

ไมโครเอนแคปซูลเลชันแอนติเจนไข่สมองอักเสบเจอี
ด้วยโพลิเมอร์ชนิดกร่อนสลาย เพื่อการนำส่งวัคซีน



นางสาว ปาริชาติ ชมโท

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชกรรม

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-03-0630-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MICROENCAPSULATION OF JAPANESE ENCEPHALITIS ANTIGEN
IN BIODEGRADABLE POLYMERS FOR VACCINE DELIVERY

Miss Parichat Chomto

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy in Pharmaceutics

Faculty of Pharmaceutical Sciences

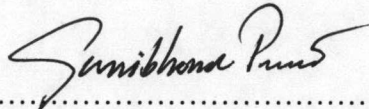
Chulalongkorn University

Academic year 2001


ISBN 974-03-0630-6

Thesis Title Microencapsulation of Japanese Encephalitis Antigen in
 Biodegradable Polymers for Vaccine Delivery
By Miss Parichat Chomto
Field of Study Pharmaceutics
Thesis Advisor Associate Professor Garnpimol C. Ritthidej, Ph.D.
Thesis Co-Advisor Associate Professor Vimolmas Lipipun, Ph.D.

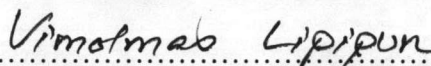
Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University
in Partial fulfillment of the Requirements for the Doctor's Degree

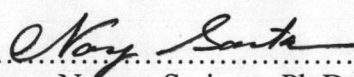

.....Dean of Faculty of Pharmaceutical Sciences
(Associate Professor Sunibhond Pummangura, Ph.D.)

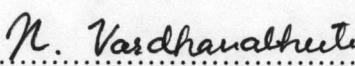
Thesis Committee

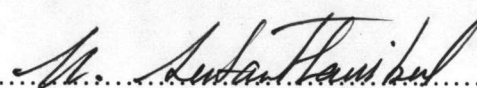

.....Chairman
(Associate Professor Poj Kulvanich, Ph.D.)


.....Thesis Advisor
(Associate Professor Garnpimol C. Ritthidej, Ph.D.)


.....Thesis Co-Advisor
(Associate Professor Vimolmas Lipipun, Ph.D.)


.....Member
(Professor Narong Sarisuta, Ph.D.)


.....Member
(Nontima Vardhanabhuti, Ph.D.)


.....Member
(Narueporn Sutanthavibul, Ph.D.)

ปาริชาติ ชมโท : ไมโครเอนแคปซูลเอชเอ็นแอนติเจนไข่สมองอักเสบเจอีด้วยโพลิเมอร์ชนิด
กร่อนสลาย เพื่อการนำส่งวัคซีน (MICROENCAPSULATION OF JAPANESE
ENCEPHALITIS ANTIGEN IN BIODEGRADABLE POLYMERS FOR VACCINE
DELIVERY) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร. กาญจน์พิมล ฤทธิเดช อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร. วิมลมาศ
ลิปิพันธ์, 420 หน้า. ISBN 974-03-0630-6

แอนติเจนไข่สมองอักเสบ บรรจุในโพลิแลคไทด์โคไกลโกลไลด์ ด้วยวิธีระเหยสารทำละลายของ
พหุอิมัลชันและในโคโคแซนด้วยวิธีเกิดเจลจากการเติมออลอนในอิมัลชัน อัตราส่วนของโคพอลิเมอร์ที่ใช้ได้
แก่ PLGA 50:50, PLGA 75:25, PLGA 85:15, DL-PLA และโคโคแซนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน ได้แก่
LMW, MMW, HMW ทำการประเมินคุณสมบัติทางกายภาพและความคงตัวของจุลอนุภาคและแอนติเจนใน
จุลอนุภาค ผลจากการส่องกล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกราด การส่องกล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกราดบนตัวอย่าง
ที่ทำให้เยือกแข็ง และการวิเคราะห์ขนาดอนุภาคด้วยแสงเลเซอร์ปรากฏว่าจุลอนุภาคส่วนใหญ่มีลักษณะแยก
จากกัน กลมและผิวเรียบ ขนาดจะต่าง ๆ กันตั้งแต่ < 1 ถึง 100 ไมครอน ขึ้นกับชนิดและความเข้มข้นของพอลิ
เมอร์ จำนวนของแอนติเจนที่ใช้ และความเร็วของเครื่องปั่นสำหรับจุลอนุภาค PLGA หรืออัตราส่วนของวัต
ภาคน้ำต่อน้ำมันสำหรับจุลอนุภาคโคโคแซน ประสิทธิภาพการหุ้มโปรตีนวัดจากวิธี bicinchoninic acid จะ
อยู่ในช่วง 40-70% ในขณะที่ปริมาณแอนติเจนในจุลอนุภาคจะอยู่ในช่วง 0.2-0.4% แอนติเจนที่ปลดปล่อยใน
phosphate buffer saline pH 7.4 จะขึ้นกับขนาดของจุลอนุภาค อย่างไรก็ตามการสลายของพอลิเมอร์ วัดจาก
วิธี gel permeation chromatography จะมีผลอย่างเด่นชัดต่อการปลดปล่อยด้วย อัตราการปลดปล่อยจะเรียง
ลำดับ PLGA 50:50 > PLGA 75:25 > PLGA 85:15 > DL-PLA สำหรับจุลอนุภาค PLGA ขึ้นกับความชอบน้ำ
ของโคพอลิเมอร์ และ LMW > MMW > HMW สำหรับจุลอนุภาคโคโคแซนขึ้นกับความหนืด กระบวนการ
เตรียมไม่เปลี่ยนแปลงส่วนที่มีผลต่อการกระตุ้นของแอนติเจน นอกจากนี้จุลอนุภาคมีความคงตัวเป็นที่พอใจ
เมื่อเก็บที่ 40 ° ซ เป็นเวลา 1 เดือน การตอบสนองของภูมิคุ้มกันแสดงจากระดับแอนติบอดีซึ่งวัดด้วยวิธี
enzyme-linked immunosorbent assay หลังฉีดจุลอนุภาคที่คัดเลือกแล้วเข้าได้ผิวหนังของกระต่ายเปรียบเทียบกับ
วัคซีนของเหลว ทั้งจุลอนุภาค PLGA และโคโคแซนสามารถเพิ่มระดับแอนติบอดีและยืดเวลาการตอบ
สนองของภูมิคุ้มกัน ผลจากจุลอนุภาค PLGA จะเด่นชัดกว่าจุลอนุภาคโคโคแซนภายหลังการฉีดขนาด 150
ไมโครกรัม ครั้งเดียว อย่างไรก็ตามทั้งสองให้การตอบสนองน้อยกว่าวัคซีนของเหลวที่แนะนำให้ฉีดขนาด
50 ไมโครกรัม 3 ครั้ง

ภาควิชา เกษัตริศาสตร์

สาขาวิชา เกษัตริกรรม

ปีการศึกษา 2544

ลายมือชื่อนิติ..... ปาริชาติ ชมโท

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... วิมลมาศ ลิปิพันธ์

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... วิมลมาศ ลิปิพันธ์

3971039933 : MAJOR PHARMACEUTICS

KEY WORD : MICROENCAPSULATION/JAPANESE ENCEPHALITIS/ANTIGEN/
BIODEGRADABLE POLYMERS/VACCINE

PARICHAT CHOMTO : MICROENCAPSULATION OF JAPANESE
ENCEPHALITIS ANTIGEN IN BIODEGRADABLE POLYMER FOR
VACCINE DELIVERY. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF.GARNPIMOL
C. RITTHIDEJ, Ph. D. THESIS CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. VIMOLMAS
LIPIPUN, Ph.D. 420 pp. ISBN 974-03-0630-6

Japanese Encephalitis (JE) antigen was encapsulated in poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) polymers by multiple emulsion solvent evaporation method and in chitosan by emulsion-ionic gelation method. Various ratio of the copolymers, PLGA 50:50, PLGA 75:25, PLGA 85:15, DL-PLA and different molecular weight of chitosan, LMW, MMW and HMW were used. The physical properties and stability of microparticles and antigen in microparticles were evaluated. Results from SEM, CRYO-SEM and laser particle size analyser revealed that most microparticles were discrete and spherical with smooth surface. They were of different size ranging from < 1 to $100 \mu\text{m}$, depending on the type and concentration of polymer, the amount of antigen used and the speed of sonicator for PLGA microparticles or ratio of aqueous : oil phase for chitosan microparticles. The antigen entrapment efficiency detected by bicinchoninic acid method was between 40-70 % while the antigen content in microparticles was between 0.2-0.4 %. The antigen release in phosphate buffer saline pH 7.4 was depended on the size of microparticle. However, the degradation of polymer detected by gel permeation chromatography exhibited prominent effect on the release. The release rate was ranked ; PLGA 50:50 > PLGA 75:25 > PLGA 85:15 > DL-PLA for PLGA microparticle due to hydrophilicity of the copolymer and LMW > MMW > HMW for chitosan microparticle due to their viscosity. Process of preparation did not alter the antigenic epitope of antigen. In addition the microparticle was satisfactorily stable after storage at 40°C for 1 month. Immune response expressed as antibody titer by enzyme-linked immunosorbent assay was determined after subcutaneous administration to rabbits of selected microparticles compared to fluid vaccine. Both PLGA and chitosan microparticles could augment antibody level and prolong immune response. Result from PLGA microparticles was more prominent than chitosan microparticles of the same $150 \mu\text{g}$ dose after single administration. However, both showed less response than fluid vaccine of recommended than $50 \mu\text{g}$ doses.

Department Manufacturing Pharmacy

Field of study Pharmaceutics

Academic year 2001

Student's signature.....

Advisor's signature.....

Co-advisor's signature.....

Parichat Chomto

Garnpimol C. Ritthidej

Vimolmas Lipipun

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere appreciation and gratitude to my thesis advisor, Associate Professor Dr. Garnpimol C. Ritthidej, Department of Manufacturing Pharmacy, and my thesis co-advisor, Associate Professor Dr. Vimolmas Lipipun, Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for their kindness, interest, helpful advice, guidance, excellent supervision and encouragement which enable me to carry out my thesis successfully.

I wish to express my grateful thanks to Mr. Tienchai Lakornraj, Biological Division, Government Pharmaceutical Organization for his assistance and helpful suggestion for this research.

My sincere gratitude is extended to Miss Tamsiri Wangtaveesab, National Metal and Materials Technology Center, National Science and Technology Development Agency for her assistance and suggestion in molecular weight evaluation using gel permeation chromatography.

A special appreciation is extended to Biological Division, Government Pharmaceutical Organization (GPO) for kindly supplying Japanese Encephalitis antigen for this research study.

I am indebted to the Ministry of University Affairs for granting partial financial support to fulfill this investigation.

Finally, I gratefully acknowledge to all instructors, classmates and personnels in Department of Manufacturing Pharmacy and Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for their assistances.

CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
LIST OF TABLES.....	viii
LIST OF FIGURES.....	xi
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xvi
CHAPTER	
I INTRODUCTION.....	1
II LITERATURE REVIEW.....	4
III EXPERIMENTAL.....	87
IV RESULTS.....	106
V DISCUSSION AND CONCLUSION.....	191
REFERENCES.....	209
APPENDICES.....	227
VITA.....	420

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Reported number of Japanese encephalitis cases (and deaths) in Asia.....	8
2	Some desirable general properties of adjuvants.....	14
3	Mode of adjuvant action.....	16
4	The characteristics of an ideal vaccine adjuvant.....	19
5	Characteristics of nonparticulate adjuvants.....	20
6	Characteristics of particulate adjuvants	20
7	The benefits of biodegradable microparticles for vaccine adjuvants.....	26
8	Principal monomer combinations for microencapsulation process by interfacial polymerization.....	42
9	Critical points of some common supercritical solvents.....	45
10	Physisal properties of gases, liquids and supercritical fluids.....	47
11	Examples of water soluble polymers used in drug delivery	59
12	Examples of biodegradable polymers used in drug delivery.....	59
13	Formulation of DL- PLA microparticles.....	91
14	Formulation of PLGA 85 : 15 microparticles.....	92
15	Formulation of PLGA 75 : 25 microparticles.....	93
16	Formulation of PLGA 50 : 50 microparticles	94
17	Formulation of LMW CS microparticles.....	96
18	Formulation of MMW CS microparticles.....	97
19	Formulation of HMW CS microparticles.....	98
20	Particle size of antigen-loaded PLGA microparticles.....	110
21	Antigen content and entrapment efficiency from DL-PLA microparticles.....	113

Table	Page
22	Antigen content and entrapment efficiency from PLGA 85:15 microparticles..... 114
23	Antigen content and entrapment efficiency from PLGA 75 : 25 microparticles..... 115
24	Antigen content and entrapment efficiency from PLGA 50 : 50 microparticles..... 116
25	Level of residual dichloromethane in PLGA microparticles..... 130
26	Molecular weight of PLGA polymers at different time of degradation... 132
27	Particle size of antigen-loaded chitosan microparticles..... 149
28	Antigen content and entrapment efficiency from chitosan microparticles..... 151
29	Molecular weight of chitosan polymers at different time of degradation..... 157
30	Particle size of antigen-loaded PLGA microparticles kept at 40°C for 1 month..... 162
31	Antigen content from DL-PLA microparticles kept at 40°C for 1 month..... 163
32	Antigen content from PLGA 85 : 15 microparticles kept at 40°C for 1 month..... 164
33	Antigen content from PLGA 75 : 25 microparticles kept at 40°C for 1 month..... 165
34	Antigen content from PLGA 50 : 50 microparticles kept at 40°C for 1 month..... 166
35	Particle size of antigen-loaded microparticles kept at 40°C for 1 month..182
36	Antigen content from chitosan microparticles kept at 40°C for 1 month..... 183

Table	Page
37	In vitro antigen release from PLGA microparticles..... 397
38	In vitro antigen release from PLGA microparticles kept at 40°C for 1 month..... 401
39	Correlation of zero-order, first-order and Higuchi model of in vitro antigen release profiles from PLGA microparticles..... 405
40	Correlation of zero-order, first-order and Higuchi model of in vitro antigen release profiles from PLGA microparticles kept at 40°C for 1 month..... 409
41	In vitro antigen release from chitosan microparticles..... 414
42	In vitro antigen release from chitosan microparticles kept at 40°C for 1 month..... 415
43	Correlation of zero-order, first-order and Higuchi model of in vitro antigen release profiles from chitosan microparticles..... 416
44	Correlation of zero-order, first-order and Higuchi model of in vitro antigen release profiles from chitosan microparticles kept at 40°C for 1 month..... 417
45	Antibody titre level determined by ELISA of antisera from rabbits immunized subcutaneously with fluid antigen , encapsulated antigen in PLGA and chitosan microparticles..... 418
46	Statistical analysis at the $p = 0.05$ level of antibody titre level augment after immunized subcutaneously with fluid antigen, encapsulated antigen in PLGA and chitosan microparticles..... 419

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	JE virus.....	5
2	Structure model of E protein.....	6
3	A schematic diagram of inactivated JE vaccine production.....	10
4	A simplified representation of immune response to a vaccine antigen.....	12
5	Typical structures of microparticles.....	28
6	Typical steps in a coacervation method of microencapsulation.....	33
7	A schematic diagram of microencapsulation process based on simple coacervation.....	34
8	A schematic diagram of microencapsulation process based on complex coacervation.....	35
9	Flow diagram of spray - drying microparticle manufacturing method..	37
10	A schematic diagram of microencapsulation process based on polymer - polymer incompatibility.....	39
11	A schematic representation of microencapsulation of a droplet by interfacial polymerization.....	41
12	A schematic representation of in situ polymerization.....	41
13	A schematic density - pressure phase diagram of a pure fluid.....	46
14	A typical schematic flow of RESS apparatus.....	46
15	A typical diagram of SAS apparatus.....	49
16	A schematic diagram of O/W emulsion microencapsulation technique.....	51
17	A schematic diagram of W/O/W multiple emulsion.....	55
18	Preparation of biodegradable hydrogels.....	62

Figure	Page
19	Synthesis, structure and biodegradation of PL/PG and copolymers.... 65
20	Structure of polycaprolactones..... 70
21	A schematic description of caprolactone polymerization..... 70
22	Structure of polyhydroxybutyrate..... 73
23	The mechanisms involve in molecular weight change of PHB..... 73
24	A shematic diagram of polyanhydride synthesis..... 80
25	Synthesis and hydrolysis of polyphosphazenes..... 80
26	Molecular structure of pseudopolyamino acids..... 80
27	Structure of natural polymers ; chitin and chitosan..... 81
28	Schematic diagram of production process of chitin and chitosan.... 82
29	SEM micrographs of unloaded and loaded PLGA microparticles.... 107
30	In vitro antigen release profiles of microparticles prepared with 1.5 % DL-PLA polymer in PBS pH 7.4..... 117
31	In vitro antigen release profiles of microparticles prepared with 3 % DL-PLA polymer in PBS pH 7.4..... 118
32	In vitro antigen release profiles of microparticles prepared with 5 % DL-PLA polymer in PBS pH 7.4..... 119
33	In vitro antigen release profiles of microparticles prepared with 1.5 % PLGA 85:15 polymer in PBS pH 7.4..... 120
34	In vitro antigen release profiles of microparticles prepared with 3 % PLGA 85:15 polymer in PBS pH 7.4..... 121
35	In vitro antigen release profiles of microparticles prepared with 5 % PLGA 85:15 polymer in PBS pH 7.4..... 122
36	In vitro antigen release profiles of microparticles prepared with 1.5 % PLGA 75:25 polymer in PBS pH 7.4..... 123

Figure	Page
37	In vitro antigen release profiles of microparticles prepared with 3 % PLGA 75:25 polymer in PBS pH 7.4..... 124
38	In vitro antigen release profiles of microparticles prepared with 5 % PLGA 75:25 polymer in PBS pH 7.4..... 125
39	In vitro antigen release profiles of microparticles prepared with 1.5 % PLGA 50:50 polymer in PBS pH 7.4..... 126
40	In vitro antigen release profiles of microparticles prepared with 3 % PLGA 50:50 polymer in PBS pH 7.4..... 127
41	In vitro antigen release profiles of microparticles prepared with 5 % PLGA 50:50 polymer in PBS pH 7.4..... 128
42	Structural integrity of JE antigen encapsulated in PLGA microparticles..... 131
43	In vitro degradation profiles of unloaded PLGA microparticles incubated in PBS pH 7.4 at different time intervals..... 134
44	SEM micrographs of unloaded microparticles degeadation prepared with DL-PLA incubated in PBS pH 7.4 at different time periods.. 135
45	SEM micrographs of unloaded microparticles degeadation prepared with PLGA 85:15 incubated in PBS pH 7.4 at different time periods.... 138
46	SEM micrographs of unloaded microparticles degeadation prepared with PLGA 75:25 incubated in PBS pH 7.4 at different time periods.... 141
47	SEM micrographs of unloaded microparticles degeadation prepared with PLGA 50:50 incubated in PBS pH 7.4 at different time periods.... 144
48	SEM micrographs unloaded and loaded of chitosan microparticles... 147
49	In vitro antigen release profiles of microparticles prepared with LMW chitosan polymer in PBS pH 7.4..... 152

Figure	Page
50	In vitro antigen release profiles of microparticles prepared with MMW chitosan polymer in PBS pH 7.4..... 153
51	In vitro antigen release profiles of microparticles prepared with HMW chitosan polymer in PBS pH 7.4..... 154
52	Structural integrity of JE antigen encapsulated in chitosan microparticles..... 156
53	In vitro degradation profiles of unloaded chitosan microparticles incubated in pH 7.4 at different time intervals..... 158
54	SEM micrographs of PLGA microparticles kept at 40°C for 1 month..... 159
55	In vitro antigen release profiles of microparticles prepared with 1.5% DL-PLA and kept at 40°C for 1 month in PBS pH 7.4..... 167
56	In vitro antigen release profiles of microparticles prepared with 3% DL-PLA and kept at 40°C for 1 month in PBS pH 7.4.....168
57	In vitro antigen release profiles of microparticles prepared with 5% DL-PLA and kept at 40°C for 1 month in PBS pH 7.4..... 169
58	In vitro antigen release profiles of microparticles prepared with 1.5% PLGA 85:15 and kept at 40°C for 1 month in PBS pH 7.4.....170
59	In vitro antigen release profiles of microparticles prepared with 3% PLGA 85:15 and kept at 40°C for 1 month in PBS pH 7.4.....171
60	In vitro antigen release profiles of microparticles prepared with 5% PLGA 85:15 and kept at 40°C for 1 month in PBS pH 7.4.....172
61	In vitro antigen release profiles of microparticles prepared with 1.5 % PLGA 75:25 and kept at 40°C for 1 month in PBS pH 7.4.....173
62	In vitro antigen release profiles of microparticles prepared with 3 % PLGA 75:25 and kept at 40°C for 1 month in PBS pH 7.4.....174

Figure	Page
63	In vitro antigen release profiles of microparticles prepared with 5% PLGA 75:25 and kept at 40°C for 1 month in PBS pH 7.4.....175
64	In vitro antigen release profiles of microparticles prepared with 1.5% PLGA 50:50 and kept at 40°C for 1 month in PBS pH 7.4.....176
65	In vitro antigen release profiles of microparticles prepared with 3% PLGA 50:50 and kept at 40°C for 1 month in PBS pH 7.4.....177
66	In vitro antigen release profiles of microparticles prepared with 5% PLGA 50:50 and kept at 40°C for 1 month in PBS pH 7.4.....178
67	Structural integrity of JE antigen encapsulated in PLGA microparticles kept at 40°C for 1 month..... 179
68	SEM micrographs of chitosan microparticles kept at 40°C for 1 month..... 180
69	In vitro antigen release profiles of microparticles prepared with LMW chitosan polymer and kept at 40°C for 1 month in PBS pH 7.4.... 184
70	In vitro antigen release profiles of microparticles prepared with MMW chitosan polymer and kept at 40°C for 1 month in PBS pH 7.4.... 185
71	In vitro antigen release profiles of microparticles prepared with HMW chitosan polymer and kept at 40°C for 1 month in PBS pH 7.4.... 186
72	Structural integrity of JE antigen encapsulated in chitosan microparticles kept at 40°C for 1 month..... 188
73	Antibody titre profiles of 1 ml of pure JE antigen ,JE encapsulated in PLGA 50:50 and chitosan microparticles..... 189

LIST OF ABBREVIATIONS

μm	=	micrometer
nm	=	nanometer
$^{\circ}\text{C}$	=	degree celcius
PLA	=	polylactide
PLGA	=	poly (lactide-co-glycolide)
CS	=	chitosan
MW	=	molecular weight
LMW	=	low molecular weight
MMW	=	medium molecular weight
HMW	=	high molecular weight
PBS	=	phosphate buffer saline
rpm	=	round per minute
PVA	=	polyvinyl alcohol
JE	=	Japanese Encephalitis
SDS	=	sodium dodecyl sulfate
PAGE	=	polyacrylamide gel electrophoresis
BCA	=	bicinchoninic acid
μl	=	microlitre
ml	=	millilitre
min	=	minute
DCM	=	dichloromethane
SEM	=	scaning electron microscope
kDa	=	kilodalton
Da	=	dalton
CTL	=	cytotoxic T lymphocyte
THF	=	tetrahydrofuran
mg	=	milligram
μg	=	microgram
APCs	=	antigen presenting cells