

**VIROSOMES AND ISCOMS AS SUBUNIT NEWCASTLE DISEASE
VACCINE CANDIDATES: PREPARATION, PHYSICOCHEMICAL
CHARACTERIZATION AND IMMUNOLOGICAL RESPONSES**

ATTHACHAI HOMHUAN

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(PHARMACEUTICS)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2004**

**ISBN 974-04-4309-5
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

วัคซีนหน่วยย่อยป้องกันโรคนิวคาสเซิลในรูปไวโรโซม และ อีสกอม: การเตรียม, คุณสมบัติทางเคมี-กายภาพ และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันวิทยา

(VIROSOMES AND ISCOMS AS SUBUNIT NEWCASTLE DISEASE VACCINE CANDIDATES: PREPARATION, PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION AND IMMUNOLOGICAL RESPONSES)

อรรถชัย หอมหวล 4138458 PYPT/D

ปร.ด. (เภสัชการ)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : สมพล ประคองพันธ์, Ph.D., ประจักษ์ พุ่มวิเศษ, D.V.M., Ph.D., Daan J.A. Crommelin, Ph.D.

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อวิจัยคุณลักษณะทางเคมี-กายภาพ และชีววิทยาของไวโรโซมและอีสกอมซึ่งมีโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัสก่อโรคนิวคาสเซิลเป็นองค์ประกอบ รวมทั้งประเมินความสามารถของตำรับวัคซีนเหล่านี้ในการชักนำให้เกิดการสร้างแอนติบอดี วัคซีนไวโรโซมถูกเตรียมขึ้นโดยการทำลายเปลือกหุ้มไวรัสในสารลดแรงตึงผิว Triton X-100, octyl glucoside (OG), หรือ 1,2-dihexanoyl-glycero-3-phosphocholine (DiC₆PC) แล้วจึงกำจัดสารลดแรงตึงผิวออกไปจากตำรับ การวิเคราะห์ทางชีวเคมีพบว่าวัคซีนไวโรโซมเหล่านี้ประกอบด้วยโปรตีนสองชนิดคือ haemagglutinin-neuraminidase (HN) และ fusion protein (F) โดยโปรตีนทั้งสองชนิดยังคงมีฤทธิ์ทางชีวภาพอยู่ สภาวะแวดล้อมที่เป็นกรดช่วยเหนี่ยวนำกระบวนการเชื่อมตัวระหว่างอนุภาคไวโรโซมและเซลล์เป้าหมาย (chicken erythrocyte ghosts) อีสกอมมีวิธีการเตรียมเช่นเดียวกับไวโรโซม แต่จะเติมไขมัน และ Quil A ลงไปด้วย ปริมาณสัมพัทธ์ของโปรตีน HN ในสูตรตำรับวัคซีนมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการตกกลุ่มเม็ดเลือดแดงซึ่งเป็นฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีน HN ความสามารถในการชักนำให้เกิดการสร้างแอนติบอดีชนิด haemagglutination-inhibition (HI) ในไก่ภายหลังจากการให้วัคซีนไวโรโซมและอีสกอมพบว่าแอนติบอดีไตเตอร์มีความสัมพันธ์กับปริมาณสัมพัทธ์ของโปรตีน HN เมื่อให้ไวรัสนิวคาสเซิลชนิดรุนแรงในไก่ที่ได้รับวัคซีน พบว่า วัคซีนไวโรโซมที่เตรียมจากสารลดแรงตึงผิว Triton X-100 หรือ DiC₆PC และอีสกอมวัคซีนให้ความคุ้มโรคสูง (> 80%) วัคซีนไวโรโซมที่เตรียมจากสารลดแรงตึงผิว OG กลับให้ความคุ้มโรคต่ำกว่าถึงแม้ว่าไก่ในกลุ่มนี้จะมีระดับแอนติบอดีไตเตอร์สูงก็ตาม หากความหนาแน่นของโปรตีนแอนติเจนในเปลือกไวโรโซมมีน้อยลงจะส่งผลเสียต่อการชักนำให้เกิดการสร้างแอนติบอดี และให้ความคุ้มโรคต่ำ การให้วัคซีนอีสกอมโดยทางรับประทานให้ความคุ้มโรคในไก่ได้บางส่วน แต่ไม่สามารถตรวจพบ HI แอนติบอดีไตเตอร์ โดยสรุปแล้ววัคซีนไวโรโซมและอีสกอมสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างแอนติบอดีและให้ผลความคุ้มโรคได้ดี การเลือกใช้สารลดแรงตึงผิวในการเตรียมวัคซีนไวโรโซมมีผลอย่างมากต่อคุณลักษณะของชีวผลิตภัณฑ์

VIROSOMES AND ISCOMS AS SUBUNIT NEWCASTLE DISEASE VACCINE CANDIDATES: PREPARATION, PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION AND IMMUNOLOGICAL RESPONSES

ATTHACHAI HOMHUAN 4138458 PYPT/D

Ph.D.(PHARMACEUTICS)

THESIS ADVISORS: SOMPOL PRAKONGPAN, Ph.D., PRACHAK POOMVISES, D.V.M., Ph.D., DAAN J.A. CROMMELIN, Ph.D.

ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the physicochemical and biological characteristics of virosomes and ISCOMs containing envelope proteins of Newcastle disease virus (NDV) and to evaluate their immunogenicity. Virosomes were prepared by solubilization of virus with Triton X-100, octyl glucoside (OG), or 1,2-dihexanoyl-glycero-3-phosphocholine (DiC₆PC) followed by detergent removal. Biochemical analysis revealed that these virosomes combined both the haemagglutinin-neuraminidase (HN) and fusion (F) proteins, with preserved biological activity. A greater acidic environment triggered the fusion between virosomes and resealed chicken erythrocyte ghosts. Following a similar procedure to prepare virosomes from Triton X-100, but including the addition of Quil A and lipids, ISCOM particles were formed. In each formulation the relative HN content correlated with the capability to agglutinate chicken red blood cells. The immunogenicity of these lipid-based subunit vaccines was determined in chickens after immunization. The relative HN content of the subunit vaccines correlated with the haemagglutination-inhibition (HI) antibody titers. Virosomes prepared from either Triton X-100 or DiC₆PC and ISCOMs offered high clinical protection (>80%) when challenged with virulent NDV. Virosomes prepared from OG yielded lower clinical protection although high HI antibody titers were observed. Decreasing antigen density in the virosomal membrane resulted in poor immunogenicity and protection. Oral vaccination with ISCOMs did not offer systemic HI antibody level but partial protection was observed. In conclusion, ND virosomes and ISCOMs were studied and found to be immunogenic and they also provided good protection. The detergent chosen for preparing virosomes had a considerable impact on the properties of ND virosomes.

**KEY WORDS: NEWCASTLE DISEASE VIRUS/ VIROSOMES / ISCOMS/
SUBUNIT VACCINES**

126 P. ISBN 974-04-4309-5