบ่งเป็น - กลุ่มดังนี้

1. วัคซีน H1N1 2009 split ความเข้มข้น 1 ug HA/0.1 ml ที่เตรียมใหม่และไม่มีแอดจูแวนท์ (n=4)
2. วัคซีน H1N1 2009 split ความเข้มข้น 1 ug HA/0.1 ml ที่เตรียมเดิมและไม่มีแอดจูแวนท์ (n=4)
3. วัคซีน H1N1 2009 split ความเข้มข้น 1 ug HA/0.1 ml ที่เตรียมใหม่และมีแอดจูแวนท์ Complete Freund's (n=4)

หนูแต่ละตัวจะถูกฉีดวัคซีนสูตรข้างต้นในปริมาตรครั้งละ 0.1 ml โดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อ 2 ครั้ง ณ วันที่ 0 และ ที่ 19

การวัดความปลอดภัยเบื้องต้น

บริเวณที่ฉีดจะถูกตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาต่างๆ ที่อาจเกิดขึ้น เช่น ผื่นแดง บวม ตุ่ม ฝื่นหนองหรือลักษณะความผิดปกติอื่นๆ

การวัดภูมิคุ้มกัน

จะทำการเก็บ serum ก่อนฉีดวัคซีน วันที่ 0 และหลังฉีดวันที่ 11 และ 33 หลังการฉีดวัคซีนแต่ละครั้ง โดยนำเหลืองจะนำไปตรวจหาแอนติบอดีต่อ HA โดยวิธี hemagglutination inhibition assay

ทั้งนี้ protocol การศึกษาได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมในการใช้สัตว์ทดลองคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การศึกษานี้จะศึกษาที่แผนกสัตว์ทดลองของ USAMC-AFRIMS ซึ่งเป็นแผนกสัตว์ทดลองที่ใหญ่ที่สุดในเอเชีย และได้รับการรับรองจาก Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC) และ

ได้รับการยอมรับจาก Animal Welfare Assurance on file with the Office of Laboratory Animal Welfare (OLAW), U.S.
National Institutes of Health (NIH)

ผลการวิจัยและอภิปราย/วิจารณ์

1. การปรับปรุงห้องปลอดภัยระดับ BSL2+

การปรับปรุงห้องปฏิบัติการ ได้ดำเนินการทั้ง 10 หัวข้อ ซึ่งสามารถแสดงแบบ (Layout) ของห้องปฏิบัติการที่ปรับเปลี่ยนเป็นแบบในรูปแบบที่ 2 และส่วนฝั่ง manual pressure gauge จะแสดงในรูปแบบที่ 3 หลังจากที่มีการปรับปรุงห้องเรียบร้อยแล้ว ห้องปฏิบัติการได้มีการตรวจสอบระบบให้ได้ตามค่ามาตรฐานในเบื้องต้นแล้ว เช่น ค่าอุณหภูมิ ค่าความชื้น ทิศทางการไหลเวียนของอากาศ ค่าความดัน ภายในห้องต่างๆ รวมถึง ภายใน biosafety cabinet ทั้ง 3 ตัว เมื่อการทดสอบการทำงานของห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 2-3 เดือน ได้รับรายงานผลการตรวจสอบ ระบบอากาศของห้องปฏิบัติการ BIOSAFETY LABORATORY-2 ENHANCED จากบริษัทโกลบอลเทค จำกัด เรียบร้อยแล้ว (CERTIFICATION NO. CR 153) ดังแสดงในภาคผนวก 1 โดยระบบต่างๆ “ผ่าน (PASSED)” เกณฑ์มาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการ BSL2+ นอกจากนี้ ห้องปฏิบัติการยังผ่านการรับรองการประเมินความเสี่ยงทางชีวภาพในระดับมหาวิทยาลัย ดังแสดงในเอกสาร Conferment of Biosafety Certificate Mahidol University, Thailand (Approval No. MU 2010-001) ในภาคผนวก 2

นอกจากนี้ได้มีการทำคู่มือ Standard Operating Procedure (SOP) ในการปฏิบัติงานในห้องชีววิทยาระดับ 2+ (Biosafety Level 2 enhance) ที่ปรับปรุงใหม่ด้วย

2. หัวเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ H1N1 2009 สายพันธุ์วัคซีน

ในการเตรียม Pre-master seed และ Master seed พบว่าไวรัสที่ขอมาจาก CDC ยังสามารถทำให้เพิ่มจำนวนในไข่ไก่ฟักได้ ผู้วิจัยจึงเตรียมไวรัสเพื่อเป็นหัวเชื้อตั้งต้นเอาไว้เป็น 2 หัวเชื้อตั้งต้นคือ Pre-Master seed และ Master seed ซึ่งความเข้มข้นและปริมาตรที่เตรียมแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เข้มข้นและปริมาตรที่เตรียมของ Pre-Master seed และ Master seed

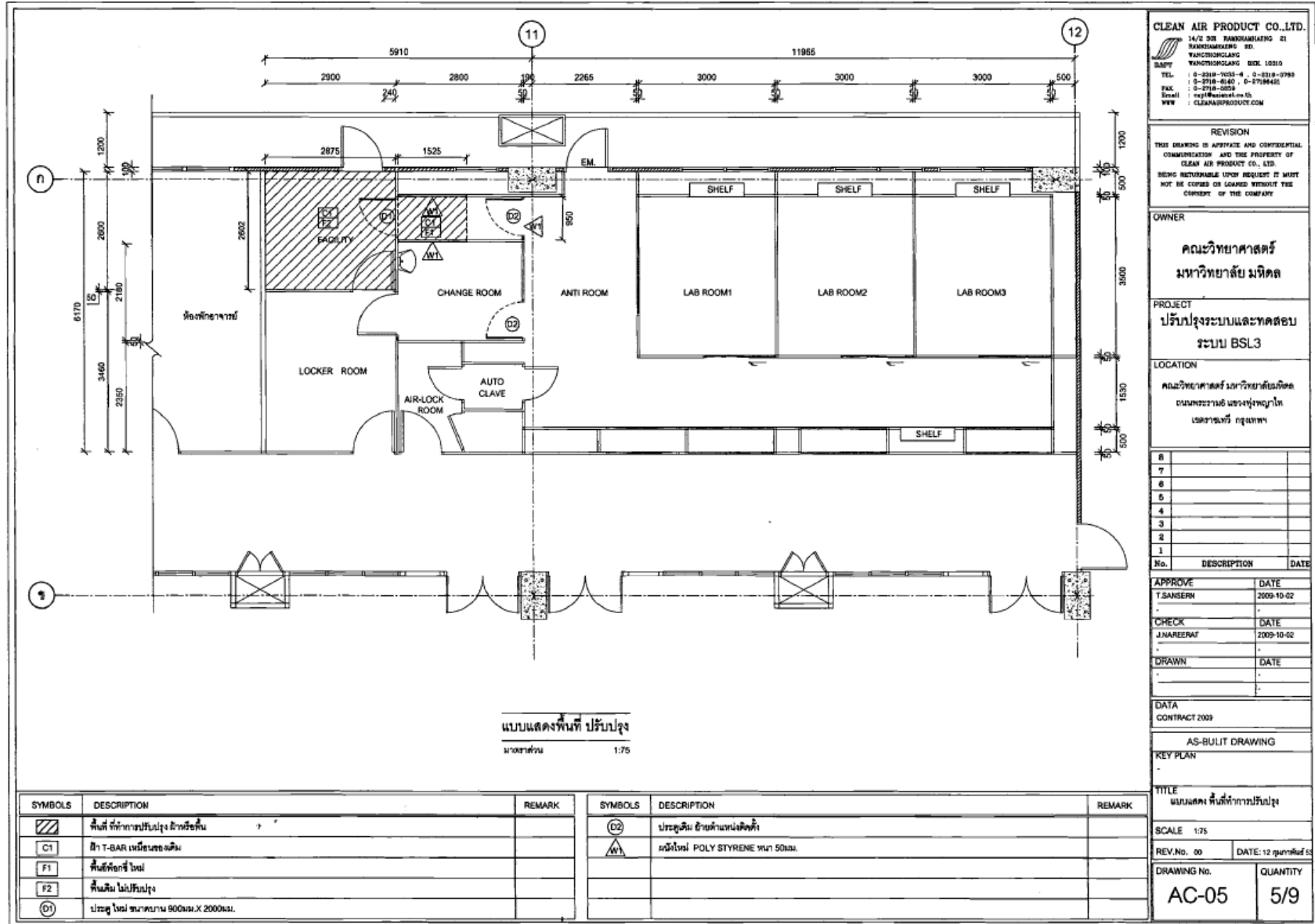
| หัวเชื้อตั้งต้น | ความเข้มข้นไวรัส* (HA units/ 50ul) | ความเข้มข้นไวรัส** (PFU/ml) | ปริมาตรไวรัส ทั้งหมด (ml) | จำนวน tube | ปริมาตร/ tube (ml) |
|--------------------|---------------------------------------|--------------------------------|------------------------------|---------------|-----------------------|
| 1. Pre-master seed | 256 – 512 | ไม่ได้วัด | 3 | 3 | 1 |
| 2. Master seed | 128 | 3.8×10^7 | 10 | 40 | 0.25 |

*Hemagglutination Test

**Plaque assay (PFU = Plaque forming Units)

หัวเชื้อทั้งสองนี้เก็บแช่แข็งไว้ในตู้อุณหภูมิต่ำ -80°C เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้นในการผลิตวัคซีนแอนติเจนต่อไป ส่วนความเข้มข้นของไวรัสของหัวเชื้อตั้งต้นเป็นข้อมูลที่สำคัญที่จะใช้ในการปรับเพื่อหาปริมาณไวรัสตั้งต้นที่เหมาะสมในการใช้เพิ่ม

จำนวนไวรัสในไข่ไก่ฟักแล้วให้ได้ปริมาณแอนติเจนสูงสุด โดยการเพิ่มจำนวนไวรัสสายพันธุ์วัคซีนนี้สามารถดำเนินการได้ใน BSL2 enhance



รูปที่ 2 แบบแสดงพื้นที่หลังจากปรับปรุง

3. การหาปริมาณไวรัสที่เหมาะสมที่ทำให้ได้จำนวนไวรัสสูงสุด

ผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 3 พบว่าปริมาณไวรัส Master seed ตั้งต้นที่ฉีดลงในไข่ไก่ฟัก 32 HAU/ 200 ul ถึง 512 HAU/ 200 ul จะได้ความเข้มข้นของ HA 32 ถึง 128 HAU/ 50 ul เมื่อใช้ปริมาณไวรัส Master seed ตั้งต้น 0.5 – 8 HAU/ 200 ul ความเข้มข้นของไวรัสที่ได้จะอยู่ในช่วง 128 – 256 HAU/ 50 ul

ตารางที่ 3 แสดงความเข้มข้นของไวรัสที่ได้เมื่อเริ่มด้วยไวรัส Master seed ปริมาณต่างๆ

| ปริมาณไวรัสตั้งต้น (HAU/ 200 ul/ 1 ใบ) | ความเข้มข้นของไวรัส (HAU/ 50 ul) (ผลจากไข่ 4 ใบ) |
|---|---|
| 512 | 32 - 128 |
| 128 | 32 - 64 |
| 32 | 32-128 |
| 8 | 128-256 |
| 2 | 128 |
| 0.5 | 128-256 |

จากข้อมูลข้างต้น ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ ความเข้มข้นของไวรัสของหัวเชื้อตั้งต้น 0.5 HAU/ 200 ul/ 1 ใบ เพื่อใช้เพิ่มจำนวนไวรัสในไข่ไก่ฟักแล้วให้ได้ปริมาณแอนติเจนสูงสุด และประหยัด Master seed มากที่สุด

4. การเพาะไวรัสจากไข่ไก่ฟัก การกำจัดสิ่งเจือปนขั้นต้น และการทำให้เข้มข้นขึ้น

จากการเตรียมไวรัสจำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 100 ใบ พบว่าหลังจากได้รับไขมีประมาณ 2-5 ใบที่ไม่สามารถใช้ฉีดไวรัสได้ เนื่องจากไม่มีตัวอ่อน หรือไข่แตกแล้ว เป็นต้น หลังจากบ่มเชื้อในไข่ไก่ฟักเป็นเวลา 3 วัน ไข่ส่วนใหญ่ยังมีชีวิตอยู่ แต่จะมีบางใบที่ไข่ตายเนื่องมาจากความยากในการฉีดไวรัสลงในไข่ ปลายเข็มอาจจะไปถูกอวัยวะที่สำคัญ ซึ่งทำให้จำนวนไข่ที่ดีที่สามารถเก็บน้ำไข่ได้เหลือประมาณ 90-96 ใบ ในทุกๆ ขั้นตอนของการทำไวรัสให้บริสุทธิ์น้ำไข่หรือไวรัสถูกแบ่งเก็บประมาณ 200 – 1,000 ul เพื่อวัดปริมาณความเข้มข้นของไวรัสที่ **อาจจะสูญเสียไปบ้าง ปริมาตรและความเข้มข้นของไวรัสที่วัดได้แสดงดังตารางที่ 4**

พบว่าปริมาณไวรัสที่ผ่านการกำจัดสิ่งเจือปนขั้นต้นแล้วไม่ทำให้ไวรัสสูญเสียไป แต่เมื่อเทียบปริมาณไวรัสระหว่างก่อนและหลังการทำให้เข้มข้น ปริมาณไวรัสสูญเสียไป 26.5% ซึ่งไม่ได้เกิดจากการรั่วของ Membrane แต่เนื่องจากการวัดความเข้มข้นของไวรัสด้วยวิธีนี้สามารถเกิดค่าคาดเคลื่อนได้ 2 เท่า ไม่สามารถหาปริมาณที่แน่นอนได้ อย่างไรก็ตาม ปริมาณไวรัสจะวัดด้วยวิธีมาตรฐาน คือวิธี single-radial-immunodiffusion tests (SRID) (Wood JM *et al*, 1983) เพื่อที่จะทำให้ได้ปริมาณแอนติเจนที่แน่นอน

ตารางที่ 4 ปริมาณไวรัสที่เตรียมได้ และเปอร์เซ็นต์ของปริมาณไวรัสที่สูญเสียไปในแต่ละขั้นตอนของการกำจัดสิ่งเจือปนขั้นต้น และการทำให้เข้มข้นขึ้น

| ไวรัสในแต่ละขั้นตอน | ปริมาตร (ml) | HA titer (HAU/ 50ul) | Total HAU | ปริมาณไวรัสที่สูญเสีย(%) |
|--|--------------|----------------------|--------------------|--------------------------|
| ไวรัสในน้ำไข่ตั้งต้น | 1,375 | 128 | 3.52×10^6 | |
| ไวรัสในน้ำไข่ก่อนการทำให้เข้มข้น | 1,400 | 128 | 3.58×10^6 | 0 |
| ไวรัสในน้ำไข่หลังจากทำ TFF (1,000 KDa MWCO) | 51.4 | 2,560 | 2.63×10^6 | 26.5 * |
| ไวรัสในส่วนที่สามารถผ่าน membrane (1,000 KDa MWCO) | 1,350 | 0 | 0 | 0 |

HAU = HA units

5. การทำให้เชื้อตายและการทดสอบเชื้อตาย

ไวรัสทั้งหมดที่เข้มข้นได้นำไปเติม Beta-propiolactone (BPL) เพื่อทำการทำให้หมดความสามารถในการติดเชื้อผลการตรวจวัดปริมาณ HA แอนติเจน (HAU) และปริมาณไวรัสที่สามารถติดเชื้อได้ (PFU) หลังจากทำให้เชื้อตายแสดงในตารางที่ 5 จะเห็นว่าไวรัสปriorเติมสารยังมีความสามารถในการติดเชื้อ แต่หลังจากทำให้เชื้อตายไวรัสไม่มีความสามารถในการติดเชื้อแต่ยังสามารถเกิด Hemagglutination ได้ แสดงว่า HA แอนติเจนบนผิวของไวรัสยัง active แสดงว่าวิธีการทำให้เชื้อตายมีประสิทธิภาพ

ตารางที่ 5 ปริมาณ HA แอนติเจน (HAU) และปริมาณไวรัสที่สามารถติดเชื้อได้ (PFU) หลังจากทำให้เชื้อตาย

| ไวรัสในแต่ละขั้นตอน | ปริมาตร (ml) | HA titer (HAU/ 50ul) | Total HAU | PFU titer (PFU/ ml) | Total PFU |
|-----------------------------------|--------------|----------------------|--------------------|---------------------|-----------------------|
| ไวรัสในน้ำไข่ตั้งต้น | 1,375 | 128 | 3.52×10^6 | 1.12×10^7 | 1.53×10^{10} |
| ไวรัสในน้ำไข่หลังการทำให้เข้มข้น | 51.4 | 2,560 | 2.63×10^6 | 5.4×10^7 | 2.78×10^9 |
| ไวรัสในน้ำไข่หลังจากทำให้เชื้อตาย | 56 | 1,024 | 2.86×10^6 | 0 | 0 |

6. การทำให้ไวรัสแอนติเจนบริสุทธิ์

6.1 Affinity chromatography

หลังจากทำ Affinity chromatography ผลการวัด HA titer ของไวรัสที่ไหลผ่าน column ออกมาในแต่ละขั้นตอนแสดงในตารางที่ 6 โดยเริ่มจาก BPL-H1N1 1×10^6 HAU การกรองด้วย filter ขนาด 0.45 um ก่อนนำไปทำ Affinity chromatography จะทำให้ปริมาณลดลง อาจจะเป็นเพราะไวรัสไปจับกับโปรตีนในน้ำไข่ที่ยังเหลืออยู่ ทำให้ไม่สามารถกรองผ่านลงมาได้ ขั้นตอน Adsorption คือทำให้ไวรัสเกาะกับ cellulose sulfate ที่อยู่ใน column ส่วนโปรตีนอื่นๆ จะหลุดออกมา จะเห็นได้ว่าไม่มีไวรัสไหลผ่านออกมาแต่เกาะอยู่ใน column

ขั้นตอน Washing ไม่มีไวรัสหลุดออกมาเช่นกัน เมื่อชะไวรัสออกจาก column แล้ววัดปริมาณไวรัสได้ 604,800 HAU อย่างไรก็ตาม จะต้องทำการวัดปริมาณแอนติเจนอีกครั้งโดยวิธี SRID เพื่อทราบ % ปริมาณไวรัสที่สูญเสียที่แน่นอน

ตารางที่ 6 ปริมาณไวรัส และเปอร์เซ็นต์ของปริมาณไวรัสที่สูญเสียไปในแต่ละขั้นตอนของการทำ Affinity chromatography

| ไวรัสในแต่ละขั้นตอน | ปริมาตร (ml) | Total HAU | ปริมาณไวรัสที่สูญเสีย (%) |
|--|--------------|-----------|---------------------------|
| ไวรัสที่ทำให้ตายด้วย BPL | 50 | 1,024,000 | |
| ไวรัสที่ทำให้ตายด้วย BPL แล้วเจือจาง 1:1 ด้วย Adsorption Buffer | 100 | 1,024,000 | 0 |
| ไวรัสที่ทำให้ตายด้วย BPL แล้วเจือจาง 1:1 ด้วย Adsorption Buffer แล้วกรองผ่าน filter ขนาด 0.45 um | 100 | 512,000 | 50 |
| ไวรัสที่ไม่เกาะอยู่ใน column ในขั้นตอน Adsorption | 110 | - | 0 |
| ไวรัสที่ไม่เกาะอยู่ใน column ในขั้นตอน Washing | 80 | - | 0 |
| ไวรัสที่ถูกชะออกจาก column | 104 | 604,800 | 40.94 |

6.2 Tangential Flow Filtration (300 KDa MWCO, Millipore)

ไวรัสที่ได้จากการทำ Affinity chromatography ได้นำมากำจัดเกลือ NaCl ในปริมาณมากออกโดยวิธี TFF (300K Da MWCO) ผลจากการวัด HA titer ในขั้นตอนต่างๆ แสดงในตารางที่ 7 ในขั้นตอนนี้ไวรัสส่วนหนึ่งจะสูญเสียไปจากการเก็บตัวอย่างออกมาวัด HA titer และจะต้องทำการวัดปริมาณแอนติเจนอีกครั้งโดยวิธี SRID เพื่อทราบ % ปริมาณไวรัสที่สูญเสียที่แน่นอน

ตารางที่ 7 ปริมาณไวรัส และเปอร์เซ็นต์ของปริมาณไวรัสที่สูญเสียไปในแต่ละขั้นตอนของการทำ TFF

| ไวรัสในแต่ละขั้นตอน | ปริมาตร (ml) | Total HAU | %ปริมาณไวรัสที่สูญเสีย |
|---|--------------|--------------------|------------------------|
| ไวรัสที่ได้จากการทำ Affinity chromatography | 104 | 5.32×10^5 | |
| ไวรัสเข้มข้นที่ผ่านการกำจัดเกลือออกไปแล้ว | 39 | 4.50×10^5 | 15.41 |
| ส่วนที่ไหลผ่าน membrane | 80 | 0 | 0 |

6. แอนติเจนมาตรฐานและแอนติบอดีสำหรับตรวจวัดปริมาณแอนติเจน H1N1 2009

ดำเนินการขอและได้รับเรียบร้อยแล้วจาก UK-CDC, Division of Virology, National Institute for Biological Standards and Control, Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire, EN6 3QG, United Kingdom

7. การเตรียมแอดจูแวนท์ชนิดอนุภาค PLGA

การเตรียมแอดจูแวนท์ชนิดอนุภาคไม่ได้อยู่ในแผนงานในปีแรก แต่คณะผู้วิจัยเห็นควรเร่งพัฒนาแอดจูแวนท์ที่ผลิตได้เองภายในประเทศ อีกทั้งเป็นไปตามคำแนะนำของผู้ทรงคุณวุฒิ รวมทั้งเดิมจะมีการใช้แอดจูแวนท์ผสม ซึ่งน่าจะเป็นทางเลือกอีกทางหนึ่งได้

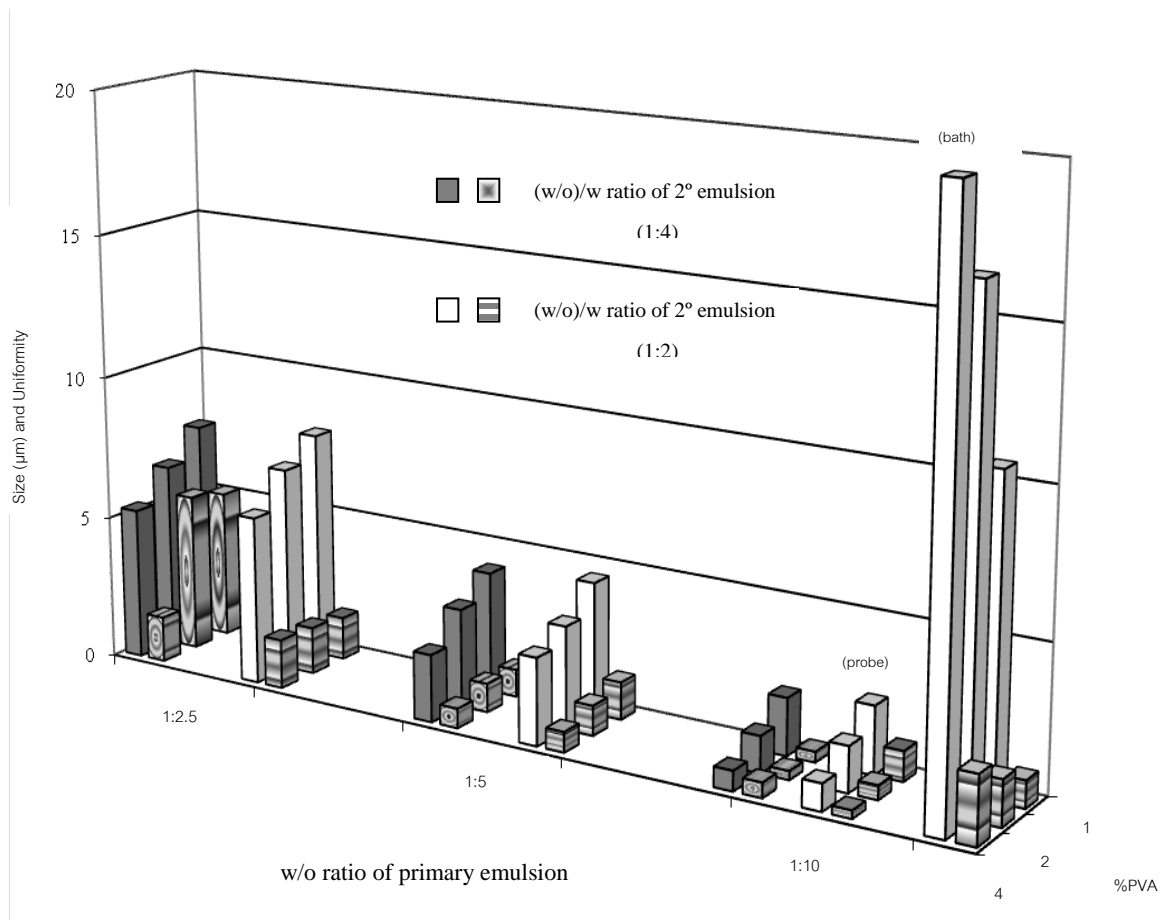
7.1 ปัจจัยของสูตรตำรับและชนิดของเครื่องมือที่มีผลต่อขนาดและการกระจายขนาดของอนุภาค PLGA

อนุภาค PLGA สามารถเตรียมได้โดยจะมีขนาดระหว่าง 0.68-7.88 μm และ uniformity ระหว่าง 0.27-5.46 เมื่อเตรียมโดย probe sonicator ระหว่างกระบวนการผลิตทั้ง emulsion ปรุสมภูมิและทุติยภูมิ และมีขนาดใหญ่ขึ้นมากอย่างเห็นได้ชัดเมื่อใช้เทคนิค bath sonication ระหว่างกระบวนการผลิตทั้ง emulsion ทุติยภูมิดังแสดงในภาพที่ 4

เมื่อใช้แรงเท่ากันจาก probe sonicator ขนาดอนุภาคและการกระจายขนาดจะลดลงอย่างชัดเจนเมื่อลดอัตราส่วนของ primary w/o ratio จาก 1:2.5 ไปยัง 1:10. แนวโน้มนี้จะพบในทุกสูตรที่มี % of PVA และอัตราส่วนของ secondary w/o ratio ต่างกัน Parikh et al. [2003] และ Jeffery, Davis and O'Hagan [1993] ได้รายงานผลของการเพิ่มปริมาณของวัฏภาคภายในของ emulsion ปรุสมภูมิจะเพิ่มขนาดของขนาดอนุภาคของ PLGA

ขนาดของอนุภาคจะลดลงเล็กน้อยเมื่อลดอัตราส่วนของ (w/o)/w emulsion ทุติยภูมิ จาก 1:2 เป็น 1:4 โดยค่า uniformity ของทุกสูตรจะ <2 และขนาดของอนุภาคจะค่อยๆ ลดลงเมื่อเพิ่ม % ของ PVA จาก 1% ถึง 4% ในทุกสูตรที่มีอัตราส่วนของ w/o และ (w/o)/w ratios ต่างกัน

สำหรับผลของเครื่อง sonicator พบว่า probe sonicator ให้อนุภาคที่เล็กกว่า bath sonicator ประมาณ 10 เท่า ในทุก % ของ PVA นอกจากนี้ค่า uniformity ของอนุภาคที่เตรียมจาก probe sonicator จะน้อยกว่า bath sonicator



รูปที่ 4 ผลของอัตราส่วน w/o ของ emulsion ปฐมภูมิ อัตราส่วน (w/o)/w ของ emulsion ทุติยภูมิ % PVA ของ of emulsion ทุติยภูมิ และเครื่อง sonicator ต่อขนาดและการกระจายขนาดอนุภาค (กราฟแท่งที่ไม่มีและมีลายของแต่ละคู่ตามลำดับ) ของอนุภาค PLGA ที่เตรียมจาก probe sonicator และ bath sonicator

7.2 คุณสมบัติของอนุภาค PLGA ที่กััดขนาด

คุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของอนุภาค PLGA จากสูตรที่กััดขนาด คือ 1, 5 และ 15 µm จะแสดงในตารางที่ 8 โดยเลือกจากการเตรียมสูตรที่ให้ขนาดใกล้เคียงกับขนาดที่ต้องการ เนื่องจากมีรายงานว่า อนุภาคขนาดไมโครเมตรจะกระตุ้นการตอบสนองของภูมิคุ้มกันดีกว่าขนาดนาโนเมตร และจะเลือกสูตรที่มีคุณสมบัติการกระจายขนาดน้อยด้วย

โดยปกติประจุของสารละลาย PLGA จะมีค่าประมาณ -45 mv (Sahoo et. al., 2002; Stolnik et al., 1995) เมื่อเตรียมเป็นอนุภาคที่มี PVA เป็น stabilizer จะมีประจุพื้นผิวเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเป็น -5.38 ถึง -7.42 โดยมีค่าใกล้เคียงกับที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ คือ ประมาณ -6.5 ถึง -15mv ที่ pH 7 และ -5 ถึง -10mv ที่ pH 6 (Sahoo et. al., 2002)

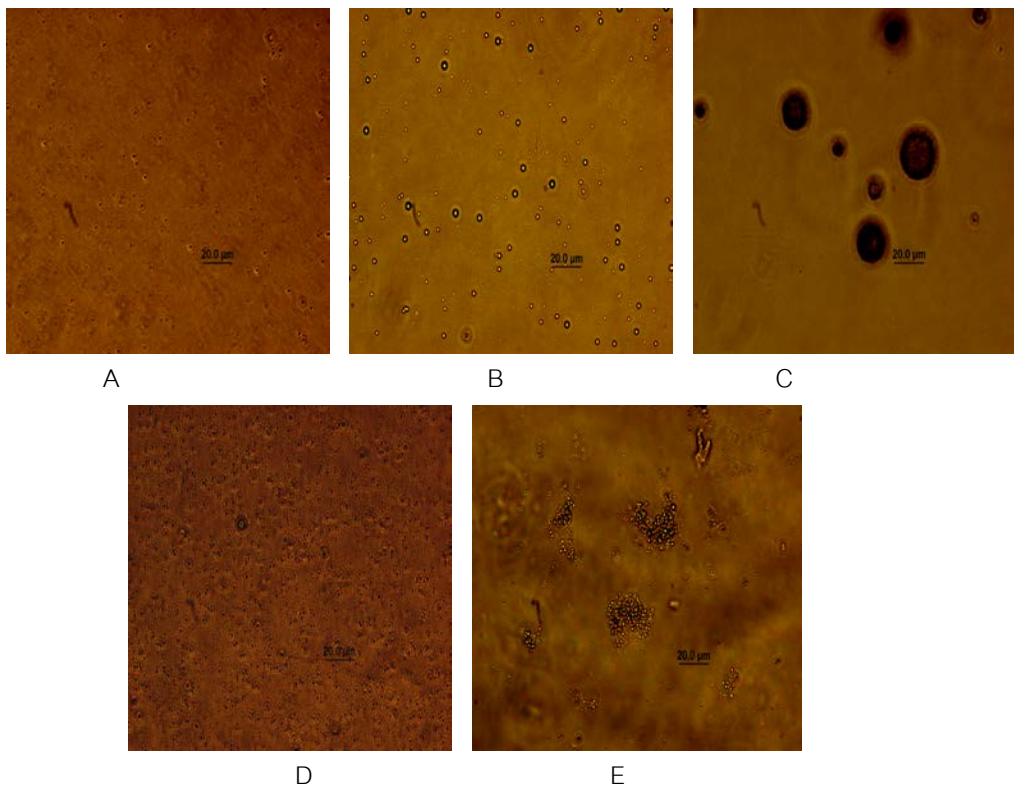
สำหรับสารละลายอินทรีย์ที่หลงเหลืออยู่ในอนุภาค พบว่าอนุภาคขนาดใหญ่จะมีปริมาณมากกว่าอนุภาคขนาดเล็ก เนื่องจากพื้นที่ผิวน้อยกว่า ทำให้การระเหยช้ากว่า อย่างไรก็ตาม ทุกขนาดจะมีสารตกค้างน้อยกว่าที่ระบุในเกณฑ์ตำรับของอเมริกา (USP 23) ที่กำหนดไม่เกิน 75 ppm

รูปร่างและลักษณะผิวของอนุภาค PLGA ทั้ง 3 ขนาดที่ปรากฏภายใต้ optical microscope (รูปที่ 5, A1-A3) และจาก SEM (รูปที่ 6, A1-A3) และ AFM (รูปที่ 7, A1). พบว่ามีความสอดคล้องกันคือ มีรูปร่างทรงกลมและผิวเรียบ ไม่พบว่ามีรูพรุน

ตารางที่ 8 ตัวแปรสูตรตำรับ ลักษณะของอนุภาคและผลของ CS และ Al(OH)₃ ต่อขนาด การกระจายขนาด ประจุที่ผิว และปริมาณสารละลายอินทรีย์ที่หลงเหลือของสูตรตำรับที่คัดเลือก

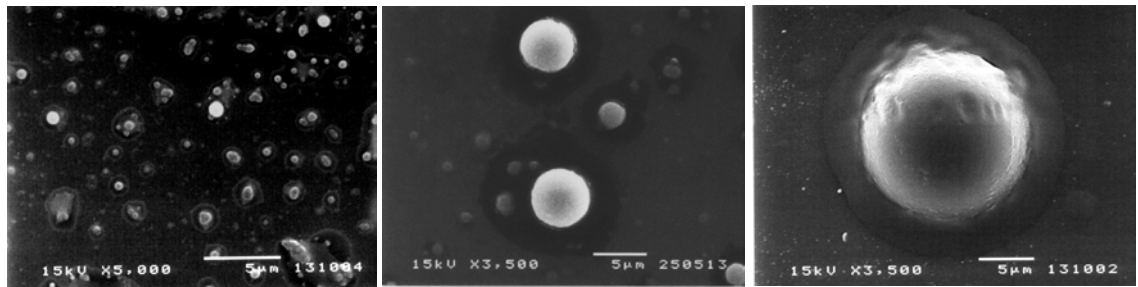
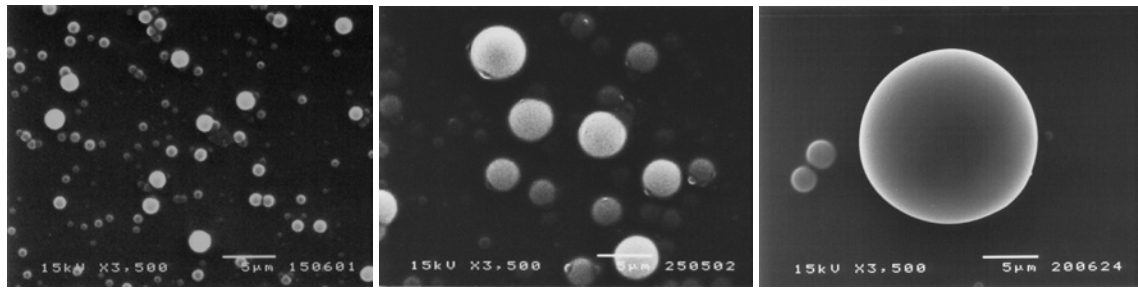
| Size selected formulations (μm) | Sonicator input force ¹ | w/o ratio ² | (w/o)/w ratio ³ | %PVA ⁴ (w/v) | Chitosan (%w/v) | Al(OH) ₃ (%w/v) | Median size (μm), uniformity n=3 | Zeta potential (mv±SD) n=3 | Solvent residue (ppm±SD) n=3 | ๘ |
|---------------------------------|------------------------------------|------------------------|----------------------------|-------------------------|-----------------|----------------------------|----------------------------------|----------------------------|------------------------------|---|
| 1 | Probe | 1:10 | 1:2 | 4% | - | - | 0.92, 0.27 | -5.38±0.13 | 10.98±0.24 | |
| | | | | | 0.2 | - | 1.22, 7.72 | +22.17±2.67 | | |
| | | | | | | 0.75 | 1.62, 1.59 | +15.36±1.27 | | |
| | | | | | | 1.5 | 3.44, 2.22 | +16.90±0.12 | | |
| 5 | Probe | 1:2.5 | 1:4 | 4% | - | - | 5.26, 1.57 | -7.42±0.31 | 11.52±0.19 | |
| | | | | | 0.2 | - | 7.59, 2.52 | +23.23±2.93 | | |
| | | | | | | 0.75 | 6.87, 2.34 | +16.40±0.38 | | |
| | | | | | | 1.5 | 6.89, 2.96 | +19.71±1.40 | | |
| 15 | Bath | 1:10 | 1:2 | 2% | - | - | 16.76, 2.03 | -6.90±0.86 | 21.32±0.68 | |
| | | | | | 0.2 | - | 17.18, 2.77 | +25.62±4.85 | | |
| | | | | | | 0.75 | 16.85, 1.98 | +22.45±2.66 | | |
| | | | | | | 1.5 | 16.95, 1.83 | +19.52±3.95 | | |

¹ Input force of secondary emulsion, ² Volume ratio of primary w/o emulsion, ³ Volume ratio of secondary (w/o)/w emulsion, ⁴ %PVA of secondary emulsion

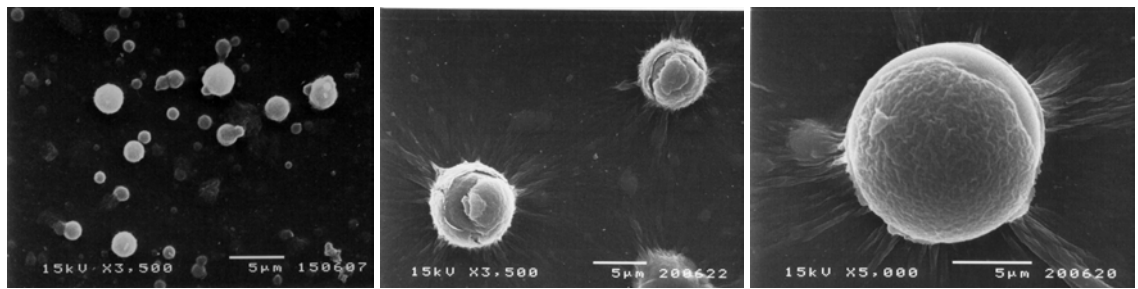


A

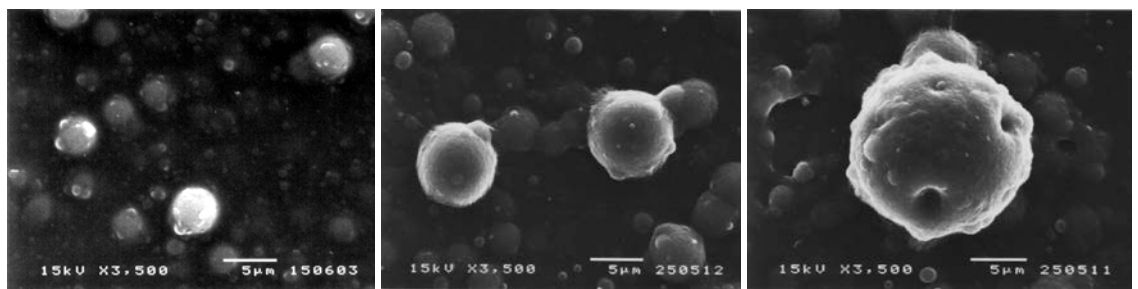
รูปที่ 5 รูปลักษณะของอนุภาค PLGA ขนาด 1µm (A), 5µm (B), 15µm (C) และขนาด 1µm ที่เคลือบด้วย CS, 1C (D) และขนาด 1µm ที่เคลือบด้วย $Al(OH)_3$, 1A, (E) ภายใต้กล้อง optical microscope (x 20).



B



C



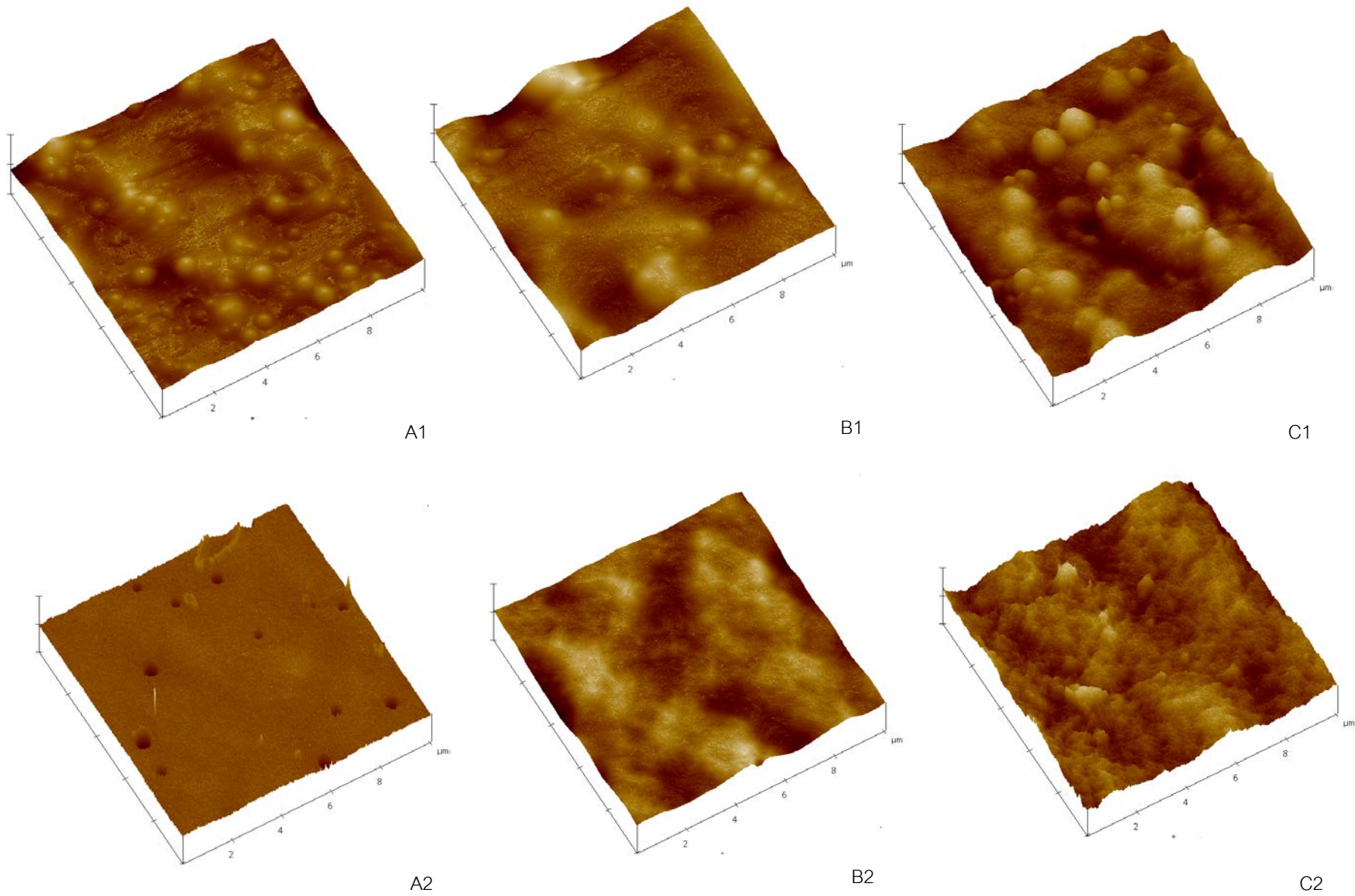
D

1

2

3

รูปที่ 6 ภาพSEM ของ PLGA, PLGA ที่เคลือบด้วย CS, 0.75% Al(OH)₃ และ 1.5% Al(OH)₃ conjugated PLGA particles (A to D, ตามลำดับ) ที่มีขนาดอนุภาค 1, 5 และ 15 μm (1,2,3 ตามลำดับ).



รูปที่ 7 ลักษณะผิวของ PLGA (A1), PVA (A2), PLGA ที่เคลือบด้วย CS(B1), CS (B2), PLGA ที่เคลือบด้วย 0.75% Al(OH)₃ (C1) และ Al(OH)₃ (C2) จากการใช้เทคนิค AFM

8. การเตรียมแอดจูแวนท์ชนิดอนุภาค PLGA ที่เคลือบด้วย CS

การเคลือบด้วย CS จะเพิ่มขนาดของอนุภาค PLGA เพียงเล็กน้อยดังแสดงในตารางที่ 8 เช่นเดียวกับค่าการกระจายขนาดที่มีค่าเพิ่มขึ้นโดยจะเห็นได้ชัดที่อนุภาคขนาด 1 μm ส่วนประจุนผิวอนุภาคจะเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนจากค่า - เป็นค่า +22 ถึง +25mv

จากภาพ optical microscope ในรูปที่ 5, D พบว่าอนุภาคจากสูตรตำรับ 1 1 μm มีขนาดใหญ่กว่าที่ไม่ได้เคลือบ และคล้ายไม่ได้แยกจากกันเป็นอิสระ จาก SEM ในรูปที่ 6, 1B-3B พบว่า อนุภาคขนาด 1 μm จะเกาะกันอย่างหลวมๆ โดยชั้นของ CS มากกว่าอนุภาคขนาดใหญ่ ส่วนผลจาก AFM แสดงในรูปที่ 7 พบว่า ลักษณะผิวของอนุภาค PLGA (รูปที่ 7, A1) จะเรียบ ในขณะที่เคลือบด้วย CS จะเห็นชั้นเจลใสๆ ของ CS เคลือบอยู่ด้านบน (รูปที่ 7, B1)

9. การเตรียมแอดจูแวนท์ชนิดอนุภาค PLGA ที่เคลือบด้วย $\text{Al}(\text{OH})_3$

เมื่อเคลือบด้วย $\text{Al}(\text{OH})_3$ อนุภาค PLGA ขนาด 1 μm จะใหญ่ขึ้นโดยผลจะชัดเจนเมื่อเคลือบด้วยความเข้มข้น 1.5% $\text{Al}(\text{OH})_3$ ดังแสดงในตารางที่ 8 เช่นเดียวกับค่าการกระจายขนาดที่มีค่าเพิ่มขึ้นโดยจะเห็นได้ชัดที่อนุภาคขนาด 1 μm ส่วนประจุนผิวอนุภาคจะเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนจากค่า - เป็นค่า + แต่ค่าที่ได้ยังน้อยกว่าค่าที่ได้จากอนุภาคที่เคลือบด้วย CS

ลักษณะผิวของอนุภาค PLGA ที่เคลือบด้วย $\text{Al}(\text{OH})_3$ ในรูปที่ 5, D พบว่า อนุภาคจะเกาะกันเป็นแพ ส่วน SEM ในรูปที่ 6, 1C-3C, 1D-4D พบว่า อนุภาคมีทรงกลมที่มีชั้นสีขาวเคลือบอยู่ภายนอก นอกจากนี้ $\text{Al}(\text{OH})_3$ ที่ความเข้มข้น 0.75% เพียงพอที่จะเคลือบอนุภาคขนาด 1 μm แต่ไม่พอสำหรับอนุภาคขนาด 5 และ 15 μm อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้น 1.5% เพียงพอที่จะเคลือบอนุภาคขนาด 5 และ 15 μm จาก AFM ในรูปที่ 7, C1 และ C2 ผิวของอนุภาคที่เคลือบด้วย $\text{Al}(\text{OH})_3$ จะขรุขระ ไม่เรียบ

เตรียมตำรับวัคซีนผสมแอดจูแวนท์

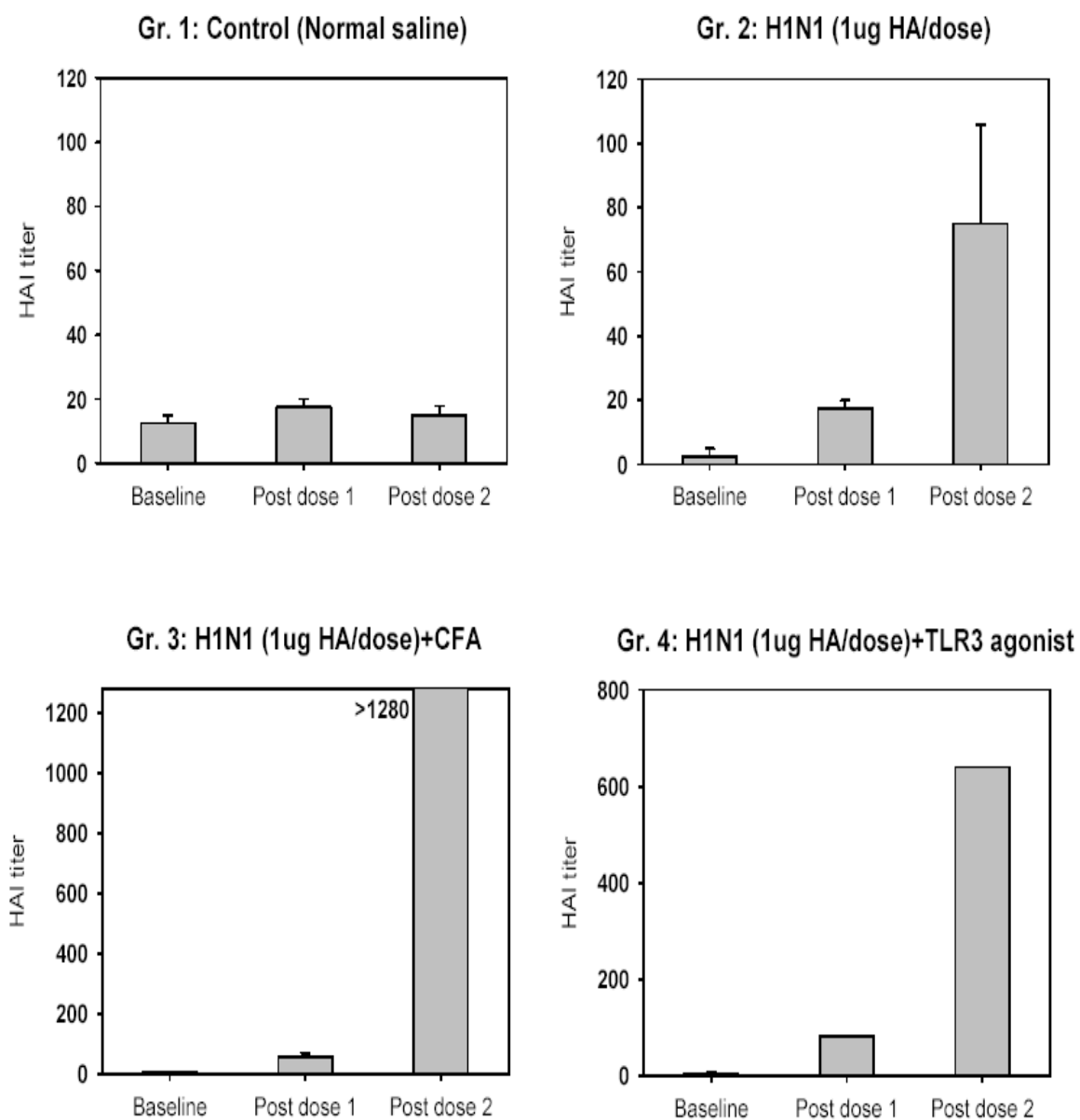
เนื่องจากแอดจูแวนท์ชนิด o/w emulsion ซึ่งได้มีติดต่อกับ Dr. Steven Reed (President of Infectious Disease Research Institute, Seattle) เกี่ยวกับ oil/water emulsion adjuvant แต่ยังไม่ได้รับสารดังกล่าว คณะผู้วิจัยจึงศึกษาประสิทธิภาพของแอนติเจนและ แอดจูแวนท์ใน หนู BALB/c mouse โดยใช้ แอดจูแวนท์ 2 ชนิด Complete Freund's Adjuvant ซึ่งเป็น adjuvant ที่นิยมใช้และมีจำหน่ายเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยในสัตว์ทดลอง รวมทั้งแอดจูแวนท์ชนิด Toll-like Receptor 3 agonist (TLR3 agonist) ที่มีรายงานว่ามีประสิทธิภาพ

การศึกษาในสัตว์ทดลอง (หนู mice)

การศึกษาในหนู mice คณะผู้วิจัยได้ทำเพิ่มเติมจากข้อเสนอโครงการเดิมที่ระบุให้ศึกษาในลิง เนื่องจากแอนติเจนที่เตรียมขึ้นเป็นแอนติเจนที่ผลิตขึ้นด้วยเทคนิคนวัตกรรมของคณะผู้วิจัยเอง แม้จะผ่านการทดสอบทางหลอดทดลองแล้วว่ามีปริมาณแอนติเจนที่มีประสิทธิภาพ แต่ยังไม่เคยมีการทดสอบกับสัตว์ทดลองมาก่อน จึงปรับแผนให้มีการศึกษาในสัตว์เล็กก่อนการศึกษาในลิง พบว่า ค่าเฉลี่ยและค่าความแปรปรวนของ HAI titer จาก serum ในการทดลองในหนูจะแสดงในรูปที่ 1 โดยในกลุ่มแรกซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำเกลือ จะมีปริมาณ titer ต่ำกว่า 20 ในช่วงเวลาที่สุ่มตัวอย่าง serum ทั้งก่อนและหลังการให้วัคซีนเข้ากล้ามเนื้อในแต่ละ dose ในกลุ่มที่ 2 ที่ได้รับแอนติเจนและไม่มีแอดจูแวนท์ใดๆ พบว่า ค่า HAI titer มีค่าสูงขึ้นเมื่อให้แอนติเจน ค่าที่ได้จาก ก่อนการให้ วัคซีนจะต่ำกว่าหลังการให้ dose ที่ 1 และที่ 2 ตามลำดับ โดยค่า titer ที่ได้หลังการให้ dose ที่ 2 จะสูงกว่า 75 แสดงว่า แอนติเจนที่ผลิตขึ้นเองนี้สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้เกิด HAI titer อย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อเพิ่ม แอดจูแวนท์ Complete Freund's adjuvant พบว่า หลังการให้วัคซีนครั้งที่ 1 จะมีค่า titer สูงกว่า ก่อนให้เล็กน้อย แต่ titer จะขึ้นสูงมาก เป็น > 1280 เมื่อให้ dose ที่ 2 แสดงว่า Freund's complete adjuvant จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกระตุ้นให้ HAI titer สูงกว่าเมื่อไม่มี แอดจูแวนท์อย่างเด่นชัด เมื่อใช้ TLR3 agonist เป็นแอดจูแวนท์ พบว่าสามารถเพิ่ม titer ได้เช่นกัน แต่ประสิทธิภาพการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน จะไม่เทียบเท่ากับการใช้ Complete Freund's adjuvant โดยค่า HAI titer จะอยู่ที่ ประมาณ 630 เมื่อให้ dose ที่ 2

Results from mouse study



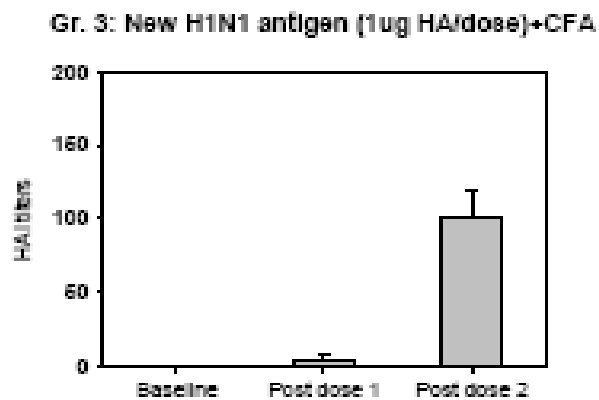
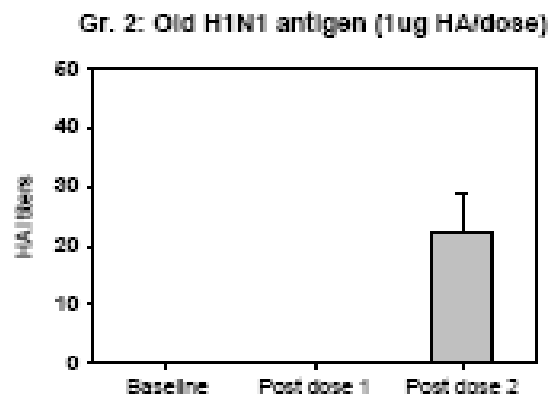
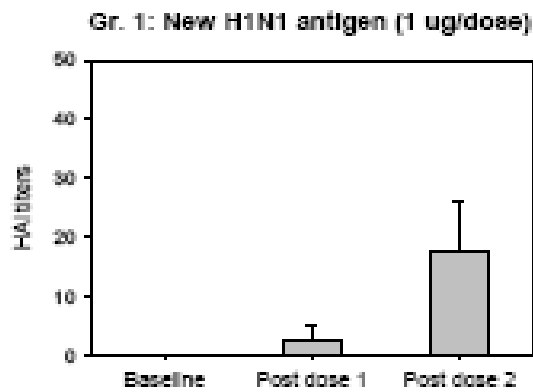
รูปที่ 8 HAI titer จาก serum ของ BALB/c mice หลังการให้วัคซีนที่ประกอบด้วยแอนติเจนที่ผลิตขึ้นเอง (group 2), แอนติเจนที่ผลิตขึ้นเองและ complete Freund's adjuvant (group 2), แอนติเจนที่ผลิตขึ้นเองและ toll-like receptor 3 agonist (group 4) เปรียบเทียบกันน้ำกลั่น (group 1) เมื่อให้ความเข้มข้นของแอนติเจน 1 ug HA/0.1 ml จำนวน 2 ครั้งเข้ากล้ามเนื้อ เมื่อวันที่ 0, 19 และสุ่มตัวอย่าง serum วันที่ 0, 11 และ 33 (n=4)

สำหรับการทดลองเพื่อศึกษาถึงประสิทธิภาพของการเตรียมแอนติเจนซ้ำ พบว่า ค่าเฉลี่ยและค่าความแปรปรวนของ HAI titer จาก serum ในการทดลองในหนูจะแสดงในรูปที่ 9 โดยในกลุ่มแรกซึ่งเป็นกลุ่มที่ได้รับแอนติเจนที่เตรียม lot ใหม่ และไม่มีแอดจูแวนท์ใดๆ พบว่า ค่า HAI titer มีค่าสูงขึ้นเมื่อให้แอนติเจน ค่าที่ได้จาก ก่อนการให้ วัคซีนจะต่ำกว่าหลังการให้ dose ที่ 1 และที่ 2 ตามลำดับ โดยค่า titer ที่ได้หลังการให้ dose ที่ 2 จะมีค่า 17.5 แสดงว่า แอนติเจนที่ผลิตขึ้นเองนี้สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ให้เกิด HAI titer อย่างมีนัยสำคัญ

ในกลุ่มที่ 2 ที่ได้รับแอนติเจนที่เตรียม lot เดิมและไม่มีแอดจูแวนท์ใดๆ พบว่า ค่า HAI titer มีค่าสูงขึ้นเช่นกัน เมื่อให้แอนติเจน ค่าที่ได้จาก ก่อนการให้ วัคซีนจะต่ำกว่าหลังการให้ dose ที่ 1 และที่ 2 ตามลำดับ โดยค่า titer ที่ได้หลังการให้ dose ที่ 2 จะมีค่า 22.5 แสดงว่า แอนติเจนที่ผลิตขึ้นเองนี้สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ให้เกิด HAI titer อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตาม ค่า HAI titer ที่ได้จะต่ำกว่า HAI titer ที่ให้กับหนูเพศผู้ที่ได้รายงานในการทดลองครั้งที่แล้วซึ่งมีค่าที่ 75.00

จากผลของแอนติเจนทั้งสอง lot เมื่อทดสอบทางสถิติไม่พบว่า HAI titer จากแอนติเจนที่ผลิตทั้งสอง lot มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งโดยปกติแล้ว การตอบสนองของหนูเพศเมียมักให้ค่าสูงกว่าหนูเพศผู้ ($\alpha = 0.05$)

เมื่อเพิ่ม แอดจูแวนท์ Complete Freund's adjuvant พบว่า หลังการให้วัคซีนครั้งที่ 2 จะมีค่า titer สูงขึ้นมาก เป็น 100 ซึ่งยืนยันการทดลองเดิมว่า Freund's complete adjuvant จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกระตุ้นให้ค่า HAI titer สูงกว่าเมื่อไม่มี แอดจูแวนท์อย่างเด่นชัด



รูปที่ 9 HA I titer จาก serum ของ BALB/c mice หลังการให้วัคซีนที่ประกอบด้วยแอนติเจนที่ผลิตขึ้นเอง lot ใหม่ และ lot เก่า (group 1, 2 ตามลำดับ), แอนติเจนที่ผลิตขึ้นเอง lot ใหม่ และ complete Freund's adjuvant (group 3) เมื่อให้ความเข้มข้นของแอนติเจน 1 ug HA/0.1 ml จำนวน 2 ครั้ง เข้ากล้ามเนื้อ เมื่อวันที่ 0, 19 และ สุ่มตัวอย่าง serum วันที่ 0, 11 และ 33 (n=4)

การศึกษาในลิง (non-human primate)

คณะผู้วิจัยได้มีการติดต่อกับหัวหน้าแผนกสัตว์ทดลองของ USAMC-AFRIMS ซึ่งเป็นแผนกสัตว์ทดลองที่ใหญ่ที่สุดในเอเชีย และได้รับการรับรองจาก Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC) และได้รับการยอมรับจาก Animal Welfare Assurance on file with the Office of Laboratory Animal Welfare (OLAW), U.S. National Institutes of Health (NIH) เกี่ยวกับจำนวนลิงที่จะใช้ในการทดสอบ H1N1 vaccine รวมทั้งการคิดค่าใช้จ่ายในการทดลองในลิง โดยได้ยืนยันจาก หัวหน้าแผนกสัตว์ทดลองของ USAMC-AFRIMS เรื่องจำนวนลิงที่แข็งแรงสมบูรณ์พร้อมสถานที่เลี้ยงที่จะใช้ในการทดสอบ H1N1 vaccine ว่ามีจำนวนเพียงพอกับความต้องการของโครงการ โดยการคิดค่าใช้จ่ายลิงตัวละประมาณ 250,000 บาทขึ้นกับอัตราแลกเปลี่ยนเงินตราในช่วงเวลาที่จะใช้ลิง ตามเอกสาร CRADA ในภาคผนวก 6

ส่วน animal use protocol ตามภาคผนวก 7 ได้มีการปรับแผนโดยลดจำนวนสูตรตำรับที่ใช้แอดจูแวนท์ โดยได้ทำสัญญาว่าจ้างกับแผนกสัตว์ทดลองของ USAMC-AFRIMS ให้ทำการศึกษาในลิงเรียบร้อยแล้ว

เนื่องจากระดับของ HAI titer ในหนูมีค่าไม่สูงพอที่จะตัดลิงใจทำในลิง และค่าใช้จ่ายในการทดสอบในสัตว์ใหญ่จะสูงมากประมาณ 70% ของงบประมาณที่ได้รับ จึงเห็นไม่สมควรทำการทดสอบในสัตว์ใหญ่ โดยคณะผู้วิจัยยินดีคืนเงินส่วนที่เหลือแก่ วช เพื่อใช้ประโยชน์อย่างอื่นต่อไป

สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป ตลอดจนประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลการวิจัยที่ได้

การศึกษานี้มีเป้าหมายที่จะพัฒนาวัคซีนไข้หวัดใหญ่ H1N1 2009 ชนิดเชื้อตายสำหรับฉีดเข้ากล้ามเนื้อ โดยผลิตไวรัสด้วยกรรมวิธีเพาะในไข่ไก่ฟักและนำเอาแอดจูแวนท์ซึ่งเป็นสารเสริมฤทธิ์ผสมในสูตรตำรับ เพื่อช่วยลดปริมาณของแอนติเจนที่จะใช้ รวมทั้งจะทำให้ภูมิคุ้มกันตอบสนองต่อวัคซีนมีความครอบคลุมและมีอายุยาวนาน เพื่อเป็นทางเลือกหนึ่งให้รัฐในการผลิตวัคซีนโดยในกรณีที่มีการระบาดของโรคระลอกใหม่ โดยสามารถใช้กระบวนการผลิตของวัคซีนที่มีการผลิตที่องค์การเภสัชกรรมในปัจจุบันได้

ก่อนดำเนินการวิจัยจะทำการปรับปรุงห้องปฏิบัติการ ให้เป็นห้องชีววิทยาระดับ 2+ สำหรับเพาะไวรัส พบว่าระบบต่างๆ ของห้องปฏิบัติการที่ปรับปรุงแล้วผ่าน เกณฑ์มาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการ BSL2+ และผ่านการรับรองการประเมินความเสี่ยงทางชีวภาพในระดับมหาวิทยาลัย การเพาะไวรัสจากไข่ไก่ฟักและผลิตเป็นวัคซีนแอนติเจน จะผลิตจากหัวเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ H1N1 2009 สายพันธุ์วัคซีน A/California/07/09NYMC X-179A (H1N1) ที่ได้รับการแนะนำจาก WHO และได้รับจาก US-CDC โดยการฉีดในไข่ไก่ฟัก (embryonated egg) โดยศึกษาขั้นตอนการเตรียม Premaster Seed และ Master Seed เพื่อนำไปศึกษาและได้ขั้นตอนเทคนิคการผลิตที่ให้ปริมาณไวรัสมากที่สุด นอกจากนี้สามารถทำให้เชื้อตายจากการตรวจสอบเชื้อตายตามวิธีการของ CDC แล้วทำให้ไวรัสแอนติเจนบริสุทธิ์เพื่อใช้ในการเตรียมเป็นตำรับวัคซีน ทั้งนี้ได้เปรียบเทียบกับแอนติเจนมาตรฐานและแอนติบอดีสำหรับตรวจวัดปริมาณแอนติเจน H1N1 2009 ที่จะได้จาก UK-CDC, Division of Virology, National Institute for Biological Standards and Control, United Kingdom ซึ่งได้มาตรฐานโลก

การเตรียมตำรับวัคซีนผสมแอดจูแวนท์ จะใช้แอดจูแวนท์ที่นำเข้าชนิด อิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำจาก Infectious Disease Research Institute ประเทศสหรัฐอเมริกาที่ผ่านการทดสอบแล้วว่าปลอดภัย และได้พัฒนาสูตรตำรับแอดจูแวนท์ชนิดอนุภาคขนาดไมโครเมตรที่ผลิตเองจาก polylactide-co-glycolide (PLGA), ไคโตซาน (CS) และ aluminium hydroxide (Al(OH)₃) ซึ่งสารแต่ละชนิดได้ยอมรับให้ใช้ได้ในการฉีดตำรับ และเตรียมโดยเทคนิค double emulsion solvent evaporation ซึ่งขั้นตอนไม่ยุ่งยาก และสามารถขยายการผลิตได้ง่าย อนุภาคทั้ง 3 ชนิด ที่ได้มีคุณสมบัติที่เหมาะสมทางเคมีฟิสิกส์ในการเป็นแอดจูแวนท์ ซึ่งต้องศึกษาคุณสมบัติอื่นๆ ต่อไป

ตำรับวัคซีนที่เตรียมตามมาตรฐาน GMP จะมีแอนติเจนเดี่ยว และเมื่อมีการเติมแอดจูแวนท์ในตำรับ รวมทั้งศึกษาผลของการเตรียมซ้ำ โดยศึกษาประสิทธิภาพการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและความปลอดภัย ใน หนู Balb/c mouse โดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อ 2 ครั้ง ณ สัปดาห์ที่ 0 และ 2 เพื่อเตรียมศึกษาในลิง non-human primate พบว่าแอนติเจนที่เตรียมขึ้นสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีกว่าการให้น้ำกลั่น การเติมแอดจูแวนท์จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และการเตรียมแอนติเจนครั้งที่ 2 สามารถให้การกระตุ้นเหมือนเดิม อย่างไรก็ตามผลการกระตุ้นยังไม่สูงพอที่จะดำเนินการทดสอบต่อในลิง

ในการวิจัยครั้งนี้ ชาติ Ultracentrifuge ที่มีขนาดใหญ่ที่จะรองรับบริเวณ allantoic fluid ที่ใช้ เนื่องจากข้อจำกัดดังกล่าว ทำให้ผู้วิจัยได้ปรับเปลี่ยนวิธีการโดยไม่ผ่านขั้นตอน Ultracentrifuge ซึ่งเป็นวิธีการที่เริ่มนำมาใช้มากขึ้นในอุตสาหกรรมการผลิตวัคซีน ทำให้เรียนรู้วิธีใหม่ๆ ในการทำให้ได้ไวรัสที่บริสุทธิ์ขึ้น ได้แก่

1. Tangential flow filtration (TFF) เป็นวิธีกำจัดโปรตีนที่ไม่ต้องการออกจาก particle ของไวรัส โดยใช้ขนาดของโมเลกุลเป็นตัวแยก เนื่องจากไวรัสมีอนุภาคค่อนข้างใหญ่เมื่อเทียบกับโปรตีนอื่นๆ การใช้ TFF ขนาด 1000 KDa ของ Millipore หรือ 500 KDa ของ PALL สามารถกำจัดโปรตีนอื่นที่ไม่ใช่ไวรัสออกไปได้มาก โดยสูญเสียไวรัส่น้อย นอกจากนี้ยังสามารถทำให้ไวรัสที่ได้มีความเข้มข้นขึ้นถึง 10 – 20 เท่า โดยไม่เสียความสามารถในการติดเชื้อไป (infectivity) แม้ว่าจะมีการใช้ยู่บ้างในอุตสาหกรรมเกี่ยวกับโปรตีน แต่ในการผลิตไวรัส ยังมีที่ใช้จำกัด โดยเฉพาะในประเทศไทย เทคนิคนี้ น่าจะมีประโยชน์ในอนาคตในงานวิจัย และภาคการผลิตเกี่ยวกับไวรัส
2. Affinity chromatography ในงานวิจัยนี้ นอกจากจะใช้ TFF ในการแยกไวรัสให้บริสุทธิ์และเข้มข้นขึ้นแล้ว ยังใช้วิธี affinity chromatography ร่วมด้วย เพื่อให้ไวรัสที่ได้บริสุทธิ์มากขึ้น ซึ่งผู้วิจัยได้ใช้สาร Cellufine sulfate ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น cellulose ที่มี activated group เป็น sulfate ester ซึ่งสามารถ bind particle ของไวรัสได้ดี มีการทดสอบกับไวรัสหลายชนิด รวมถึงไวรัสไข้หวัดใหญ่

คณะผู้วิจัยน่าจะเป็นกลุ่มแรกในประเทศไทยที่นำเอา Cellufine sulfate มาใช้ ในการแยกเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ให้บริสุทธิ์ ซึ่งพบว่าได้ผลดี แม้จะเสียปริมาณไวรัสไปประมาณ 50% แต่เมื่อเทียบกับวิธี Ultracentrifuge แล้ว พบว่าอัตราการสูญเสีย้นน้อยกว่า ทั้งนี้อัตราการสูญเสียอาจลดลงอีกได้หากมีการเปลี่ยนแปลงสภาวะต่างๆ ให้เหมาะสม (optimization) ซึ่งอาจต้องใช้เวลา ข้อดีของวิธีนี้คือ Cellufine sulfate สามารถใช้ซ้ำได้หลายครั้ง ใช้ได้ทั้งกับ lived, inactivated, หรือ ruptured ไวรัส

3. Assay ต่างๆที่ใช้ในการประเมินวัคซีนไข้หวัดใหญ่

เนื่องจากในระหว่างการทำกรวิจัยนั้น ต้องประเมินปริมาณไวรัสและโปรตีนจากขั้นตอนต่างๆ ทำให้มีการพัฒนาเทคนิคต่างๆดังต่อไปนี้ ในห้องปฏิบัติการ และสามารถทำได้อย่างชำนาญ

- 3.1. Hemagglutination and Hemagglutination inhibition
- 3.2. Plaque assay
- 3.3. Tissue culture infection dose assay (TCID)
- 3.4. ELISA for Hemagglutinin (Quantitative)
- 3.5. Western blot assay for Hemagglutinin / Neuraminidase

3.6. Single radial immunodiffusion (SRID) สำหรับวัดปริมาณ HA ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน ในการวัด HA concentration

อย่างไรก็ดี อุปสรรคสำคัญในการวิจัยครั้งนี้ คือ การสูญเสียโปรตีน HA ในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ หลังจากใช้ detergent ทำให้ particle ของไวรัสแตก ในขั้นตอนการกำจัด detergent ยังไม่สามารถเอา detergent ออกได้ต่ำกว่าระดับที่ยอมรับได้ เนื่องจากเมื่อระดับ detergent ต่ำมาก โปรตีน HA จะ aggregate และเกาะติดกับ membrane ที่ใช้ purify ดังนั้นขั้นตอนนี้จึงจำเป็นต้องพัฒนา

ทำให้ประโยชน์จากการศึกษาจะได้แนวทางขั้นตอนที่เหมาะสมในการผลิตแอนติเจนเชื้อตายใช้หัดใหญ่ H1N1 2009 จากไข่ไก่ฟักซึ่งยังไม่มีผู้ศึกษามาก่อนในประเทศ ได้แอดจูแวนท์ชนิดอนุภาคที่มีขนาดไมโครเมตรที่ผลิตเองในประเทศ ด้วยกรรมวิธีที่ไม่ยุ่งยาก นอกจากนี้ยังได้พัฒนา ผลิตและเกิดความร่วมมือของบุคคลากรด้านวัคซีนซึ่งมีจำนวนน้อยและกระจัดกระจายในประเทศ และเป็นการเตรียมพร้อมเพื่อการพึ่งพาตนเองไม่เฉพาะเมื่อมีการระบาดของโรค

ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยขั้นต่อไป ควรปรับปรุงขั้นตอนการทำให้แอนติเจนบริสุทธิ์เพื่อให้ได้ yield มากขึ้น รวมทั้งการพัฒนาต่อยอดของแอดจูแวนท์ชนิดอนุภาคที่ผลิตได้เองโดยการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงและในสัตว์ทดลอง ตลอดจนการพัฒนาในระบบในส่งในเส้นทางอื่นๆ เช่น ให้อัดลิ้น ให้หยอดจมูก รวมทั้งการใช้แอนติเจนอื่นๆ เป็นต้น

บรรณานุกรม

- Ada, G.L., 2004. Vaccines and Immune Response. Encyclopedia of Virology, Pages 1861-1865
- Ada, G.L., Blanden R.V., 1994. CTL immunity and cytokine regulation in viral infection. Research in Immunology, 1459(8-9):625-629.
- Aguilar, J.C. Rodriguez, E.G. 2007, Vaccine adjuvants revisited, *Vaccine*, 25:3752-3762.
- Ahsan, F., Rivas, I.P., Khan, M.A., and Torres Suarez, A.I. 2002. Targeting to macrophages : role of physicochemical properties of particulate carriers-liposomes and microspheres-on the phagocytosis by macrophages *J Controlled Release*. 79 :29-40.
- Alonso, P.L., et al, 2004. Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against Plasmodium falciparum infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *The Lancet*, 364(9443):1411-1420.
- Baldridge, J.R., Crane, R.T. 1999. Monophosphoryl Lipid A (MPL) Formulations for the Next Generation of Vaccines, *Methods*, 19(1):103-107
- Ballou, W.R., Cahill, C.P., 2007. Two Decades of Commitment to Malaria Vaccine Development: GlaxoSmithKline Biologicals, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 77(6_Suppl), 2007, pp. 289-295
- Ebelman, R 1980, Vaccine adjuvants, *Rev. Infect Dis.* 2 :370-83
- Fox, C.B., Anderson, R.C., Dutil, T.S., Goto, Y., Reed, S.G., Vedvick, T.S., 2008. Monitoring the effects of component structure and source on formulation stability and adjuvant activity of oil-in-water emulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 65(1):98-105.
- Garçon, N., Van Mechelen, M., Wettendorff, M. 2006. Development and evaluation of AS04, a novel and improved adjuvant system containing MPL and aluminum salt *Immunopotentiators in Modern Vaccines*, 161-177
- Gherardi RK, Coquet M, Cherin P. Belec L, Moretto P, Dreyfus PA, et al, 2001, Macrophagic myofascitis lesions assess long-term persistence of vaccine-derived aluminium hydroxide in muscle, *Brain*, 124 (Pt a) : 1821-31.
- Giannini, S.L., Hanon, E., Moris, P., Van Mechelen, M., Morel, S., Dessy, F., Fourneau, M.A., Colau, B., Suzich, J., Losonksy, G., Martin, M-T., Dubin, G., Wettendorff M.A. 2006. Enhanced humoral and memory B cellular immunity using HPV16/18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL/aluminium salt combination (AS04) compared to aluminium salt only. *Vaccine*, 24(33-34):5937-5949
- Glenny AT., Pope CG, Waddington H, Wallace, U, 1926, Immunological notes XVII to XXIV, *J Pathol*, 29 : 31-40.

- Goto, Y., Bhatia, A., Raman, V.S., Vidal, S.E.Z., Bertholet, S., Coler, R.N., Howard, R.F., Reed, S.G., 2009. Leishmania infantum sterol 24-c-methyltransferase formulated with MPL-SE induces cross-protection against L. major infection. *Vaccine*, 27(21):2884-2890
- Hansen, B., Sokolovska, A., HogenEsch, H., Hem, S.L., 2007. Relationship between the strength of antigen adsorption to an aluminum-containing adjuvant and the immune response. *Vaccine*, 25(36):6618-6624.
- Hariharan, K., Hanna N., 1998. Development and application of PROVAX™ adjuvant formulation for subunit cancer vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 32(3):187-197.
- Hughes K, Zachertowska A, Wan S, Li L, Klimaszewski D, Euloth M, Hatchette TF. Yield increases in intact influenza vaccine virus from chicken allantoic fluid through isolation from insoluble allantoic debris. *Vaccine*. 2007 May 30;25(22):4456-63.
- Jansen, T., Hofmans, M.P.M., Theelen, M.J.G., Schijns, V.E.J.C.2005. Structure–activity relations of water-in-oil vaccine formulations and induced antigen-specific antibody responses. *Vaccine*, 23(8):1053-1060.
- Kazzaz, J., Singh, M., Ugozzoli, M., Chesko, J., Soenawan, E., O'Hagan, D.T., 2006. Encapsulation of the immune potentiators MPL and RC529 in PLG microparticles enhances their potency *Journal of Controlled Release*, 110(3): 566-573
- McNeela, E.A., and Mills, K.H.G. 2001. Manipulating the immune system : humoral versus cell-mediated immunity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 51 :43-54.
- O'Hagan, D.T., Singh, M., Kazzaz, J., Ugozzoli, M., Briones, M., Donnelly, J., Ott, G., 2002. Synergistic adjuvant activity of immunostimulatory DNA and oil/water emulsions for immunization with HIV p55 gag antigen. *Vaccine*, 20(27-28):3389-3398.
- O'Hagan, D.T., De Gregorio, E., 2009, The Path to a successful adjuvant - the long and winding road, *Drug Discovery Today*, 14 (11/12):541-551.
- Ott, G., Barchfeld, G.L., Van Nest G., 1995. Enhancement of humoral response against human influenza vaccine with the simple submicron oil/water emulsion adjuvant MF59. *Vaccine*, 13(16):1557-1562.
- Petrovsky N, Aguilar J.C., 2004, Vaccine adjuvants : current state and future trends, *Immunol. Cell Biol*, 82:488-96
- Singh, M., O'Hagan, D.T., 2003. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. *Int J parasitology*, 33; 469-478.
- Sokolovska, A., Hem, S.L., HogenEsch, H., 2007, Activation of dendritic cells and induction of CD4+T cells differentiation by aluminum adjuvants, *Vaccine*, 25:4575-4585
- Storni, T., Kündig, T.M., Senti, G., Johansen, P., 2005. Immunity in response to particulate antigen-delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(3):333-355.
- Tabata, Y., Ikada, Y., 1988. Effect of the size and surface charge of polymer microspheres on their phagocytosis by macrophage. *Biomaterials*, 9(4):356-362

- Vogel, F.R., Powel, M.F., 1995, A compendium of vaccine adjuvants and excipients, *Pharm Biotechnol*, 6: 141-228
- Wheeler, A. 2006. A novel adjuvant complex, tyrosine-MPL, for prophylactic and therapeutic vaccines, *Vaccine*, 24(2):40-41
- Wolff MW, Siewert C, Lehmann S, Hansen SP, Djurup R, Faber R, Reichl U. Capturing of cell culture-derived modified Vaccinia Ankara virus by ion exchange and pseudo-affinity membrane adsorbers. *Biotechnol Bioeng*. 2010 Mar 1;105(4):761-9.
- Wood JM, Schild GC, Folkers C, Mumford J, Newman RW. The standardization of inactivated equine influenza vaccines by single-radial immunodiffusion. *J Biol Stand*. 1983 Apr;11(2):133-6.
- Wyde, P.R., Guzman, E., Gilbert, B.E., Couch, R.B., 2001. Immunogenicity and protection in mice given inactivated influenza vaccine, MPL, QS-21 or QS-7. *International Congress Series*, 1219:999-1005
- Zinkernagel, R.M., 2002. On differences between immunity and immunological memory. *Current Opinion in Immunology*, 14(4):523-536.
- Availability of a candidate reassortant vaccine virus for the novel influenza A (H1N1) vaccine development. WHO. <http://www.who.int/csr/disease/swineflu/guidance/laboratory/en/index.html>
- WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. WHO/CDS/CSR/NCS/2002.5 Rev. 1. Page 28-36.
- Summary of available potency testing reagents for Pandemic (H1N1) 2009 virus vaccines-update. WHO.
- Biocontainment requirements for vaccine production from and quality control of the reassortant vaccine candidate viruses IDCDC-RG15, NIBRG-121 and X-179A. WHO

ภาคผนวก 1



G-TECH TECH CO., LTD.

100/100 หมู่ 10 ตำบลบ้านใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดภูเก็ต

Warehouse/Industrial Building 010 THUM VAD

100/100 หมู่ 10 ตำบลบ้านใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดภูเก็ต

วันที่ 7 กรกฎาคม 2553

เรื่อง รายงานผลการตรวจสอบ ระบบอากาศของห้อง BIO SAFETY LABORATORY - 2 ENHANCED
ห้อง K.614 ชั้น 6 อาคารเฉลิมพระเกียรติ (AT - REST PHASE)

เรียน ศส.พด. อรุณี นิตินันท์
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ตามที่ท่านได้กรุณาอนุเคราะห์ไว้วางใจให้บริษัท ดำเนินการตรวจสอบระบบอากาศ
ของห้อง BIO SAFETY LABORATORY - 2 ENHANCED ห้อง K.614 ชั้น 6 อาคารเฉลิมพระเกียรติ
(AT - REST PHASE) ของท่านนั้น

บัดนี้ ทางบริษัท ได้ดำเนินการเป็นที่เรียบร้อยแล้ว พร้อมกับเก็บข้อมูล ซึ่งได้ รายงานข้อมูลต่าง ๆ
ดังรายละเอียดที่แนบมา



ขอแสดงความนับถือ

(นายพลพล สันติเทวกุล)

กรรมการผู้จัดการ

REQUIREMENT TESTS FOR CONTAINMENT HVAC

| <u>REQUIREMENT TESTS</u> | <u>EXPECTED RESULTS</u> |
|---|--|
| PRIMARY CONTAINMENT (BSC) | |
| 1. HEPA FILTER INSTALLATION LEAK TEST | |
| 1.1) DOWNFLOW HEPA FILTER | 1.1) PASS HEPA FILTER INSTALLATION LEAK TEST |
| 1.2) EXHAUST HEPA FILTER | 1.2) PASS HEPA FILTER INSTALLATION LEAK TEST |
| 2. AIRFLOW VELOCITY | |
| 2.1) DOWNFLOW | 2.1) $90 \pm 20\%$ FPM |
| 2.2) INFLOW | 2.2) $100 \pm 20\%$ FPM |
| SECONDARY CONTAINMENT (BSL - 2 ROOM) | |
| 1. HEPA FILTER INSTALLATION LEAK TEST | |
| 1.1) SUPPLY AIR HEPA FILTER | 1.1) PASS HEPA FILTER INSTALLATION LEAK TEST |
| 1.2) EXHAUST AIR HEPA FILTER | 1.2) PASS HEPA FILTER INSTALLATION LEAK TEST |
| 2. ROOM PRESSURE | 2. NEGATIVE PRESSURE (Implies inward airflow) |

Note : PARTICLE COUNTS ARE SUPPLEMENTARY TEST FOR CLEANROOM FEATURE, BOTH PRIMARY AND SECONDARY CONTAINMENTS

SUMMARY RESULT

SUMMARY RESULT

ROOM CLEANLINESS : PRESSURE : HUMIDITY & TEMPERATURE MEASUREMENT

(AT - REST)

| ROOM NO. | ROOM NAME | MEASURING POINT | DESIGN (SPEC.) | | | | ACTUAL | | | |
|----------|--------------|-----------------|--|--------------------|----------------|------------------------------------|--|---------------------------|-----------------------|---|
| | | | CLEANLINESS CLASS 0.5 μm per CUFT | PRESSURE (IN.W.G.) | HUMIDITY (%RH) | TEMPERATURE ($^{\circ}\text{C}$) | CLEANLINESS CLASS 0.5 μm per CUFT | PRESSURE (IN.W.G.) (AVG.) | HUMIDITY (%RH) (AVG.) | TEMPERATURE ($^{\circ}\text{C}$) (AVG.) |
| | | | 1 | CHANGE ROOM | 1 | N/A | -0.04 | N/A | 25.0 \pm 1 | 15,918 |
| 2 | AIRLOCK ROOM | 2 | 10,000 | -0.04 | N/A | 25.0 \pm 1 | 6,664 | -0.04 | 55.2 | 24.7 |
| 3 | ANTI ROOM | 3 | 10,000 | -0.08 | \leq 45 | 23.0 \pm 1 | 2,559 | -0.11 | 57.9 | 23.1 |
| 4 | LAB ROOM # 1 | 4 | 10,000 | -0.12 | 55.0 \pm 10 | 23.0 \pm 1 | 3,667 | -0.15 | 57.6 | 23.7 |
| 5 | LAB ROOM # 2 | 5 | 10,000 | -0.12 | 55.0 \pm 10 | 23.0 \pm 1 | 2,946 | -0.14 | 61.6 | 22.7 |
| 6 | LAB ROOM # 3 | 6 | 10,000 | -0.12 | 55.0 \pm 10 | 23.0 \pm 1 | 4,814 | -0.14 | 55.5 | 22.5 |
| | | | | | | | | | | |

Chisholm Trade Co., Ltd.

SUPPLY AIRFLOW (CFM) AND AIR CHANGE (NO./H)

(AT - REST)

| ROOM NO. | ROOM NAME | SUPPLY AIR NUMBER | DESIGN | | | ACTUAL | |
|----------|--------------|-------------------|--------------------------------|---------------|-------------------|---------------|-------------------|
| | | | ROOM VOLUME (M. ³) | AIRFLOW (CFM) | NO. OF AIR CHANGE | AIRFLOW (CFM) | NO. OF AIR CHANGE |
| 1 | CHANGE ROOM | H # 1 | 15.26 | 224 | 25 | (AVG) 433 | 48 |
| 2 | AIRLOCK ROOM | H # 2 | 8.81 | 307 | 40 | (AVG) 565 | 109 |
| 3 | ANTI ROOM | H # 3 | 69.57 | 273 | 40 | (AVG) 602 | 91 |
| | | H # 4 | - | 273 | - | (AVG) 623 | - |
| | | H # 5 | - | 273 | - | (AVG) 626 | - |
| | | H # 6 | - | 273 | - | (AVG) 616 | - |
| | | H # 7 | - | 273 | - | (AVG) 609 | - |
| | | H # 8 | - | 273 | - | (AVG) 628 | - |
| 4 | LAB ROOM # 1 | H # 9 | 26.25 | 309 | 40 | (AVG) 374 | 48 |
| | | H # 10 | - | 309 | - | (AVG) 369 | - |
| 5 | LAB ROOM # 2 | H # 11 | 26.25 | 309 | 40 | (AVG) 345 | 49 |
| | | H # 12 | - | 309 | - | (AVG) 407 | - |
| 6 | LAB ROOM # 3 | H # 13 | 26.25 | 309 | 40 | (AVG) 396 | 50 |
| | | H # 14 | - | 309 | - | (AVG) 370 | - |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |

SUPPLY AIR HEPA FILTER LEAK TEST RESULT

(AT - REST)

| ROOM NO. | MEASURING POINT | | LEAK TEST RESULT | PASSED / FAILED | CERTIFICATION NO. |
|----------|-----------------|-------------|------------------------------------|-----------------|-------------------|
| | ROOM NAME | HEPA FILTER | | | |
| 1 | CHANGE ROOM | H# 1 | NO LEAK | PASSED | H 5132 / 2010 |
| 2 | AIRLOCK ROOM | H# 2 | NO LEAK | PASSED | H 5032 / 2010 |
| 3 | ANTI ROOM | H# 3 | LEAK AT GASKET, REPAIRED | PASSED | H 5033 / 2010 |
| | | H# 4 | LEAK AT MEDIA, REPAIRED | PASSED | H 5034 / 2010 |
| | | H# 5 | LEAK AT GASKET, REPAIRED | PASSED | H 5035 / 2010 |
| | | H# 6 | NO LEAK | PASSED | H 5131 / 2010 |
| | | H# 7 | LEAK AT MEDIA, REPAIRED | PASSED | H 5036 / 2010 |
| | | H# 8 | LEAK AT MEDIA, REPAIRED | PASSED | H 5037 / 2010 |
| 4 | LAB ROOM # 1 | H# 9 | LEAK AT GASKET, REPAIRED | PASSED | H 5038 / 2010 |
| | | H# 10 | LEAK AT MEDIA, REPAIRED | PASSED | H 5039 / 2010 |
| 5 | LAB ROOM # 2 | H# 11 | LEAK AT GASKET, REPAIRED | PASSED | H 5060 / 2010 |
| | | H# 12 | NO LEAK | PASSED | H 5061 / 2010 |
| 6 | LAB ROOM # 3 | H# 13 | LEAK AT MEDIA AND GASKET, REPAIRED | PASSED | H 5062 / 2010 |
| | | H# 14 | NO LEAK | PASSED | H 5063 / 2010 |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |

BIOLOGICAL SAFETY CABINET AIR HEPA FILTER LEAK TEST RESULT

(AT - REST)

| ROOM NO. | MEASURING POINT | | LEAK TEST RESULT | PASSED / FAILED | CERTIFICATION NO. |
|----------|----------------------------|-------------|------------------|-----------------|-------------------|
| | ROOM NAME | HEPA FILTER | | | |
| 1 | BSC # 1 | | | | |
| | LAB ROOM # 1 | | | | |
| | - HEPA FILTER FOR DOWNFLOW | H#1 | NO LEAK | PASSED | H 5064 / 2010 |
| | - HEPA FILTER FOR EXHAUST | H#2 | NO LEAK | PASSED | H 5065 / 2010 |
| 2 | BSC # 2 | | | | |
| | LAB ROOM # 2 | | | | |
| | - HEPA FILTER FOR DOWNFLOW | H#1 | NO LEAK | PASSED | H 5066 / 2010 |
| | - HEPA FILTER FOR EXHAUST | H#2 | NO LEAK | PASSED | H 5067 / 2010 |
| 3 | BSC # 3 | | | | |
| | LAB ROOM # 3 | | | | |
| | - HEPA FILTER FOR DOWNFLOW | H#1 | NO LEAK | PASSED | H 5068 / 2010 |
| | - HEPA FILTER FOR EXHAUST | H#2 | NO LEAK | PASSED | H 5069 / 2010 |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |

HEPA FILTER TOTAL LEAK TEST RESULT

(AT-REST)

| ROOM NO. | MEASURING POINT | | LEAK TEST RESULT | PASSED / FAILED | CERTIFICATION NO. |
|----------|---------------------------|-------------|------------------|-----------------|---------------------|
| | ROOM NAME | HEPA FILTER | | | |
| | EXHAUST FAN # 1 | | | | |
| | พัดลมดูดอากาศในห้องผ่าตัด | | | | |
| | - HEPA FILTER FOR EXHAUST | EH # 1 | NO LEAK | PASSED | H 5116-H5119 / 2010 |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |

ภาคผนวก 2



กองบริหารงานวิจัย มหาวิทยาลัยสกลนคร
โทร. 02-849-6241-6 โทรสาร 02-849-6247

ที่ ศบ 0517.016/4251

วันที่ ๒๐ มิถุนายน 2553

เรื่อง การรับรองโครงการวิจัยที่เสนอขอคำรับรองด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ

เรื่อง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พญ.อรุณี วิศิษฐ์บุญานนท์

ตามที่ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พญ.อรุณี วิศิษฐ์บุญานนท์ แห่งคณะวิทยาศาสตร์ ได้
เสนอโครงการ วิจัยเรื่องการพัฒนาวัคซีนเชื้อตายไข้หวัดใหญ่ H1N1 2009 เพื่อใช้ในการทดลองใน
ถึง มาที่ขอคำรับรองจากคณะกรรมการความปลอดภัยทางชีวภาพนั้น

บัดนี้ โครงการวิจัยดังกล่าวได้รับผลการรับรองจากคณะกรรมการความปลอดภัย
ทางชีวภาพแล้ว กองบริหารงานวิจัยขอสงวนสิทธิ์รับรองโครงการวิจัยตามเอกสารที่แนบมาพร้อมนี้

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ

(นางรัตนา เพ็ชรอุไร)

ผู้อำนวยการกองบริหารงานวิจัย

ตำแหน่งรอง คณบดี คณะวิทยาศาสตร์

Approval No.MU.2010-001....



**Conferment of Biosafety Certificate
Mahidol University, Thailand**

Title of Project: Development of inactivated influenza H1N1 vaccine for animal
experimental use

Principle Investigator: Assist. Prof. Aranee Thirithanyanon, M.D.

Name of Institution: Faculty of Science

Approved by The Subcommittee on Biosafety Mahidol University

Signature of Chairman:

(Prof. Dr. Srisin Khusmith)

Signature of President of Mahidol University:

(Assoc. Prof. Dr. Sansanee Chaiyaroj)

Vice President for Research and Academic Affairs

For the President

Date of Approval:

25 JUN 2010

Date of Expiration:

26 JUN 2011

ภาคผนวก 3

ใบส่งจองสินค้า

ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล

999 ถนนพุทธมณฑลสาย 4 ตำบลศาลายา อำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม 73170

โทร. 02-4419699 (เบอร์ตรง) 02-4419342, 02-4419698 ต่อ 111, โทรสาร 02-4410910

E-mail address : nlacserv@mahidol.ac.th

ชื่อผู้ติดต่อ ...รศ.ทญ.ดร.รังสินี มหานนท์ หรือ นายนพดล สะอาดเยี่ยม

E-mail address : rangsini.m@chula.ac.th หรือ manutd200101@yahoo.com.....

สถานที่ทำงาน **ห้องปฏิบัติการอิมมูโนวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**

ตึกสมเด็จย่า 93 ชั้น 10 ห้อง 1016

เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330

โทรศัพท์...0-2218-8861-2.....โทรสาร ...0-2218-8861-2.....

ออกใบส่งสินค้าในนาม/ ออกใบเสร็จในนาม(ต้องเป็นข้อมูลเดียวกัน)

คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถานที่ส่งสินค้า **ห้องปฏิบัติการอิมมูโนวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**

ตึกสมเด็จย่า 93 ชั้น 10 ห้อง 1016

หมายเหตุ

กรุณาใช้ใบสั่ง 1 ใบต่อผู้สั่ง 1 รายเท่านั้น

| วันที่ ต้องการ | ชนิดสัตว์/ ผลิตภัณฑ์ | อายุ (สัปดาห์) | น้ำหนัก (กรัม) | เพศ | จำนวน | หมายเหตุ | เลขที่ใบสั่ง (เฉพาะ เจ้าหน้าที่ศูนย์สัตว์ทดลอง ฯ) |
|-----------------------|-------------------------|-------------------|-------------------|------------|-------|------------------------------|---|
| 18 มกราคม ม2554 | mouse/BALB/c | 4 | 20-40 | Male | 25 | | |
| 1 มีนาคม 2554 | mouse/BALB/c | 4 | 20-40 | Femal e | 25 | ได้ก่อนกำหนด กรุณาโทรแจ้ง | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |

บันทึกเพิ่มเติมสำหรับผู้ลูกค้า

.....

สำหรับเจ้าหน้าที่ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติเท่านั้น

บันทึกใบส่งจองสินค้า วันที่.....เวลา

โดย.....

ภาคผนวก 4

CHULALONGKORN UNIVERSITY
ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE (CU-ACUC)

Protocol Review No.

Protocol review numbers are composed of the last two digits of Christian Era, followed by two digits of faculty code number, and the last three digits run by faculty IACUC on queue.

****ให้กรอกหมายเลข 2 ตัวแรกเป็นปี ค.ศ.ตามด้วยรหัสของคณะ 2 ตัว และ 3 ตัวท้ายเป็นลำดับการขออนุญาตใช้สัตว์****

Animal Use Protocol Title: Testing immunogenicity of influenza H1N1 2009 vaccine in a mouse model.

โครงการใช้สัตว์เรื่อง: ทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดภูมิคุ้มกันของโรคของวัคซีนไข้หวัดใหญ่ H1N1 2009 ในการทดลองในหนู

Principal Investigator: Associate Professor Rangsini Mahanonda

Address: Department of Periodontology, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University

Telephone no: 02 2188861 **Mobile phone:** 089 8978288

E-mail address rangsini.m@chula.ac.th

Classification: Research Testing Biomaterial production Teaching
 Breeding Others, please specify.....

Anticipated Project Period: Dec2010-April 2011

Funding Source(s): National Research Council of Thailand

Grant has been: Submitted
 Approved, If approved, duration of approval.....

Your signature, as P.I. on this application, verifies that the information herein is true and correct and that you will comply with standard of animal care and use established under ethical principles and guidelines for the use of animals for scientific purposes and policies of Chulalongkorn University.

Signature of P.I. / Instructor.....
(...../...../.....)

Signature of Attending veterinarian or Authorized person.....(...../...../.....)

Signature of Associate Dean / Deputy Director (Research).....(...../...../.....)

For official CU-ACUC

1. Protocol reviewed on...../...../.....

By CU-ACUC Faculty/Institute.....

2. Result Approved Approved with minor correction Not approved

Signature of Chairman.....

Signature of Secretary.....

ภาคผนวก 5

**RESEARCH PROTOCOL FORMAT
FOR A PERMISSION OF ANIMAL CARE AND USE**

Faculty or Institute: Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University

Animal Use Protocol Title: Testing immunogenicity of influenza H1N1 2009 vaccine in a mouse model.

โครงการใช้สัตว์เรื่อง(ถ้ามีภาษาไทยโปรดระบุ) ทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดภูมิคุ้มกันของโรคของวัคซีนไขหวัดใหญ่ H1N1 2009 ในการทดลองในหนู

โครงการนี้ขออนุญาตเพื่อการวิจัยในหัวข้อเรื่องต่อไปนี้ (เฉพาะกรณีที่ชื่อเรื่องไม่ตรงกันหรือมากกว่า 1 โครงการวิจัย) (This animal use protocol title will include these following research titles)

Principal Investigator: Associate Professor Rangsin Mahanonda

Address: Department of Periodontology, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University

Telephone no: 02 2188861 Mobile phone: 089 8978288

E-mail address rangsin.m@chula.ac.th

Co-Investigator(s) involving animal use:

| Name / Surname | Address | Position | Phone | Fax / E- mail |
|--------------------------|---|------------------------|--|--|
| Pornchai Jansisyant | Department of Oral Maxillofacial Surgery, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University | Associate Professor | 02- 2188593 02- 2188581 | jpornchai@hotmail.com |
| Garnpimol Ritthidej | Faculty of Pharmacy, Chulalongkorn University | Professor | | Garnpimol.R@chula.ac.th |
| Arunee Thitithyanont, | Faculty of Science, Mahidol University | Associate Professor | 02-2015528 | 662-6445411 scaty@mahidol.ac.th |

1. Non-technical summary: (ให้กรอกข้อมูลเป็นภาษาอังกฤษหรือไทยความยาวไม่เกิน 250 คำ สำหรับให้บุคคลทั่วไปอ่านแล้วเข้าใจประโยชน์ของงานวิจัยที่จำเป็นต้องใช้สัตว์และการกระทำต่อตัวสัตว์)

Safe and effective influenza vaccines are the best way to fight against an influenza pandemic. At present, Thailand does not have capability to produce its own influenza vaccine and has to depend on vaccine production from western countries. In an influenza pandemic, the availability of a pandemic vaccine will be delayed by several months due to the viral production and vaccine formulation. In addition, the limitation of world production capacity will restrict global access to the vaccine. In 2009, Thailand was chosen by World Health Organization (WHO) for a program to expand global pandemic influenza production using live attenuated influenza virus. Furthermore, the Thai government funding agency : The National Research Council of Thailand (NRCT) also has funded a group of scientists from Chulalongkorn and Mahidol University to develop an influenza vaccine which requires small amount of antigen and induces broad immunity.

2. Objective: As part of our research development process, we will test immunogenicity of our influenza H1N1 2009 vaccine in a mouse model first before going to non-human primates. Therefore, the main objective of this study is to test if our vaccine preparation (split vaccine) is immunogenic in BALB/c mice.

3. Experimental design: Influenza H1N1 2009 split vaccine will be provided By Dr. Arunee. BALB/c mice (4-8 weeks) to be used in this study will be purchased from National Animal Center, Mahidol University and housed at Floor7, Pre-clinic Building, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University. Healthy naïve mice will be selected and randomized into 3 groups as follows:

| Group | Route | N |
|---|-------|----|
| 1) Saline control | IM | 5 |
| 2) H1N1 2009 vaccine (7.0 ug HA) | IM | 5 |
| 3) H1N1 2009 vaccine (7.0 ug HA) in oil in water emulsion | IM | 5 |
| Total animals: | | 15 |

Note: IM = intramuscular

BALB/c mice (4-8 weeks) will be maintained under SPF conditions. Mice will be immunized at hind leg on days 0 and 14 with 7 ug of H1N1 2009 hemagglutinin (HA) in 0.5 ml with or without oil in water emulsion. Blood will be collected at days 10 and 24 and assayed for HA-specific antibody production by hemagglutination assay. We do not expect any toxicity from vaccination. In the event of an adverse reaction, observations will be made daily and documented in the laboratory note book.

Hemagglutination Inhibition (HI) Assay:

To detect antibodies that inhibit binding of influenza virus to cells, serum samples will be treated with receptor-destroying enzyme and subsequently heat-inactivated. Serial dilutions will be preincubated with pre-determined concentration of inactivated influenza H1N1 2009 in microtiter plates at room temperature for at least 15 min after which red blood cells (RBCs) from goose will be added. RBCs will be allowed to settle at room temperature until cells in the RBC control form a compact negative pattern. If an antigen/antibody reaction occurs, hemagglutination of the RBCs will be inhibited. Inhibition will be graded as “+” for inhibition of HA, “±” for partial inhibition, and “-” for no inhibition. The HI titer is the reciprocal of the last dilution of antiserum that completely inhibits hemagglutination.

4. Data analysis / Statistical method: Antibody responses between groups will be compared by using the Student’s t test and the Mann-Whitney U test (non-normally distributed data). P-value of less than 0.05 will be considered statistically significant.

5. Animal model and species justification:

5.1 Description of animals

| Common name | Strain / Stock | Age | Weight | Sex | Number |
|-------------|----------------|-----------|--------|----------------|--------|
| mouse | BALB/c | 4-8 weeks | 20-40g | Male or female | 15 |

Special consideration (e.g. SPF-- please specify): maintained under SPF condition

Source / Vendor: National Animal Center, Mahidol University

5.2 Scientific justification for animal species and number requested

5.2.1 Explain why the proposed species is / are the most appropriate.

BALB/c mice are commonly used for pre-clinical testing vaccine immunogenicity.

5.2.2 Provide an explanation of how the numbers of animals to be used in each group or total were appropriate based on scientific and statistical requirements to achieve objectives

Five mice per group will be used (total 15 for 3 groups). Mice are inbred animals and their immunoresponses to vaccine are similar in each animal. In general, for this kind of study, 4-5 mice per group is enough to test statistical significance.

6. Animal care:

6.1 Husbandry consideration:

6.1.1 Experimental place

✓ Building : Pre-clinic, floor7

✓ Room: animal center

Nursing place

✓ Building: Pre-clinic, floor7

✓ Room: animal center

6.1.2 Housing System:

Strictly hygienic conventional

✓ Environmental chamber

Others, please specify

IVC

Isolator

6.1.3 Caging:

✓ Solid bottom, open top

Metabolic cages

Others, please specify

Static filtered top cages

Individual ventilated cage (IVC)

6.1.4 Cage size (W x L x H): 25x40x17cm.

6.1.5 Caging materials:

✓ Plastic

Stainless steel

Others, please specify

6.1.6 Number of animals / cage: 5 animals per cage

6.1.7 Environmental requirements:

Temperature: 25±2 °C

Humidity: 45-55%

Light: Standard fluorescent
 Others, please specify

Light cycle: Standard 12 : 12
 Others, please specify

6.1.8 Food:

Type of food: Standard diet
 Others, please specify

Feeding schedule:

Ad libitum
 Others, please specify

6.1.9 Water:

Type of water: Hyperchlorinated.....ppm Acidified, pH
 RO-UV
 Others, please specify: Autoclaved water

Provision of water:

Ad libitum
 Others, please specify

6.1.10 Bedding:

Wood shaving Sawdust
 Paper Other, please specify

6.2 Attending veterinary care: (Describe the routine veterinary care.)

Standard: Change bedding, water, and food daily
 Others, please specify

7. Animal welfare:

7.1 Does the proposed research duplicate any previous work?

Yes (explain why it is scientifically necessary to duplicate the experiment)

We reviewed published articles during 2009-2010 (the out break of pandemic H1N1 2009 was first reported in March, 2009, Mexico) and found one article that similar to this proposed study. As we mentioned earlier that our research project has been funded by NRCT to develop a pandemic influenza

vaccine for clinical use. Split vaccine H1N1 2009 is locally produced by one of our team; Dr. Arunee and it is critical to test if our vaccine is immunogenic in a mouse model. If the results from mouse study look promising, we will then evaluate in non-human primates that are phylogenetic closer to humans.

- No: Keyword search.....
- Literature search.....
- Database search.....

7.2 Briefly describe how you have considered each of the following regarding 3Rs or why they are not applicable:

7.2.1 Replacement of animals (e.g., with *in vitro* models, computer models or less sentient animals)... Alternatives were considered, including computer modeling and cell cultures (such as *in vitro* models of humoral and cellular immunity). No model or *in vitro* system is currently available that adequately predicts immune responses to influenza vaccines.

7.2.2 Reduction in the number of animals (e.g., using appropriate statistical methods in the design analysis of the study; reduction in experimental variability by using animals of defined genetic or microbiological status; sharing tissue among investigators): This protocol uses previous murine model data to assure the least number of animals will be used to achieve statistical significance and meaningful data.

7.2.3 Refinement of experimental procedures to minimize pain or distress (e.g., early endpoint; use of analgesics, anesthetics or sedatives; techniques that reduce stress in the animal): This protocol uses environment enrich strategies such as food treats, group housing, All animal manipulations and procedures are conducted by well-trained staffs.

7.3 Potential animal pain and distress assessment:

7.3.1 Pain or Distress Classification (**USDA Classifications**)

- Classification B**
- Classification C**
- Classification D**
- Classification E**

7.3.2 During the study:

1. How often will the clinical condition of animals be monitored?

After vaccination, animal will be observed daily for adverse reactions.

2. Who will monitor the clinical condition of the animals?

Dr. Pornchai and Dr. Rangsini

7.3.3 Are the animals expected to experience any specific study-induced related problem or any health problems as a result of the phenotype of the animal?

No

Yes, please answer the following question:

7.3.3.1. Describe the expected problems.

7.3.3.2 What criteria will be use to assess pain, distress, or discomfort?

Inactivity

Loss of appetite

Loss of weight: 5% 10% 15% 20% weight loss

Restlessness

Abnormal resting postures, somnolence or hunched posture

Licking, biting, scratching, or shaking a particular area

Failure to show normal patterns of inquisitiveness

Failure to groom, causing unkempt appearance

Guarding (protecting the painful area)

Loss of mobility

Red stain around the eyes of rats

Unresponsiveness

Labored breathing

Others, please specify

7.4 Analgesics :

| Common name | Drug concentration | Dose | Route of administration |
|-------------|--------------------|------|-------------------------|
|-------------|--------------------|------|-------------------------|

| | | | |
|--|--|--|--|
| | | | |
| | | | |
| | | | |

7.5 Anesthesia (Pre-anesthetic and anesthetic):

No Yes

If yes, please answer the following questions:

| Common name | Drug concentration | Dose | Route of administration |
|-------------|--------------------|------|-------------------------|
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

7.5.1 Who is responsible for maintaining anesthesia.....

7.5.2 Methods used to monitor anesthesia, frequency of monitoring.....

7.5.3 What criteria will be used to assess level of anesthesia?

- Respiration rate
- Heart rate
- ECG
- Toe pinch
- Tail pinch
- Corneal reflex
- Color of mucous membrane
- Muscular relaxation
- Others (pulse oximeter, respirometer) please, specify.....

7.5.4 How animals are kept warm

7.5. Describe post-anesthetic treatment or intervention

8. Surgery:

Anatomic Location.....

Needle size/Catheter and length.....

Volume Collected.....

Frequency

Tissue Collection:

Anatomic Location.....

Needle size/Catheter and length.....

Biopsy size.....

Frequency

Injection/Infusion:

Anatomic Location: Hind leg (intramuscular injection)

Needle size/Catheter and length: size 23 gauge

Volume Administered: 0.05 ml

Frequency (per day): one dose at day 0 and one dose at day 10

Chemical/Drug: influenza vaccine (protein)

Gavaging

Needle size/Catheter and length.....

Volume Administered.....

Frequency.....

Chemical/Drug

Others (please specify).....

10. Restraint with Mechanical Devices (in conscious animals):

No Yes

If yes, please answer the following questions:

Describe device, duration of restraint, frequency of observation, condition procedures, and steps to assure comfort and well-being.

.....

If prolonged restraint is used, must provide justification.....

11. Projects Involving Food and Water Deprivation, or Dietary Manipulation:

No Yes

If, yes describe methodology:

Individual animal's weight is monitored every.....days.

Individual animal's weight is not monitored.

| Item | Amount Restricted/Added | Duration | Compound Supplemented | Compound Deleted | Frequency |
|-------------------------|----------------------------|----------|--------------------------|---------------------|-----------|
| Food Restriction | | | | | |
| Fluid Restriction | | | | | |
| Nutrient Alterations | | | | | |

12. Tumor/ disease models/ toxicity testing:

No Yes

If yes, describe methodology used for tumor/disease and /or toxicity testing.

.....

13. Behavioral studies/Pain models/:

No Yes

If yes, describe methodology used behavioral studies.

.....

14. Euthanasia / Disposition of animals:

14.1 Disposal of animals after completion of activity:

Euthanatized

Return to production / breeding unit / facility inventory

- Transfer to another research project:
 (please list Protocol No. and Investigator).....
- Others, please describe.....

14.2 Chemicals/Drugs used for euthanasia

| Common name | Dose | Route of administration | Other (please describe) |
|-----------------|-----------|-------------------------|-------------------------|
| CO ₂ | Over dose | inhalation | |
| | | | |
| | | | |

15. Experimental endpoint: (State the projected study endpoint for the animals. Indicate whether recovery, euthanasia, or death is expected; and the specific plan for determining when the animal experimentation phase will be stopped). The study endpoint is the last collection of blood at day 24 (day 0 = first dose).

Early Endpoint is used (the animals are humanely euthanized prior to the expected terminate study day): No Yes

If yes, early endpoint criteria are.....

16. Biohazard / Safety:

Infectious agent is (are) used: specify.....

Animal bio-safety level (ABSL).....

Biohazardous chemical or carcinogen or radioactive material is (are) used:
 specify.....

None

Explain any safety precautions or programs designed to protect personnel from biohazards and any surveillance procedures in place to monitor potential exposures.

Only assigned personnel can enter the animal rooms unaccompanied. Appropriate personal protective equipment including lab coats, mask, gloves, are routinely worn before entering the animal rooms and at all times when providing care and handling of animals.

Explain how the waste is decontaminated and disposed of.

Biohazard waste containers for sharps shall be kept in all study rooms and treatment areas, for disposal of needles, syringes, etc. Sharps and non-sharp material waste will put in separate biohazard containers. Seventy percent alcohol or Dettol will be used for cleaning surface area before and after using.

List primary safety equipment and personnel protective equipment requirements.

Lab coats, mask, gloves

List procedures if accident, injury or illness occurs.

Cleaning the wound by flushing with sterile water and apply antibiotic medication. If the wound does not improve in 10 days, go to see doctor. Report an accident to the principal investigator.

List specific treatment provision for accidental exposure.

Cleaning the wound by flushing with sterile water and apply antibiotic medication. If the wound does not improve in 10 days, go to see doctor. Report an accident to the principal investigator.

List relevant occupational medical health provision.

NONE

Signature.....

(Rangsini Mahanonda)

(Principal Investigator)

Date.....

ภาคผนวก 6

INSTRUCTIONS

Instructions for filling out the request form for initiating a Cooperative Research and Development Agreement (CRADA):

1. All information requested must be filled in the form. If something does not apply, **respond with “N/A”**.
2. If project is funded by the outside party, you must send this request, using the table provided in section 5. FUNDING, to the Resource Management, to assure that all appropriate direct/indirect costs are captured. The person in RM assigned this review function is:

Avonda.Robinson@us.army.mil
301 319 9672

3. Once the budget is approved, your division director must send an approval to the ORTA BEFORE the request is reviewed by the Agreements Review Committee (ARC).
4. CRADAs partners can **include**: Businesses, Universities, Nonprofit organizations, and Local and State Governments, Foreign Governments (provided the collaboration is related to public health issue and the Statement of work is very specific)

1. WRAIR PI INFORMATION

- A. Your Name as PI: Sathit Pichyangkul, Ph.D.
Vaccinology Research Program
- B. PI Title: Director of Immunology and
- C. Division: Department of Immunology and Medicine, USAMC-AFRIMS
- D. Phone: 662 696 2794
- E. Email: sathitp@afirms.org
- F. RAD: F

If the PI is a contractor at WRAIR, then provide the information of the Contracting agency:

g. Name of Contracting agency:

h. COR on the Contract:

i. Phone of Contract agency:

j. Email of point of contact of Contract agency:

2. COOPERATOR'S INFORMATION

A. Name of Party: Chulalongkorn University

B. Address of Party: Faculty of Pharmacy, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

C. Category of Party: Local University (Bangkok, Thailand)

D. Name of Party's PI: Garmpimol C Ritthidej

E. PI Title: Professor

F. PI's Phone Number: 02 218 8273, 086 017 2820

G. PI's Fax Number: 02 218 8279

H. Email address for PI: **Garmpimol.R@chula.ac.th**

I. Name of Party's Administrative Point-of-Contact (POC): Professor Dr. Kua Wongboonsin
(Ask the PI who administers this type of agreement)

J. Admin POC's Phone Number: 02 218 3395, 081 666 2756 (Vice President of Research)

K. Email of Admin POC: kua.w@chula.ac.th

If there is more than one partner, then copy A – L and add all information for each partner.

| |
|----|
| A: |
| B: |
| C: |
| D: |
| E: |
| F: |
| G: |
| H: |
| I: |
| J: |
| K: |
| L: |

3. STATEMENT OF WORK (SOW) FOR THE COLLABORATION

A. Does the SOW involve a clinical study? NO

If answer to A is YES, then Skip forward to #4.

The SOW for preclinical studies needs to be provided in accordance with the format and description provided below to include: title, background and agrees to statements.

B. Title of Project: Evaluation of the immunogenicity of influenza H1N1 2009 vaccine formulated with stable oil in water emulsion in non-human primates

C. Background:

Provide in the box below a brief description of the project and of what value it is to WRAIR. Include a statement of how this project will benefit the military mission of WRAIR and the RAD you are working under. Describe the partner you have chosen to work with and why (i.e., what type of expertise the partner have and how this will benefit WRAIR).

Background: Safe and effective influenza vaccines are the best way to fight against an influenza pandemic. At present, Thailand does not have capability to produce its own influenza vaccine and has to depend on vaccine production from western countries. In an influenza pandemic, the availability of a pandemic vaccine will be delayed by several months due to the viral production and vaccine formulation. In addition, the limitation of world production capacity will restrict global access to the vaccine. In 2009, Thailand was chosen by WHO for a program to expand global pandemic influenza production using live attenuated influenza virus. Furthermore, the National Research Council of Thailand (NRCT) has funded a group of scientists from Chulalongkorn and Mahidol University to develop an adjuvanted influenza vaccine which requires small amount of antigen and induces broad immunity.

Military relevance: More than 40,000 U. S. military members died from “Spanish flu” (H1N1) during World War I (1918-19). Presently, we are in the post pandemic period of the H1N1 2009 influenza which rapidly spread around the world last year. Fortunately, the pandemic H1N1 has not been as severe as first feared. The magnitude of disease severity similar to seasonal influenza with case fatality rate (CFR) of about =0.003. If the next pandemic will cause CFR similar to “Spanish flu” (2%), such a pandemic could threaten U.S. national security at both the military and civilian levels. The Department of Defense’s mission is to preserve combat capabilities and readiness, and save lives of military personnel and families. The present study will serve this mission by advancing understanding of how adjuvant could enhance vaccine immunogenicity, thereby increasing the potential for development of effective pandemic influenza vaccines.

D. Scope:

WRAIR agrees to: (list a series of statements in the box that follows indicating what WRAIR will be doing as part of the Statement of Work)

- 1) Prepare and obtain approved animal use protocol by AFRIMS IACUC and USAMRMC.
- 2) Provide healthy rhesus monkeys that have not been exposed to influenza.
- 3) Receive influenza vaccines from Chulalongkorn University and vaccination will be conducted with agreed schedule set by the AFRIMS project manager and the Chulalongkorn project manager.
- 4) Collecting blood from rhesus monkeys with agreed schedule set by both parties.

Partner agrees to: (list a series of statements in the box indicating what the partner will be doing as part of

- 1) Appoint Chulalongkorn project manager to work with AFRIMS project manager.
- 2) Provide AFRIMS with influenza vaccines.
- 3) Work with AFRIMS project manager to define and agree on the report requirement and format.
- 4) Deliver funds to WRAIR that will cover of all work performed.

the Statement of Work.

E. Has the CRADA partner reviewed and approved the SOW? YES

4. GENERAL QUESTIONS RELATED TO STATEMENT OF WORK

A. Does the SOW involve a WRAIR Animal Use Protocol? YES

If yes, please provide Protocol#: NA

B. Does the SOW involve Human Use (including serum, or any human tissue)? NO

If yes, have you contacted the Division of Human Subjects Protection (DHSP)?

OR

If yes, if you have a WRAIR Human Use Protocol# please provide here: _____ and go to C.

C. If you have provided a WRAIR Human Use Protocol number, than provide the pages from the consent form in that protocol that demonstrates that the samples being used under this requested collaboration can be used for the purpose stated in the Statement of Work.

Note: For collaborations that are specifically Clinical Trials, then you need to include a Clinical Trials Agreement (CTA) that takes the place of the statement of work. You will still do a CRADA to address the terms of the agreement and the CTA will be added on to the CRADA as an appendix. The point of contact for clinical trials agreements is:

LTC Melanie Guerrero

Email: Melanie.Guerrero@us.army.mil Phone:

CTA ONLY:

A. Have you contacted LTC Guerrero? N/A

5. FUNDING

A. Is this project funded by the outside Party? YES

If answer to A is NO, then please name the WRAIR fund site being used for this project:

If the answer is YES, then before you submit this form to your Div Director, you need to provide the budget to Resource Management (Avonda Robinson) as directed page 1 of this request form.

If the answer is YES, then please provide your budget, using the table below. You can add rows if necessary. Note: you need to determine yearly costs in addition to total cost.

| Project Year | Year 1 | Year 2 | Year 3 | Year 4 | Total |
|--|----------|--------|--------|--------|-------|
| Personnel | | | | | |
| Contracts | | | | | |
| Supplies | | | | | |
| Equipment | | | | | |
| Other | | | | | |
| 1) Rhesus monkeys (N=12), duration of the study = 57 days | \$60,773 | | | | |
| 2) Preparation of animal use protocol and immunization | \$7,500 | | | | |
| Direct cost | \$68,273 | | | | |
| Indirect cost | \$27,992 | | | | |
| Grand Total | \$96,265 | | | | |

Do not release your budget to your partner until it has been reviewed and approved by the Resource Management

6. PATENTS

A. Does the work outlined in the SOW use any WRAIR patented or technologies? NO

If so, please provide patent applications numbers or issued patent numbers here:

ภาคผนวก 7

PROTOCOL TITLE: Evaluation of the immunogenicity of influenza H1N1 2009 vaccine formulated with stable oil in water emulsion in non-human primates

PRINCIPAL INVESTIGATORS: Sathit Pichyangkul, Ph.D.

CO-INVESTIGATORS:

USAMC- AFRIMS: Rawiwan Im-erbsin, DVM

Mahidol University: Arunee Thitithanyanont, MD

Chulalongkorn University: Garmpimol C Ritthidej, Ph.D.

Rangsini Mahanonda, DDS, Ph.D.

NON-TECHNICAL SYNOPSIS

Safe and effective influenza vaccines are the best way to fight against an influenza pandemic. At present, Thailand does not have capability to produce its own influenza vaccine and has to depend on vaccine production from western countries. In an influenza pandemic, the availability of a pandemic vaccine will be delayed by several months due to the viral production and vaccine formulation. In addition, the limitation of world production capacity will restrict global access to the vaccine. In 2009, Thailand was chosen by WHO for a program to expand global pandemic influenza production using live attenuated influenza virus. Furthermore, the National Research Council of Thailand (NRCT) has funded a group of scientists from Chulalongkorn and Mahidol University to develop an adjuvanted influenza vaccine which requires small amount of antigen and induces broad immunity.

II. BACKGROUND

II.1. Background

Historical data suggest that we have lived together with influenza epidemics as early as 1173 (1). However, the causative agent was not identified until 1930s (2). Influenza is caused by RNA viruses belonging to the family orthomyxoviridae, and is classified into 3 types (A, B and C), based on its core protein. Current evidence indicates that influenza A viruses infect both humans and animals (including birds), B viruses infect humans only, and C viruses infect humans and pigs only. Influenza A viruses are further divided into subtypes on the basis of the surface glycoproteins, hemagglutinin and neuraminidase, of which 16 H subtypes (H1-H16) and 9 N subtypes (N1-N9) have been identified. There are no known subtypes of influenza B and C viruses.

Seasonal epidemics are caused by antigenic drift, whereas pandemics are due to antigenic shift resulting from virus reassortment. The 1918 Spanish flu pandemic (H1N1) is recognized as the worst ever influenza pandemic that killed 40-50 million people worldwide. Asian Flu (H2N2) and Hong Kong Flu (H3N2) pandemics were reported in 1957 and 1968, causing 2-3 million and 1 million deaths, respectively.

The outbreak of avian influenza H5N1 in Hong Kong in 1997 (3) caused great concern worldwide due to the high case-fatality rate (CFR) of about 60%. Most human cases to date have arisen from close contact with poultry or poultry waste products; human-to-human transmission evidently remains limited (4). Since each pandemic since 1918 was caused by 3 different subtypes of influenza A viruses (H1, H2, and H3), most influenza experts at the time believed that the next pandemic would be likely caused by the new subtype and derived from avian influenza virus. However, this speculation proved to be wrong. In early 2009, the outbreak of novel influenza H1N1 was first reported in Mexico, rapidly spread around the world and developed as a pandemic in June 2009. A new strain of influenza virus, designated influenza H1N1 2009, which is a reassortant of swine, avian and human influenza viruses was identified as the etiologic agent (5). This new virus exhibits significant epitope differences in both hemagglutinin and neuraminidase (antigenic shift) compared with previously circulating H1N1 viruses.

Early animal data in mice, monkeys and ferret suggested that the pandemic H1N1 2009 induced more severe disease than seasonal H1N1 (6). However epidemiological data suggests that the pandemic H1N1 has not been as severe as first feared. The magnitude of disease severity similar to seasonal influenza with case fatality rate (CFR) of about =0.003.

To date, only viruses for the H1, H2 and H3 subtypes are known to have caused pandemic. It is impossible for scientists to predict what subtype/strain of influenza viruses will cause the next pandemic. In the event of a pandemic, vaccination is universally regarded as the most cost effective public intervention for preventing influenza infection and reducing disease burden. Although there is an advance in research regarding influenza pandemic vaccines, there still will be a production lag of approximately 5-6 months from time the pandemic virus is isolated until the time formulated and available from manufacturers for distribution. In addition, the limitation of world production capacity will restrict global access to the vaccine. In response to these challenges, WHO has recommended to design more potent and effective vaccines that are: a) capable of inducing protective responses after one dose, especially with low dose of antigen, and /or b) induce broad spectrum and long-lasting immunity against both seasonal and pandemic influenza strains.

Adjuvants have been used to enhance both quality and quantity of immune responses. The antigen sparing potential of adjuvants could also substantially increase the number of doses of vaccine (7). In this study we propose to evaluate the immunogenicity of influenza H1N1 2009 formulated with adjuvant containing stable oil in water emulsion. This line of investigation will provide critical information that can be used to better design new generation of influenza pandemic vaccines.

II.2. Literature Search for Duplication

II.2.1. Sources Searched: BIOSIS, BRD, DTIC, EMBASE, FEDRIP, MEDLINE, and SciSearch.

II.2.2. Date of Search: 12-01-2010

II.2.3. Period of Search: 15 years

II.2.4. Key Words of Search: Search #1: influenza H1N1 2009 vaccine, And adjuvant , And stable oil in water emulsion, And (rhesus OR monkey).

II.2.5. Results of Search: The literature search showed 106 hits. Overall, the study described in this protocol is not duplicating any previous work in the area of adjuvanted influenza H1N1 2009 vaccine.

III. OBJECTIVE/HYPOTHESIS

- 1) To measure the immunogenicity of influenza H1N1 2009 vaccine formulated with stable oil in water emulsion.
- 2) To test whether this adjuvanted influenza vaccine induces optimal immunity with low dose of antigen.
- 3) To test if this adjuvanted influenza vaccine induces broad immunity against different subtypes of influenza A viruses.

IV. MILITARY RELEVANCE

More than 40,000 U. S. military members died from “Spanish flu” (H1N1) during World War I (1918-19). Presently, we are in the post pandemic period of the H1N1 2009 influenza which rapidly spread around the world in 2009. Fortunately, the pandemic H1N1 has not been as severe as first feared. The magnitude of disease severity similar to seasonal influenza with CFR of about =0.003. If the next pandemic will cause CFR similar to “Spanish flu” (2%), such a pandemic could threaten U.S. national security at both the military and civilian levels. The Department of Defense’s mission is to preserve combat capabilities and readiness, and save lives of military personnel and families. The present study will serve this mission by advancing understanding of how adjuvant could enhance vaccine immunogenicity, thereby increasing the potential for development of effective pandemic influenza vaccines.

V. MATERIALS AND METHODS

V.1. Experimental Design and General Procedures

V.1.1. Experiment 1: Vaccine and adjuvant will be provided by Mahidol and Chulalongkorn University. Rhesus monkeys to be used in this study

will be selected from the AFRIMS availability pool and housed individually at AFRIMS, Building 5. Healthy rhesus monkeys which have never been vaccinated with influenza vaccine will be selected and randomized into 3 groups as follows:

| N | Group | Route |
|---|--|-------|
| 4 | 1) H1N1 2009 vaccine (7.5 ug HA) | IM |
| 4 | 2) Adjuvanted H1N1 2009 vaccine (7.5 ug HA) | IM |
| 4 | 3) Adjuvanted H1N1 2009 vaccine (3.75 ug HA) | IM |

Total monkeys:

12

Note: adjuvant = stable oil in water emulsion

HA = hemagglutinin

IM = intramuscular

Baseline blood samples will be taken and a physical exam for general health will be performed at Day -14. Two immunizations will be made with the designated vaccines (0.5 ml) by IM into alternate legs on days 0 (left leg) and day 28 (right leg). The amount of vaccine used is 7.5 ug of HA which is equivalent to the dose used in children 6-35 months. In the event of an adverse reaction, observations will be made daily and documented on the VET-GP-008-F5 until resolution of the adverse reaction and treatment will be instituted when indicated at the discretion of the attending veterinarian.

Peripheral blood mononuclear cells will be collected at days -14, 14 and 42 after vaccination to analyze cell-mediated immune responses against influenza vaccine. Additional 2 ml of blood will be collected at days -14, 14 and 42 for measurement of antibody production. Antibody responses to viral hemagglutinin will be measured by hemagglutination inhibition assay (HI). Antigen-specific T cell responses will be evaluated by intracellular cytokine staining (ICS) for IL-2 and IFN-g after *in vitro* re-stimulation of peripheral blood mononuclear cells. All monkeys are expected to survive. After day 42, animals will be released from the study and may be returned to the colony for use on other studies.

V.2.1 Data Analysis: Unlike mice, monkeys are outbred populations and the numbers of animals in each group are too small for testing statistical significance.

V.2.2 Justification for Animal Group Size: We will have four animals per group. A study like this designed primarily to detect trends as opposed to statistical significance.

V.3. Laboratory Animals Required and Justification

V.3.1. Non-animal Alternatives Considered: Alternatives were considered, including computer modeling and cell cultures (such as *in vitro* models of humoral and cellular immunity). No model or *in vitro* system is currently available that adequately predicts in humans or monkeys physiologic and immune responses to malaria vaccines.

V.3.2. Animal Model and Species Justification: Animal vaccine models are justified predictors of human responses to vaccines. Phylogenetically, rhesus monkeys are closely related to humans and are commonly used to evaluate vaccine safety and immunogenicity. Selection of the rhesus monkey model over other animal models is further justified because 1) the availability of specialized reagents for rhesus monkeys enables detailed analyses of immune responses not obtainable on other primate models and 2) our immunology and vaccinology research program at AFRIMS has extensive experience with rhesus monkey studies in the last 15 years.

V.3.3. Laboratory Animals

V.3.3.1. Genus and Species: *Macaca mulatta*

V.3.3.2. Strain/Stock: Indian origin

V.3.3.3. Source/Vendor: AFRIMS Department of Veterinary Medicine

V.3.3.4. Age: 5-10 years at entry

V.3.3.5. Weight: at least 5.0 kg

V.3.3.6. Sex: male and female

V.3.3.7. Special Considerations: All monkeys have never received influenza vaccine and have low back ground reactivity to influenza hemagglutinin, and meet the following requirements; 1) good general health, 2) intact spleen, 3) negative serology for SIV, SRV, STLV-1, and B-virus (Cercopithecine herpesvirus 1), and 4) negative tuberculin responder.

V.3.4. Number of Animals Required (By Species): 12

V.3.5. Refinement, Reduction, Replacement:

V.3.5.1. Refinement: This protocol participates in the Department of Veterinary Medicine's environment enrichment program that includes food treats, toys, group housing, and positive interaction with humans. This protocol uses non-lethal endpoints.

V.3.5.2. Reduction: This protocol uses previous mouse model data to assure the least number of animals will be used to achieve meaningful data in monkeys.

V.3.5.3. Replacement: NA

V.4. Technical Methods:

V.4.1. Pain/Distress Assessment:

V.4.1.1. APHIS Form 7023 Information

V.4.1.1.1. Number of animals

V.4.1.1.1.1. Column C: 12

V.4.1.1.1.2. Column D: 0

V.4.1.1.1.3. Column E: 0

Adverse vaccine reactions are not anticipated. If any vaccine reactions result in a change of the pain category, the category will be revised. Final

numbers in all pain categories will be reported to the IACUC at the conclusion of the study.

V.4.1.2. Pain Relief/Prevention

V.4.1.2.1. Anesthesia/Analgesia Tranquilization: Animals will be handled as little as possible. All animals will be given 5-20 mg/kg ketamine hydrochloride intramuscularly (IM) for anesthesia IAW VM SOP L-VC-12-00, Non-human Primate Injectable Anesthesia when phlebotomized, or vaccinated.

V.4.1.2.2. Pre- and Post-procedural Provisions: Monkeys will be fasted for 12 hours prior to regularly scheduled anesthetic events and monitored for any complications following phlebotomy during recovery from anesthesia IAW SOP L-VC-0012 Injectable NHP Anesthesia.

V.4.1.2.3. Paralytics: NA

V.4.1.3. Literature Search for Alternatives to Painful or Distressful Procedures: NA

V.4.1.4. Unalleviated Painful/Distressful Procedure Justification: NA

V.4.2. Prolonged Restraint: NA

V.4.3. Surgery: NA

V.4.4. Animal Manipulations

V.4.4.1. Injections: All laboratory personnel will follow USAMC-AFRIMS Safety and Occupational Health SOPs. Injections, anesthetics, control buffers, and vaccines will be administered by IM injection VM SOP L-VC-104-00, using a 22G-27G needle (1/2" to 1" in length).

V.4.4.2. Biosamples: Phlebotomy will be conducted in accordance with VM SOP L-VC-22-00, Nonhuman Primate Phlebotomy. Up to 10% of the circulating blood volume can be taken every 3 to 4 weeks. The circulating blood volume for a rhesus monkey is estimated to be 54 ml/kg. Thus, using the lowest weight in kg of a rhesus monkey that is eligible for enrollment (5kg = 270 ml total blood volume), up to 27 ml

can be safely drawn every 3 to 4 weeks from each monkey. The total blood volume to be obtained in this protocol will be in accordance with these “volume per time” guidelines.

V.4.4.3. Adjuvants: Stable oil in water emulsion was previously used with malaria vaccine and showed no toxicity.

V.4.4.4. Monoclonal Antibody (MAbs) Production: NA

V.4.4.5. Animal Identification: Permanent chest tattoo numbers and cage tags identify all monkeys.

V.4.4.6. Behavioral Studies: NA

V.4.4.7. Other Procedures : NA

V.4.4.8. Tissue Sharing : NA

V.4.5. Study Endpoint: The study endpoint is the last collection of blood at day 42. At the conclusion of this study, the primates will be released from the protocol and will be available for reassignment to other studies. No death or disability is anticipated as a result of participation in this study. If any animal dies while on study, the carcass will be double wrapped in plastic bags, placed in the refrigerator in the necropsy room, and the veterinary pathologist will conduct a complete gross and histopathological examination to identify any study related pathology in accordance with VM SOP P-NE-01-00, Nonhuman Primate Necropsy Procedures.

V.4.6. Euthanasia: There is no requirement or expectation of euthanasia. However, if an animal becomes critically ill or comatose, it may, at the discretion of the attending veterinarian, be euthanized. Euthanasia will be in accordance with SOP L-GP-02-00, Small Mammal Euthanasia.

V.5. Veterinary Care

V.5.1. Husbandry Considerations: Animals will be cared for IAW Department of Veterinary Medicine SOPs. Monkeys are housed individually in standard squeeze-type stainless steel cages at a minimum floor space of 4.4 square foot IAW DVM SOP L-NP-03-00, Maximum Cage Capacity for Nonhuman Primates. The care and maintenance of

macaques as described in approved Department of Veterinary Medicine SOPs will be strictly adhered to. Cages are cleaned daily and sanitized biweekly. Monkeys are fed complete, commercially prepared monkey chow twice daily and mixed fresh vegetables and fruit at least four times per week. Chlorinated water is provided ad libitum via automatic watering valves. Animal activity, feed consumption, and other clinical signs will be observed and recorded IAW DVM SOP L-GP-05-00, Monitoring of Animal Health

V.5.1.1. Study Room: Non-human primates on study will be housed in individual cages in one room located in Wing C at Building 5, USAMC-AFRIMS.

V.5.1.2. Special Husbandry Provisions: Monkeys will be individually housed to avoid possible injury due to fighting, which may alter the immune response.

V.5.1.3. Exceptions: None

V.5.2. Veterinary Medical Care

V.5.2.1. Routine Veterinary Medical Care: Veterinary care is provided IAW Department of Veterinary Medicine SOPs. AALAS certified animal technicians or veterinary technicians will observe animals a minimum of three times daily and will notify a veterinarian if problems are noted. Critical conditions from vaccine reactions are not expected to develop. Any illness or injury will be documented on the daily clinical score sheet VET-GP-008-F5 and will be reported to the attending veterinarian and the PI for consultation prior to treatment unless it is an emergency. Illness or injury will be treated by the veterinarian-on-duty or by veterinary technicians under guidance and supervision of a veterinarian. Quantities of feed consumed, activity, and other clinical signs are recorded on VM Form A79.

V.5.2.2. Emergency Veterinary Medical Care: All emergency and after hours clinical care will be provided by veterinary and technical staff in the Department of Veterinary Medicine, USAMC-AFRIMS.

V.5.3. Environmental Enrichment :

V.5.3.1. Enrichment Strategy: Enrichment Program will be conducted IAW Department of Veterinary Medicine VM SOP L-NP-05 (Enrichment Program of Non-human Primates).

V.5.3.2. Enrichment Restriction : NA

VI. STUDY PERSONNEL QUALIFICATIONS AND TRAINING

VI.1. Principal Investigators

| NAME | QUALIFICATION | ANIMAL CARE AND USE TRAINING | PROCEDURES |
|---|--|---|--|
| Sathit Pichyangkul | Dr. Pichyangkul, Director of Immunology and Vaccinology Program will be supervising overall research activity at AFRIMS. He will not handle or perform any animal handling and procedure | IACUC training 2005, NHP training 2001. | Ph.D. >20 years experience in the field, > 45 publications related to immunology and vaccinology |
| Arunee Thitithanyanont Garnpimol C Ritthidej Rangsini Mahanonda | | | Will not perform any hand-on animal procedures |
| Rawiwan Im-erbsin | Dr. Rawiwan will be supervising all veterinary care and manipulation of monkeys and sample collection. | The Humane Care and Use of Laboratory Animal in March 09. | DVM., certified LAT with 5 years of experience working with non-human primates (vaccines and drugs). She will be a primary veterinarian who monitors clinical signs and provides veterinary treatment as needed to the |

| | | | |
|--|--|--|--|
| | | | studied animal in consultation with the PI and attending veterinarian. |
|--|--|--|--|

VI.2. Technicians: Qualified personnel (veterinarians and technicians) provide husbandry and veterinary care or monitoring for the non-human primates in this study. All basic procedures are performed by experienced veterinary technicians under the supervision of Dr. Hinds (Attending Veterinarian), Dr. Rawiwan. Several technicians are certified at the technologist, technician, and assistant laboratory animal technician levels of the American Association for Laboratory Animal Science (AALAS). The DVM personnel received training on humane care and use of laboratory animals in March 2009. The DVM also proceeds 1-4 hours of training/week including SOPs, occupation health and safety, personnel hygiene, zoonotic diseases and laboratory animal sciences. Personnel training records are available in the DVM archive.

| NAME | QUALIFICATION | ANIMAL CARE AND USE TRAINING | PROCEDURES |
|--------------------|--|---|--|
| Srawuth Komchareon | He will supervise all animal technicians providing husbandry for all monkeys, maintain monkey database, assists Dr. Rawiwan to schedule the study plan, and assist in entering and verifying data. | The Humane Care and Use of Laboratory Animal in March 09. | BSc, MS, 7 years of experience, Certified AALAS Laboratory Animal Technologist |
| Arvuth Kaewsupo | Perform animal observations and common animal procedure such as ketamine anesthesia and blood collection. | The Humane Care and Use of Laboratory Animal in March 09. | Certified AALAS Laboratory Animal Technician, 37 years of experience |
| Phongsak Maneerat | Perform animal observations and common animal procedure such as ketamine anesthesia and blood collection. | The Humane Care and Use of Laboratory Animal in March 09. | Certified AALAS Assistant Laboratory Animal Technician, 32 years of experience |

| | | | |
|----------------------------|---|---|--|
| Mana Saithasao | Perform animal observations and common animal procedure such as ketamine anesthesia and blood collection. | The Humane Care and Use of Laboratory Animal in March 09. | BSc, Certified AALAS Laboratory Animal Technologist, 6 years of experience |
| Alongkorn Hanrujirakomjoen | Perform animal observations and common animal procedure such as ketamine anesthesia and blood collection. | The Humane Care and Use of Laboratory Animal in March 09. | BSc, Certified AALAS Laboratory Animal Technician, 4 years of experience |
| Thonglor Detkokao | Perform animal care, handling, observations and common animal procedure such as ketamine anesthesia and blood collection. | The Humane Care and Use of Laboratory Animal in March 09. | Certified AALAS Assistant Laboratory Animal Technician, 14 years of experience |
| Suvit Boonkali | Perform animal care, handling, observations and common animal procedure such as ketamine anesthesia and blood collection. | The Humane Care and Use of Laboratory Animal in March 09. | Certified AALAS Assistant Laboratory Animal Technician, 20 years of experience |
| Samruay Jecksang | Perform animal care, handling, observations and common animal procedure such as ketamine anesthesia and blood collection. | The Humane Care and Use of Laboratory Animal in March 09. | Certified AALAS Laboratory Animal Technician, 10 years of experience |
| Vittavat Sankalee | Perform animal care, handling, observations and common animal procedure such as ketamine anesthesia and blood collection. | The Humane Care and Use of Laboratory Animal in March 09. | Certified AALAS Laboratory Animal Technologist, 6 years of experience |
| Yongyut Kongkaew | Perform animal care, handling, observations and common animal procedure such as ketamine anesthesia. | The Humane Care and Use of Laboratory Animal in March 09. | BSc, Certified AALAS Assistant Laboratory Animal Technician, 6 years of experience |
| Surayuth Seegaewin | Perform animal care, handling, observations and common animal procedure such as ketamine anesthesia. | The Humane Care and Use of Laboratory Animal in March 09. | Certified AALAS Assistant Laboratory Animal Technician, 7 years of experience |
| Sakda Sanon | Perform animal care, handling, observations and common animal procedure such as ketamine anesthesia. | The Humane Care and Use of Laboratory Animal in March 09. | BSc, Certified AALAS Assistant Laboratory Animal Technician, 3 years of experience |

| | | | |
|-----------------------|--|---|--|
| Sonchai Jansuwan | Perform animal care, handling, observations and common animal procedure such as ketamine anesthesia. | The Humane Care and Use of Laboratory Animal in March 09. | BSc, Certified AALAS Assistant Laboratory Animal Technician, 3 years of experience |
| Amnart Andaeng | Perform animal handling | The Humane Care and Use of Laboratory Animal in March 09. | BSc, 4 years of experience |
| Chaisit Pornkhunviwat | Perform animal handling | The Humane Care and Use of Laboratory Animal in March 09 | BSc, 2 years of experience |

VII. BIOHAZARD/SAFETY: Only assigned DVM personnel can enter the animal rooms unaccompanied. Appropriate personal protective equipment including disposable lab coats, head-covers, N-95 dust-mist respirators, safety eyewear, gloves, and boots are routinely worn before entering the animal rooms and at all times when providing care and handling of animals (DVM SOP L-GP-16-00, L-NP-15-00, Personal Protective Equipment and Safe Nonhuman Primate) Handling). All laboratory personnel will always wear PPE and must practice all safety measures in laboratories following SOP numbers CMD-LS-000-00 (Biosafety in Laboratory), CMD-LS-003-00 (Bloodborn Pathogen Exposure Control Plan), and AFRIMS Safety and Occupational Health policy 07-04. After completion the study, all vaccines will be destroyed by autoclave or incineration. Animal Biosafety Level-2 Procedures will be followed when bleeding or handling monkey specimens. All non-human primates should be considered to be potentially herpes B virus-positive and appropriate caution exercised while inoculating, bleeding, and handling non-human primate blood and sera. All personnel who handle rhesus monkeys and their blood samples were trained and advised of the potential hazards associated with rhesus monkeys in March 2009. They follow safety handling techniques and precautions required to prevent herpes B virus exposure. Animal bites and injuries are handled in accordance with DVM SOP AOH-02-00, Animal Bites and Other Injuries. Biohazard waste containers for sharps shall be kept in all study rooms and treatment areas, for disposal of needles, syringes, etc. Sharp containers from monkey procedures are appropriately incinerated according to DVM SOP AWM-01-00, Biohazard Waste and Sharps Management.

VIII. ENCLOSURES:

A. Appendix I:

References

1. Thacker SB, *Epidemiol Rev* 1986, 8:129
2. Shope RE, *J. Exp. Med.* 1931, 54:373
3. Gallaher WR, 2009, *Virology* 400:51
4. Effros RB, Doherty PC, 1977 *J. Exp Med* 3:557
5. Yewdell JW, 1985, *PNAS* 82:1785
6. Itoh Y, 2009, *Nature* 460:1021
7. Leroux-Roels I *Lancet* 2007 370:580.

B. Appendix II: Schedule of Events:

IX. ASSURANCES: The law specifically requires several written assurances from the Principal Investigator. Please read and sign the assurances as indicated.

As the Principal Investigator on this protocol, I acknowledge my responsibilities and provide assurances for the following:

A. Animal Use: The animals authorized for use in this protocol will be used only in the activities and in the manner described herein, unless a modification is specifically approved by the IACUC prior to its implementation.

B. Duplication of Effort: I have made every effort to ensure that this protocol is not an unnecessary duplication of previous experiments.

C. Statistical Assurance: I assure that I have consulted with a qualified individual who evaluated the experimental design with respect to the statistical analysis, and that the minimum number of animals needed for scientific validity will be used.

D. Biohazard/Safety: I have taken into consideration and made the proper coordinations regarding all applicable rules and regulations concerning radiation protection, biosafety, recombinant issues, and so forth, in the preparation of this protocol.

E. Training: I verify that the personnel performing the animal procedures/manipulations/observations described in this protocol are technically competent and have been properly trained to ensure that no unnecessary pain or distress will be caused to the animals as a result of the procedures/manipulations.

F. Responsibility: I acknowledge the inherent moral, ethical and administrative obligations associated with the performance of this animal use protocol, and I assure that all individuals associated with this project will demonstrate a concern for the health, comfort, welfare, and well-being of the research animals. Additionally, I pledge to conduct this study in the spirit of the fourth "R," namely "Responsibility," which the DOD has embraced for implementing animal use alternatives where feasible and conducting humane and lawful research.

G. Scientific Review: This proposed animal use protocol has received appropriate peer scientific review and is consistent with good scientific research practice.

H. Painful Procedures: (A signature for this assurance is required by the Principal Investigator if the research being conducted has the potential to cause more than momentary or slight pain or distress even if an anesthetic or analgesic is used to relieve the pain and/or distress.)

I am conducting biomedical experiments, which may potentially cause more than momentary or slight pain or distress to animals. This potential pain and/or distress WILL or WILL NOT (circle one or both, if applicable) be relieved with the use of anesthetics, analgesics, and/or tranquilizers. I have considered alternatives to such procedures; however, I have determined that alternative procedures are not available to accomplish the objectives of this proposed experiment.

Sathit Pichyangkul

(PRINT) First Name, MI, Last Name of Principal Investigator

Signature

Date (YYYYMMDD)