ผลของตัวแปรในกระบวนการต่อการดูดซับของ ดีทีพี-เจ อี แอนติเจน บนแอดจูแวนท์

นางสาว สุปราณี ประดับพงษา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชอุตสาหกรรม ภาควิชาเภสัชอุตสาหกรรม
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549

ISBN 974-14-2970-3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECT OF PROCESSING VARIABLES ON ADSORPTION OF DTP-JE ANTIGENS ON ADJUVANT

Miss Supranee pradubpongsa

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy Program in Industrial Pharmacy
Department of Manufacturing Pharmacy
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2006

ISBN 974-14-2970-3

Copyright of Chulalongkorn University

492145

Thesis Title	EFFECT OF PROCESSING VARIABLES ON ADSORPTION OF DTP-JE ANTIGENS ON ADJUVANT
By	Miss Supranee Pradubpongsa
Field of Study	Industrial Pharmacy
Thesis Advisor	Professor Garnpimol C. Ritthidej, Ph. D.
Thesis Co-advisor	Associate Professor Vimolmas Lipipun, Ph. D.

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

Pornpen Pramyothin ..... Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences

(Associate Professor Pornpen Pramyothin, Ph. D.)

THESIS COMMITTEE

P. Kulvanich ..... Chairman

(Associate Professor Poj Kulvanich, Ph. D.)

Garnpimol C. Ritthidej ..... Thesis Advisor

(Professor Garnpimol C. Ritthidej, Ph. D.)

Vimolmas Lipipun ..... Thesis Co-advisor

(Associate Professor Vimolmas Lipipun, Ph. D.)

N. Sutanthavibul ..... Member

(Narueporn Sutanthavibul, Ph. D.)

S. Thirapakpoomanunt ..... Member

(Sit Thirapakpoomanunt, M. Sc.)

สุปราณี ประดับพงษา : ผลของตัวแปรในกระบวนการต่อการดูดซับของ ดีทีพี-เจอี แอนติเจน บนแอดจูแวนท์ (EFFECT OF PROCESSING VARIABLES ON ADSORPTION OF DTP-JE ANTIGENS ON ADJUVANT) อ.ที่ปรึกษา: ศ. ดร. กาญจน์พิมล ฤทธิเดช, อ.ที่ปรึกษาร่วม: รศ. ดร. วิมลมาศ ลิปิพันธ์, 126 หน้า. ISBN 974-14-2970-3.

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวัคซีนรวมชนิดใหม่ อลูมิเนียมไฮดรอกไซด์เจลความเข้มข้นร้อยละ 1.67 ของน้ำหนักโดยปริมาตร ที่พีเอช 6.5 ดูดซับด้วยดิบทีเรียทอกซอยด์ เตตานัสทอกซอยด์ หรือเจอี แอนติเจนที่ตัวแปรในกระบวนการผลิตต่างกัน คือ อุณหภูมิ 5, 15, 25และ 37 องศาเซลเซียส, ความเร็วในการปั่นผสม 200, 300, 400 และ500 รอบต่อนาที และระยะเวลาในการปั่นผสมนาน 1, 5, 12 และ24 ชั่วโมง พบว่าค่าร้อยละของการดูดซับที่ดีที่สุดของแอนติเจนแต่ละชนิดบนอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์เกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ความเร็วในการปั่นผสมเท่ากับ 400 รอบต่อนาที และระยะเวลาในการปั่นผสมนาน 5 ชั่วโมง ทำการหาค่าปริมาณแอนติเจนของสูตรตำรับรวม และความคงตัวทางกายภาพหลังจากเก็บที่สภาวะอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 เดือน โดยปริมาณแอนติเจนของสูตรตำรับรวมซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธีอีไลซ่าแสดงให้เห็นว่าปริมาณดิบทีเรีย เปอร์ทุสซิส และเจอี แอนติเจนจากสูตรที่เตรียมโดยวิธีแยกดูดซับสารแต่ละชนิดมีมากกว่าสูตรที่เตรียมโดยวิธีการแย่งการดูดซับ แต่ปริมาณเตตานัสที่เตรียมโดยวิธีการแย่งการดูดซับมีมากกว่าสูตรที่เตรียมโดยวิธีแยกดูดซับสารแต่ละชนิด วิธีการเตรียมมีผลต่อปริมาณของดิบทีเรียและเจอี แอนติเจนแต่ไม่มีผลต่อปริมาณของเตตานัส และเปอร์ทุสซิส ลักษณะรูปร่างของอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ที่ถูกดูดซับด้วยวิธีการเตรียมทั้งสองวิธีสามารถดูได้ด้วยวิธีเอสอีเอ็ม พบว่าเป็นอนุภาคทรงกลมที่ซับซ้อน และมีชิ้นส่วนขนาดเล็กซึ่งน่าจะเป็นแอนติเจนติดอยู่ที่พื้นผิวของอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ ภายหลังการเก็บนาน 4 เดือน พบว่าขนาดอนุภาคลดลงเนื่องจากโครงสร้างของอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ถูกทำลาย ขณะที่พีคหลักของการวิเคราะห์โดยเทคนิคอินฟาเรดสเปกโทรสโกปี และเอกซเรย์ดิฟแฟรกโทเมทรีของอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ที่ถูกดูดซับแล้วยังคงปรากฏอยู่ แสดงว่าการดูดซับด้วยวิธีการเตรียมทั้งสองวิธีไม่ทำให้ลักษณะโครงสร้างหลักของอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์เปลี่ยนแปลง

ภาควิชา เภสัชอุตสาหกรรม ลายมือชื่อนิสิต สุปราณี ประดับพงษา

สาขาวิชา เภสัชอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2549 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

##4676601433 MAJOR: MANUFACTURING PHARMACY
KEYWORD: DIPHTHERIA / TETANUS / PERTUSSIS / JE / ADJUVANT / ADSORPTION

SUPRANEE PRADUBPONGSA: EFFECT OF PROCESSING VARIABLES ON ADSORPTION OF DTP-JE ANTIGENS ON ADJUVANT. THESIS ADVISOR: PROF. GARNPIMOL C. RITTHIDEJ, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. VIMOLMAS LIPIPUN, Ph. D., 126 pp. ISBN 974-14-2970-3.

The purpose of this study was to develop a new combined vaccine. Aluminium hydroxide gel (AH) at fixed concentration of 1.67%w/v, pH 6.5 was individually adsorbed with diphtheria toxoid (DT), tetanus toxoid (TT) or JE antigen at various processing variables: temperature 5, 15, 25 and 37 °C; mixing speed 200, 300, 400 and 500 rpm; mixing time 1, 5, 12 and 24 hours. It indicated that the optimal percentage of adsorption of each antigen on AH was at temperature 5 °C; mixing speed 400 rpm; mixing time 5 hours. The antigen contents and physical stability of combined preparations were evaluated after storage at 2-8 °C for 4 months. The antigen contents of combined preparations analyzed by ELISA showed more DT, PT and JE content from formulation of separate adsorption than that of competitive method but more TT content from formulation of competitive adsorption than that of separate method. Adsorption process affected the antigen content of DT and JE but did not affect TT and PT content. Morphology of adsorbed AH by two adsorption processes by SEM showed spherical complex particle and had small fragments likely to be antigens attached on the surface of AH. After storage for 4 months, the particle sizes were decreased because the structure of AH was broken while the principle peaks of adsorbed AH demonstrated by IR spectra and X-ray diffractograms probably appeared which indicated that the two adsorption processes had no effect on their chemical structures.

Department Manufacturing Pharmacy Student's Signature Supranee Pradubpongsa.
Field of Study Industrial Pharmacy Advisor's Signature Garnpimol C. Ritthidej
Academic Year 2006 Co-advisor's Signature Vimolmas Lipipun

ACKNOWLEDGEMENTS

First, and foremost, I would like to express my sincere gratitude to my thesis advisor, Professor Garnpimol C. Ritthidej, Ph.D. for not only her invaluable advice, guidance, encouragement, hearten and understanding throughout my investigation but also her kindness and cheerfulness that make me feel deeply appreciated.

I am also indebted to Associate Professor Vimolmas Lipipun, Ph. D., my co-advisor, for her kind assistance, helpful consultation and everlasting support.

I wish to express appreciation to Associate Professor Poj Kulvanich, Ph.D., Narueporn Sutanthavibul, Ph. D. and Sit Thirapakpoomanunt, M. Sc. to as members of thesis committee for their valuable suggestion and comments.

Special thanks are deeply appreciated to Bacteria division, Biological product department, GPO for the supplied diphtheria toxoid, tetanus toxoid, *Bordetella pertussis*; JE division, Biological product department, GPO for the supplied JE antigen and ELISA reagent; Bureau of Veterinary Biologic, Department of Livestock Development for the supplied aluminium hydroxide adjuvant.

The other special thanks were expressed to all staffs of Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University; especially the staffs of the Department of Manufacturing Pharmacy and other people whose names have not mentioned for their assistance and encouragement firmly deserve acknowledgements.

Ultimately, I would like to express my infinite thanks and deepest gratitude to my family especially my parents for their endless love, care, understanding, encouragement, and support throughout these past years.

Finally, I wish to thank other persons whose names have not been mentioned here for their assistance and encouragement.

CONTENTS

PAGE

THAI ABSTRACT iv
ENGLISH ABSTRACT v
ACKNOWLEDGEMENTS vi
CONTENTS vii
LIST OF TABLES ix
LIST OF FIGURES xi
ABBREVIATIONS xiii
CHAPTER
I INTRODUCTION 1
II LITERATURE REVIEW 4
I Diphtheria 4
II Tetanus 8
III Pertussis 12
IV Japanese Encephalitis 16
V Immunization program 23
VI Adjuvants 24
VII Combination vaccines 40
VIII Adsorption process for combined vaccines 42
IX Immunoassay 49
III EXPERIMENTAL 57
Materials 57
Instruments 59
Method 60
1. Aluminium content assay 60
2. Preparation of aluminium containing adjuvant stock solutions 60
3. Adsorptive capacity of single antigen on adjuvant 61
4. Adsorption of single antigen on adjuvant at various processing variables 64

5. Adsorption of combined antigens on adjuvant 65
6. Stability study 69
7. Evaluation of materials and preparations 70
8. Statistical analysis 71
IV RESULTS AND DISCUSSION.....72
1. Aluminium content assay 72
2. Adsorptive capacity of single antigen on adjuvant 72
3. Adsorption of single antigen on adjuvant at various processing variables 75
4. Stability studies of combined preparations 89
V CONCLUSIONS..... 105
REFERENCES..... 107
APPENDICES.....113
APPENDIX A.....114
APPENDIX B.....115
APPENDIX C.....118
APPENDIX D.....122
VITA.....126

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Japanese Encephalitis vaccines	21
2	Immunization program	23
3	Some desirable general properties of adjuvants	25
4	Mode of adjuvant action	27
5	The characteristics of an ideal vaccine adjuvant	29
6	Characteristics of particulate adjuvants	30
7	Characteristics of principal non-particulate adjuvants	31
8	Further non-particulate adjuvants	32
9	Aluminium content of licensed vaccines	39
10	The composition of DT adsorbed preparation	62
11	The composition of TT adsorbed preparation	62
12	The composition of JE adsorbed preparation	63
13	The percentage of adsorption of each antigen on adjuvant at various processing variables	78
14	The content of antigens in adsorbed preparations during storage at 2-8 °C for 4 months	90
15	Parrticle sizes of AH and combined preparations at initial and after 4-months storage at 2-8 °C determined by laser diffractrometry	104
16	The percentage of aluminium content in aluminium hydroxide gel	114
17	The calculation of concentration unit between µg/ml with Lf/ml or antigen unit/ml of diphtheria toxoid, tetanus toxoid and JE antigen	115
18	Adsorption of diphtheria toxoid on aluminium hydroxide	116
19	Adsorption of tetanus toxoid on aluminium hydroxide	116
20	Adsorption of JE antigen on aluminium hydroxide	117
21	Statistical test for the percentage of adsorption of antigens on aluminium hydroxide adjuvant at various temperatures	122

Table		Page
22	Statistical test for the percentage of adsorption of antigens on aluminium hydroxide adjuvant at various mixing speed	122
23	Statistical test for the percentage of adsorption of antigens on aluminium hydroxide adjuvant at various mixing time	123
24	Statistical test for particle size distribution (LD) of AH and combined preparations at initial and after 4-months storage at 2-8 °C	123
25	Statistical test for the antigen contents among C and S	124
26	Statistical test for the antigen contents among initial, 1 month, 2 months, 3 months and 4 months	125

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	Diagrammatic representation of the pertussis toxin	14
2	Morphology of flaviviruses cell membrane	18
3	Transmission cycle of Japanese encephalitis (JE) virus	19
4	Schematic representation of the three different principle strategies for the production of combined adsorbed vaccines	48
5	Sandwich ELISA	56
6	Competition ELISA	56
7	Adsorption isotherm of diphtheria toxoid on aluminium hydroxide	73
8	Adsorption isotherm of tetanus toxoid on aluminium hydroxide	73
9	Adsorption isotherm of JE antigen on aluminium hydroxide	74
10	The percentage of adsorption of diphtheria toxoid onto aluminium hydroxide at various temperature, various mixing time and (A) 200 rpm (B) 300 rpm (C) 400 rpm (D) 500 rpm	82
11	The percentage of adsorption of tetanus toxoid onto aluminium hydroxide at various temperature, various mixing time and (A) 200 rpm (B) 300 rpm (C) 400 rpm (D) 500 rpm	84
12	The percentage of adsorption of JE antigen onto aluminium hydroxide at various temperature, various mixing time and (A) 200 rpm (B) 300 rpm (C) 400 rpm (D) 500 rpm	86
13	The contents of diphtheria toxoid in combined formulations by different adsorption process during storage periods at 2-8 °C	91
14	The contents of tetanus toxoid in combined formulations by different adsorption process during storage periods at 2-8 °C	91
15	The contents of *Bordetella pertussis* in combined formulations by different adsorption process during storage periods at 2-8 °C	92
16	The contents of JE antigen in combined formulations by different adsorption process during storage periods at 2-8 °C	92

Figure **Page**

17 The antigen contents of combined formulation (C) during storage periods at 2-8 °C 95

18 The antigen contents of combined formulation (S) during storage periods at 2-8 °C.....95

19 SEM photomicrographs of (A) AH (1,000x), (B) AH (15,000x), (C) competitive adsorption (1,000x), (D) competitive adsorption (15,000x), (E) separate adsorption (1,000x) and (F) separate adsorption (15,000x): At initial time.....97

20 SEM photomicrographs of (A) AH (1,000x), (B) AH (15,000x), (C) competitive adsorption (1,000x), (D) competitive adsorption (15,000x), (E) separate adsorption (1,000x) and (F) separate adsorption (15,000x): At 4-months storage time 98

21 FT-IR spectra of aluminium hydroxide and combined preparations by competitive adsorption process and separate adsorption process at initial (t0) and 4-month storage time (t4).....100

22 X-ray diffractograms of aluminium hydroxide and combined preparations by competitive adsorption process and separate adsorption process at initial and 4-month storage time 103

23 Particle sizes of AH and combined preparations at initial (t0) and after 4 months storage (t4) at 2-8 °C determined by laser diffractrometry.....104

24 Standard curve of the optimal condition of diphtheria toxoid.....120

25 Standard curve of the optimal condition of tetanus toxoid 120

26 Standard curve of the optimal condition of *Bordetella pertussis* 121

ABBREVIATIONS

%	percentage
° C	degree Celsius (centrigrade)
µl	microlitre(s)
Ab	antibody
Ag	antigen
AH	aluminium hydroxide adjuvant
a.u.	antigen unit
BCA	bicinchoninic acid
BP	British Pharmacopoeia
BSA	bovine serum albumin
DT	Diphtheria toxoid
DT-AH	diphtheria toxoid adsorbed on aluminium hydroxide adjuvant
DTaP	diphtheria, tetanus and acellular pertussis
DTwP	diphtheria, tetanus and whole ceil pertussis
e.g.	for example, exempli gratia
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
et.al.	et alli, and others
FT-IR	fourier transform infrared
g	gram(s)
HRP	horseradish peroxidase conjugate
ICP	inductively coupled plasma spectrometry
IgG	Immunoglobulin G
JE	Japanese Encephalitis antigen
JE-AH	JE antigen adsorbed on aluminium hydroxide adjuvant
L	litre(s)
Lf	limit of flocculation
mg	milligram(s)
ml	millilitre(s)
MW	molecular weight

N	normality
O.U.	opacity units
o/w	oil in water
OPD	O-Phenylenediamine
pH	the negative logarithm of the dissolution constant
pI	isoelectric point
PI	polydisperse index
PT	*Bordetella pertussis* antigen
XRD	X-ray diffractrometry
rpm	round per minute
SEM	scanning electron microscope
TT	Tetanus toxoid
TT-AH	tetanus toxoid adsorbed on aluminium hydroxide adjuvant
USP	The United State Pharmacopoeia
UV	ultraviolet
v/v	volume by volume
w/o	water in oil
w/v	weight by volume