

การนำส่งวัคซีนเชื้อหุ้มสมองอักเสบเจี๋ทางจมูกโดยใช้อนุภาคคั้ดแปลง  
พอลิ(ดี,แอล-แลกติก-โค-โกล โคลิกแอซิด)เป็นตัวนำส่ง



นางสาวอมลณัฏฐ์ ดันศิริคงคด

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรคุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชกรรม ภาควิชาวิทยาการเภสัชกรรมและเภสัชอุตสาหกรรม

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



4 8 7 6 9 5 7 0 3 3

**NASAL DELIVERY OF JAPANESE ENCEPHALITIS VACCINE USING  
MODIFIED POLY(D,L-LACTIC-CO-GLYCOLIC ACID) PARTICLES AS  
DELIVERY VEHICLE**

**Miss Amolnat Tunsirikongkon**

**A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Pharmaceutics  
Department of Pharmaceutics and Industrial Pharmacy  
Faculty of Pharmaceutical Sciences  
Chulalongkorn University  
Academic Year 2009**

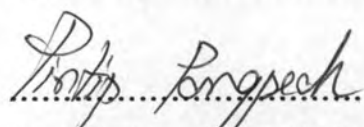
**Copyright of Chulalongkorn University**

**521850**

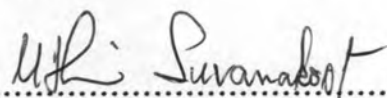
**Thesis Title** NASAL DELIVERY OF JAPANESE ENCEPHALITIS  
VACCINE USING MODIFIED POLY(D,L-LACTIC-CO-  
GLYCOLIC ACID) PARTICLES AS DELIVERY VEHICLE  
**By** Miss Amolnat Tunsirikongkon  
**Field of Study** Pharmaceutics  
**Thesis Advisor** Professor Garnpimol C. Ritthidej, Ph.D.  
**Thesis Co-Advisor** Associate Professor Vimolmas Lipipun, Ph.D.

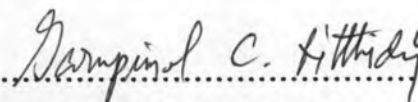
---

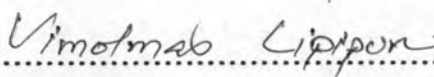
Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn  
University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctoral Degree

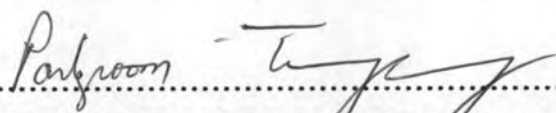
.....Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences  
(Associate Professor Pintip Pongpech, Ph.D.)

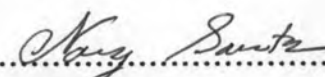
#### THESIS COMMITTEE


.....Chairman  
(Associate Professor Uthai Suvanakoot, Ph.D.)

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

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

.....Examiner  
(Associate Professor Parkpoom Tengannuay, Ph.D.)

.....External Examiner  
(Professor Narong Sarisuta, Ph.D.)

.....External Examiner  
(Rathapon Asasutjarit, Ph.D.)

อมลฉวี ตันศิริคงคล : การนำส่งวัคซีนเชื้อหุ้มสมองอักเสบเจีทางจมูกโดยใช้อนุภาคดัดแปลงพอลิ (ดี,แอล-แลกติก-โค-ไกล โคลิกแอซิด)เป็นตัวนำส่ง. (NASAL DELIVERY OF JAPANESE ENCEPHALITIS VACCINE USING MODIFIED POLY (D,L-LACTIC-CO-GLYCOLIC ACID) PARTICLES AS DELIVERY VEHICLE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ.ดร.กาญจน์พิมล ฤทธิเดช, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ.ดร. วิมลมาศ ลิปิพันธ์, 171 หน้า.

ระบบนำส่งวัคซีนรูปแบบใหม่เพื่อนำส่งวัคซีนใช้สมองอักเสบเจีทางจมูกผลิตจากพอลิ(ดี,แอล-แลกติก-โค-ไกล โคลิกแอซิด) (พีแอลจีเอ) และดัดแปลงพื้นผิวด้วยไลโดซานและอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์โดยได้ถูกเตรียมขึ้นด้วยวิธีระเหยสารทำละลายของทูคิโออิมัลชันเพื่อให้ได้อนุภาคที่มีขนาดและประจุพื้นผิวที่แตกต่างกัน โดยศึกษาผลของตัวแปรที่เกี่ยวข้องกับสูตรตำรับต่อคุณสมบัติเชิงเคมีและฟิสิกส์ของอนุภาคที่เตรียม ได้รวมถึงความคงสภาพของเจีไวรัสระหว่างกระบวนการผลิต จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าขนาดและการกระจายตัวของขนาดเพิ่มขึ้น โดยการเพิ่มอัตราส่วนระหว่างน้ำและน้ำมันของอิมัลชันปฐมภูมิ, อัตราส่วนน้ำและน้ำมันและน้ำของอิมัลชันทุติยภูมิ, ปริมาตรพีวีเอหรือโดยการลดร้อยละของพีวีเอและลดการให้แรงสั่นสะเทือนโซนิเคเตอร์ จุลอนุภาคทั้งหมดมีลักษณะเป็นทรงกลมพื้นผิวเรียบและมีประจุพื้นผิวเป็นบวกหลังจากดัดแปลงพื้นผิวแล้วด้วยไลโดซานและอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ นอกจากนี้ อิทธิพลโปรตีนอี ยังคงสภาพระหว่างขั้นตอนการเตรียม ประสิทธิภาพของอนุภาคเหล่านี้ในการเป็นระบบนำส่งวัคซีนเจีทางจมูกโดยมีขนาดและประจุพื้นผิวที่เหมาะสมในการนำส่งทางจมูกได้ถูกศึกษาต่อไป การประยุกต์ใช้อนุภาคพีแอลจีเอ, พีแอลจีเอดัดแปลงพื้นผิวด้วยไลโดซานและอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์เพื่อใช้เป็นระบบนำส่งวัคซีนเจีทางจมูกได้ด้อมาถูกประเมินในเนื้อเยื่อจมูกหนู ผลการวิจัยด้วยเครื่องซีแอลเอสเอ็่มระบุว่า การจับกินอนุภาคของอนุภาคขนาด 1 ไมครอนในเนื้อเยื่อจมูกหนูได้ถูกจับกินและส่งผ่านอย่างรวดเร็วถึงแม้ว่าการเกาะติดผิวเนื้อเยื่อของอนุภาคขนาด 1 ไมครอนจะน้อยกว่าอนุภาคขนาด 5 และ 15 ไมครอนก็ตาม การเกาะติดพื้นผิวเนื้อเยื่อของอนุภาคขนาด 1 ไมครอนเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดหลังจากดัดแปลงพื้นผิวด้วยไลโดซานและอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์อย่างไรก็ตาม การจับกินและการส่งผ่านอนุภาคจะเพิ่มขึ้นมากเฉพาะสูตรตำรับที่ดัดแปลงด้วยอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ ส่วนสูตรตำรับที่ดัดแปลงด้วยไลโดซานให้ผลที่แตกต่างกันเนื่องจากกลไกหลักของการถูกจับกินของไลโดซานคือ กลไกพาราเซลลูล่า ซึ่งเป็นผลให้ร้อยละการถูกจับกินของสูตรนี้มีค่าน้อยกว่าร้อยละของการส่งผ่านมีค่ามากในระยะเวลาที่เท่ากันเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอื่นๆเนื่องจากกลไกพาราเซลลูล่าเป็นกลไกที่รวดเร็วกว่าพาราเซลลูล่า สูตรทั้งหมดที่คัดเลือกเพื่อศึกษาต่อในสัตว์ทดลองไม่มีความเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อจมูกหนู การเหนี่ยวนำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันทางจมูกของวัคซีนเจีขนาด โคสต่างๆและวัคซีนเจีที่ถูกกักเก็บในอนุภาคพีแอลจีเอที่มีขนาดและประจุต่างๆกัน ได้ถูกประเมิน ระดับภูมิคุ้มกันของวัคซีนเจีในหนู Balb/C ขนาดโคส 10, 40 และ 80 ไมโครกรัมมีความเท่าเทียมกันแต่ต่ำกว่าหนูที่ได้รับวัคซีนด้วยการฉีดเข้าใต้ผิวหนังด้วย ความถี่การให้วัคซีนที่เท่ากัน วัคซีนขนาดโคส 10 ไมโครกรัมได้ถูกเลือกเพื่อกักเก็บในอนุภาคพีแอลจีเอขนาด 1.5 และ 15 ไมครอนและให้ในหนู Balb/C พบว่าอนุภาคช่วยเพิ่มระดับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ดีกว่าโดยเปรียบเทียบกับการกระตุ้นด้วยวัคซีนเพียงอย่างเดียวและอนุภาคขนาด 1 ไมครอนให้ระดับภูมิคุ้มกันที่สูงกว่าขนาดอื่นๆแต่ยังคงต่ำกว่าการกระตุ้นโดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนังและยังคงต้องการการกระตุ้นซ้ำ การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของอนุภาคที่ดัดแปลงพื้นผิวด้วยไลโดซานและอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์มีระดับสูงกว่ามากและคงอยู่ในระยะเวลาที่ยาวนานกว่าอนุภาคที่ไม่ได้ดัดแปลงพื้นผิวโดยที่ไม่ต้องการการกระตุ้นซ้ำอีก

ภาควิชา...วิทยาการเกษตรกรรมและเกษตรอุตสาหกรรม.....ลายมือชื่อนิสิต: *อมลฉวี ตันศิริคงคล*  
สาขาวิชา.....เกษตรกรรม.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: *Wu Jw*  
ปีการศึกษา.....2552.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: *Sirwan*

# # 4876957033 : MAJOR PHARMACEUTICS

KEYWORDS: PLGA/CHITOSAN/AL(OH)<sub>3</sub>/MICROPARTICLES/JAPANESE ENCEPHALITIS/VACCINE

AMOLNAT TUNSIRIKONGKON: NASAL DELIVERY OF JAPANESE ENCEPHALITIS VACCINE USING MODIFIED POLY(D,L-LACTIC-CO-GLYCOLIC ACID) PARTICLES AS DELIVERY VEHICLE. THESIS ADVISOR: PROF. GARNPIMOL C. RITTHIDEJ, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: ASSOC PROF. VIMOLMAS LIPIPUN, Ph.D., 171 pp.

Novel carriers for nasal application of Japanese encephalitis (JE) vaccine utilized by poly(D,L lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and surface conjugating with chitosan (CS) and Al(OH)<sub>3</sub> were prepared by means of multiple emulsion solvent evaporation technique to obtain various sizes and surface charge of particles. The influences of preparation conditions on physicochemical characteristics and on integrity of JE virus were evaluated. The results demonstrated that size and uniformity increased by increasing primary w/o ratio, secondary w/o/w ratio, volume of PVA or by decreasing the percentage of PVA as well as the sonication output. All microparticles were spherical with smooth surface comprising the positively surfaced charge after conjugating with CS and Al(OH)<sub>3</sub>. Integrity and structural conformation of epitope E protein was fine retained during the preparation process. The efficacy of these particles as nasal JE vaccine carrier whose particles diameter and surface charge were suitable for nasal route was first introduced in this study. The use of various size of PLGA, PLGA conjugated CS and Al(OH)<sub>3</sub> as nasal JE vaccine carrier was investigated after application into porcine nasal mucosa. CLSM suggested that particulate uptake of particles up to approximately 1µm was rapidly taken up by and permeated through nasal mucosa even though the adhesion on tissue surface was relatively lower compared to those from 5 and 15 µm. The tissue adhesion was considerably improved after the conjugation of 1 µm particles with CS and Al(OH)<sub>3</sub>. However, higher amount of particulate uptake and permeation occurred only in Al(OH)<sub>3</sub> formulation. CS formulation showed conversely different result as the uptake mechanism of CS was mainly by paracellular path, consequence in the lower percentage of particulate uptake but the higher percentage of particulate permeation within the same period of time since paracellular process was a more rapid process than transcellular pathway. All formulations selected to further study in experimental animal were relatively non-toxic to nasal tissue. Induction of nasal immune response following nasal administration of various dose of JE vaccine and JE vaccine entrapped in different size and surface charge of PLGA particles was evaluated. The immunogenicity of 10,40 and 80µg dose of JE in Balb/C mice was relatively equal but considerably lower compared to subcutaneous route with the same frequency of administration. The 10µg dose entrapped in 1,5 and 15µm PLGA particles was selected to inoculate in Balb/C mice and found that particles could enhance more level of immunological titer compared to vaccine alone and 1µm could elicit the highest level but still not comparable to subcutaneous route and repeated vaccination dose remained necessitate. After conjugation by CS and Al(OH)<sub>3</sub>, the titer seemed to persist for a longer period of time with much higher level compared to unconjugated particles and the booster dose need not be required.

Department: Pharmaceutics and Industrial Pharmacy...Student's Signature: *Amolnat Tunstrikongkon*  
 Field of Study:.....Pharmaceutics.....Advisor's Signature: *G. C. Ritthidej*  
 Academic Year:.....2009.....Co-Advisor's Signature: *Vimolmas Lipipun*



## ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deep and sincere gratitude to my thesis advisor, Professor Garnpimol C. Ritthidej for her meaningful advice, invaluable guidance in both of my study life and my living life. Her helpfulness, and warmest have encouraged me for all time I spent at Chulalongkorn University as her phd. student. Her patience and understanding are also my absolutely appreciation. I am also indebted to Associate Professor Vimolmas Lipipun, my thesis co-advisor, for her kind assistance, helpful consultation and everlasting support.

Additionally, my express thanks are advocated to all members of thesis committee, Associate Professor Uthai Suvanakoot, Associate Professor Parkpoom Tengamnuay, Professor Narong Sarisuta and Rathapon Asasutjarit for their valuable time, suggestions and discussions. I also wish to acknowledge Royal Golden Jubilee phd. scholarship and Graduate School of Chulalongkorn University for the financial support on this research project and conference participation.

In addition, I would like to concede the friendship, assistance and encouragement of my friends, colleagues and staffs of the Department of Industrial Pharmacy and other person whose names have not been mentioned.

Ultimately, I would like to express my heartfelt and truly thank to my beloved parents, mom and dad, and my dearly loved husband for their care, endless love, cheerfulness, understanding and encouragement throughout my life.

# CONTENTS

	<b>Page</b>
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	ix
LIST OF FIGURES.....	xii
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xvii
<b>CHAPTER</b>	
<b>I INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>II LITERATURE REVIEW.....</b>	<b>4</b>
- Japanese encephalitis.....	4
- Mucosal immune system.....	8
- Role of particles as mucosal antigen delivery.....	11
- Mucosal transportation.....	14
- Role of particles as in vivo mucosal stimulation.....	16
<b>III PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF Al(OH)<sub>3</sub> AND CHITOSAN CONJUGATED PLGA MICROPARTICLES AS NASAL VACCINE CARRIERS</b>	
- Introduction.....	17
- Materials and methods.....	20
- Results and discussions.....	25
- Conclusions.....	44

IV	EX VIVO EVALUATION OF $Al(OH)_3$ AND CHITOSAN CONJUGATED PLGA MICROPARTICLES AS NASAL VACCINE CARRIERS IN PORCINE NASAL MUCOSA	
	- Introduction.....	45
	- Materials and methods.....	47
	- Results and discussions.....	53
	- Conclusions.....	78
V	IN VIVO EVALUATION OF $Al(OH)_3$ AND CHITOSAN CONJUGATED PLGA MICROPARTICLES AS NASAL JAPANESE ENCEPHALITIS VACCINE CARRIERS	
	- Introduction.....	79
	- Materials and methods.....	81
	- Results and discussions.....	86
	- Conclusions.....	107
VI	CONCLUSIONS.....	108
	REFERENCES.....	113
	APPENDICES	
	APPENDIX A.....	139
	APPENDIX B.....	154
	APPENDIX C.....	162
	BIOGRAPHY .....	171



## LIST OF TABLES

<b>Table</b>	<b>Page</b>
3.1 Formulation parameters, characteristics of particles and effect of CS and Al(OH) <sub>3</sub> on size, uniformity and surface charge of size selected PLGA formulations.....	32
3.3 Effect of CS and Al(OH) <sub>3</sub> on size, uniformity and surface charge of size selected PLGA formulations.....	34
4.1 Optimized preparation parameters for 1, 5 and 15µm PLGA formulations.....	49
4.2 Percentage of particles taken up by porcine nasal mucosa.....	55
5.1 Physical properties of selected PLGA formulations.....	89
6.1 Particle size and particle size distribution of PLGA particles.....	139
6.2 Percentage of Cumulative release.....	151
6.3 Standard deviation of cumulative release.....	152
6.4 Fluorescent intensity of 1µm particles incubated porcine nasal tissue for 20 minutes.....	154
6.5 Fluorescent intensity of 1µm particles incubated porcine nasal tissue for 90 minutes.....	154
6.6 Fluorescent intensity of 1µm particles.....	155
6.7 Fluorescent intensity of 5µm particles incubated porcine nasal tissue for 20 minutes.....	155
6.8 Fluorescent intensity of 5µm particles incubated porcine nasal tissue for 90 minutes.....	155
6.9 Fluorescent intensity of 5µm particles.....	156

<b>Table</b>	<b>Page</b>
6.10 Fluorescent intensity of 15 $\mu$ m particles incubated porcine nasal tissue for 20 minutes.....	156
6.11 Fluorescent intensity of 15 $\mu$ m particles incubated porcine nasal tissue for 90 minutes.....	156
6.12 Fluorescent intensity of 15 $\mu$ m particles.....	157
6.13 Fluorescent intensity of 1C PLGA particles incubated porcine nasal tissue for 20 minute.....	157
6.14 Fluorescent intensity of 1C PLGA particles incubated porcine nasal tissue for 90 minutes.....	157
6.15 Fluorescent intensity of 1C PLGA particles.....	158
6.16 Fluorescent intensity of 1A PLGA particles incubated porcine nasal tissue for 20 minutes.....	158
6.17 Fluorescent intensity of 1A PLGA particles incubated porcine nasal tissue for 90 minutes.....	158
6.18 Fluorescent intensity of 1A PLGA particles.....	159
6.19 Percentage of washed particles.....	159
6.20 Percentage of cells viability.....	160
6.21 Percentage of cumulative permeation of particles.....	160
6.22 Percentage of cumulative permeation of JE released from particles.....	161
6.23 Molar ellipticity of JE, Purified JE and Purified JEx4.....	162
6.24 Molar ellipticity of 1 $\mu$ m, 5 $\mu$ m, 15 $\mu$ m and JE with DCM.....	164
6.25 Molar ellipticity of 1 $\mu$ m, 1C $\mu$ m, 1A $\mu$ m particles.....	166
6.26 IgA antibody response of different doses of vaccine.....	168
6.27 IgA antibody response of different sizes of particles encapsulated vaccine.....	168
6.28 IgA antibody response of different conjugated particles encapsulated vaccine.....	169
6.29 IgG antibody response of different doses of vaccine.....	169

<b>Table</b>	<b>Page</b>
6.30 IgG antibody response of different sizes of particles encapsulated vaccine.....	170
6.31 IgG antibody response of different conjugated particles encapsulated vaccine.....	170

## LIST OF FIGURES

<b>Figure</b>	<b>Page</b>
2.1 Morphology of Flaviviruses cell membrane .....	4
2.2 The surface protein of JE virus .....	5
2.3 The cell entry of virus.....	5
2.4 Domain A, B and C of Japanese encephalitis virus.....	6
2.5 Schematic drawing of mucus (MU) covered absorptive enterocytes (EC) and M cells (MC), lymphocytes (LC) and macrophages (MP) from underlying lymphoid tissue can pass the basal lamina (BL) and reach the epithelial cell layer which is sealed by tight junctions (TJ).....	10
3.1 Schematic representation of PLGA, (A), CS conjugated PLGA, (B) and Al(OH) <sub>3</sub> conjugated PLGA, (C) particles.....	19
3.2 Effect of w:o ratio of primary emulsion, (w:o):w ratio of secondary emulsion and % PVA (w/v) of secondary emulsion on size and uniformity (plain bar and strip bar of each pair bar) of PLGA particles prepared by probe sonication during secondary emulsion process.....	25
3.3 Effect of sonication equipment in the process of secondary emulsion forming on size and uniformity of PLGA particles prepared with primary w/o and secondary (w/o)/w 1:10 and 1:2, respectively.....	29
3.4 SEM photomicrograph of PLGA, CS conjugated PLGA, 0.75% Al(OH) <sub>3</sub> conjugated PLGA and 1.5% Al(OH) <sub>3</sub> conjugated PLGA particles (A►D, respectively) with different particles size of 1, 5 and 15µm(1,2,3, respectively).....	33

<b>Figure</b>	<b>Page</b>
3.5 Surface morphology of PLGA (A1), PVA (A2), CS conjugated PLGA (B1), CS (B2), 0.75% Al(OH) <sub>3</sub> conjugated PLGA (C1) and Al(OH) <sub>3</sub> (C2) using AFM technique.....	34
3.6 The FT-IR spectra of PVA (A), Al(OH) <sub>3</sub> (B), PVA/Al(OH) <sub>3</sub> (C), CS (D), and PVA/CS (E).....	39
3.7 The release profile of 1µm, 5µm, 15µm PLGA particles, CS conjugated PLGA particles (1C) and 0.75% Al(OH) <sub>3</sub> conjugated PLGA particles (1A).....	41
3.8 Protein profile by SDS-PAGE of JE vaccine, Lane A: Molecular weight marker, Lane B: JE vaccine with DCM, Lane C: sonicated JE vaccine Lane D: JE vaccine.....	42
3.9 Protein characteristics by CD of JE vaccine, sonicated JE vaccine and JE vaccine blended DCM, dilution 1:10.....	43
4.1 Morphology and fluorescence property of 1 µm (A), 5 µm (B), 15 µm (C), 1C (D) and 1A (E) particles by optical, fluorescence and confocal laser scanning microscope (1→ 3), respectively.....	56
4.2 Characteristic of particle taken up into porcine nasal mucosa of 1µm (A), 5µm (B), 15µm (C), 1C (D) 1A (E) particles and PBS (F) by CLSM; incubation time 20 minutes.....	60
4.3 Characteristic of particle taken up into porcine nasal mucosa of 1µm (A), 5µm (B), 15µm (C), 1C (D) 1A (E) particles and PBS (F) by CLSM; incubation time 90 minutes.....	62
4.4 The percentage of washed particles representing the adhesion property on porcine nasal surface of 1µm, 5µm, 15 µm particles, 1C and 1A.....	67
4.5 Morphology of porcine nasal mucosa involving transportation of 1 µm, 5 µm, 15 µm, 1C and 1A particles by SEM technique .....	71
4.6 Cell viability of porcine nasal mucosa, co-incubated with 1µm, 5µm, 15 µm particles, 1C and 1A .....	74

<b>Figure</b>	<b>Page</b>
4.7 The permeation profile of particles (A) and JE released from particles (B) of 1 $\mu$ m, 5 $\mu$ m, 15 $\mu$ m, 1C and 1A particles.....	76
5.1 Morphology of purified JE vaccine, (A1-A2) and crude JE vaccine, (B1-B2) by TEM.....	87
5.2 Protein profile by SDS-PAGE of JE vaccine, Lane A: Molecular weight marker, Lane B: crude JE vaccine, Lane C and D: purified JE vaccine.....	87
5.3 Protein characteristics by CD of JE vaccine, purified JE vaccine and purified JE vaccine at 4 times concentrations.....	88
5.4 Morphology of 1 $\mu$ m PLGA particles at week 0, 1, 2 and 8 (A1-A4), Al(OH) <sub>3</sub> conjugated PLGA particles at week 0, 1, 2 and 8 (B1-B4), and CS conjugated PLGA particles at week 0, 1, 2 and 8 (C1-C4) observed by SEM.....	91
5.5 Protein characteristics by CD of JE vaccine recovered from 1 $\mu$ m, 5 $\mu$ m, 15 $\mu$ m and JE with DCM.....	93
5.6 Protein characteristics by CD of JE vaccine recovered from 1 $\mu$ m, CS conjugated 1 $\mu$ m (1C) and Al(OH) <sub>3</sub> conjugated 1 $\mu$ m (1A) PLGA particles.....	93
5.7 IgG (A) and IgA (B) response of mice immunized with different doses of purified JE vaccine via intranasal and subcutaneous route using PBS as control group .....	97
5.8 IgG (A) and IgA (B) response of mice immunized with purified JE vaccine encapsulated in different size of PLGA carriers, via intranasal and subcutaneous route using PBS as control group .....	100
5.9 IgG (A) and IgA (B) response of mice immunized with purified JE vaccine encapsulated in 1 $\mu$ m PLGA carriers and conjugated by CS (1C) and Al(OH) <sub>3</sub> (1A), via intranasal and subcutaneous route using PBS as control group.....	104



<b>Figure</b>	<b>Page</b>
6.1 Particle size and particle size distribution of PLGA 0.68 $\mu\text{m}$ (0.51).....	140
6.2 Particle size and particle size distribution of PLGA 0.92 $\mu\text{m}$ (0.27).....	140
6.3 Particle size and particle size distribution of PLGA 1.25 $\mu\text{m}$ (0.30).....	140
6.4 Particle size and particle size distribution of PLGA 1.55 $\mu\text{m}$ (0.48).....	141
6.5 Particle size and particle size distribution of PLGA 1.96 $\mu\text{m}$ (0.36).....	141
6.6 Particle size and particle size distribution of PLGA 2.32 $\mu\text{m}$ (0.67).....	141
6.7 Particle size and particle size distribution of PLGA 2.31 $\mu\text{m}$ (1.02).....	142
6.8 Particle size and particle size distribution of PLGA 3.00 $\mu\text{m}$ (0.70).....	142
6.9 Particle size and particle size distribution of PLGA 3.37 $\mu\text{m}$ (0.99).....	142
6.10 Particle size and particle size distribution of PLGA 3.54 $\mu\text{m}$ (1.03).....	143
6.11 Particle size and particle size distribution of PLGA 4.15 $\mu\text{m}$ (0.94).....	143
6.12 Particle size and particle size distribution of PLGA 4.53 $\mu\text{m}$ (1.29).....	143
6.13 Particle size and particle size distribution of PLGA 5.26 $\mu\text{m}$ (1.57).....	144
6.14 Particle size and particle size distribution of PLGA 5.82 $\mu\text{m}$ (1.69).....	144
6.15 Particle size and particle size distribution of PLGA 6.39 $\mu\text{m}$ (5.46).....	144
6.16 Particle size and particle size distribution of PLGA 7.07 $\mu\text{m}$ (1.61).....	145
6.17 Particle size and particle size distribution of PLGA 7.44 $\mu\text{m}$ (5.14).....	145
6.18 Particle size and particle size distribution of PLGA 7.88 $\mu\text{m}$ (1.47).....	145
6.19 Particle size and particle size distribution of PLGA 10.20 $\mu\text{m}$ (2.21).....	146
6.20 Particle size and particle size distribution of PLGA 14.60 $\mu\text{m}$ (3.41).....	146
6.21 Particle size and particle size distribution of PLGA 20.11 $\mu\text{m}$ (1.21).....	146
6.22 Particle size and particle size distribution of PLGA-CS of 1 $\mu\text{m}$ particles 1.22 $\mu\text{m}$ (7.72).....	147
6.23 Particle size and particle size distribution of PLGA-0.75% Al(OH) <sub>3</sub> of 1 $\mu\text{m}$ particles 1.62 $\mu\text{m}$ (1.59).....	147
6.24 Particle size and particle size distribution of PLGA-1.5% Al(OH) <sub>3</sub> of 1 $\mu\text{m}$ particles 3.44 $\mu\text{m}$ (2.22).....	147
6.25 Particle size and particle size distribution of PLGA-CS of 5 $\mu\text{m}$ particles 7.59 $\mu\text{m}$ (2.52).....	148

<b>Figure</b>	<b>Page</b>
6.26 Particle size and particle size distribution of PLGA- 1.5% Al(OH) <sub>3</sub> of 5µm particles <i>6.89µm(2.96)</i> .....	148
6.27 Particle size and particle size distribution of PLGA- 1.5% Al(OH) <sub>3</sub> of 5µm particles <i>6.89µm(2.96)</i> .....	148
6.28 Particle size and particle size distribution of PLGA- CS of 15µm particles <i>17.18µm(2.77)</i> .....	149
6.29 Particle size and particle size distribution of PLGA- 0.75% Al(OH) <sub>3</sub> of 15µm particles <i>16.85µm(1.98)</i> .....	149
6.30 Particle size and particle size distribution of PLGA- 1.5% Al(OH) <sub>3</sub> of 15µm particles <i>16.95µm(1.83)</i> .....	149
6.31 Solvent residue by GC of DCM in 1µm PLGA particles.....	150
6.32 Solvent residue by GC of DCM in 5µm PLGA particles.....	150
6.33 Solvent residue by GC of DCM in 15µm PLGA particles.....	150
6.34 Standard curve of BSA.....	151
6.35 Zeta potential diagram of 1µm PLGA particles.....	152
6.36 Zeta potential diagram of 1Aµm PLGA particles.....	153
6.37 Zeta potential diagram of 1Cµm PLGA particles.....	153

## LIST OF ABBREVIATIONS

%	percentage
µg	microgram(s)
µl	microlitre(s)
µm	micrometer(s)
Ab	antibody
Ag	antigen
APC	antigen presenting cell
BCA	bicinchoninic acid
BSA	bovine serum albumin
C	capsid protein of JE
CS	chitosan
CD	circular dichroism
CLSM	confocal laser scanning electron microscope
Da	dalton
DCM	dichloromethane
E	envelop protein of JE
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
et.al.	et alli, and others
FT-IR	fourier transform infrared
g	gram(s)
GC	gas chromatography
HEV	high-walled endothelial venules
IgG	Immunoglobulin G
IgA	Immunoglobulin A
IM	Intramuscular injection
JE	Japanese Encephalitis
kDa	kilodalton
M	membrane protein of JE
MAdCAM-1	mucosal vascular addressin cell adhesion molecule-1
mg	milligram(s)

<b>min</b>	<b>minute</b>
<b>ml</b>	<b>millilitre(s)</b>
<b>MW</b>	<b>molecular weight</b>
<b>NALT</b>	<b>nasal associated lymphoid tissue</b>
<b>nm</b>	<b>nanometer</b>
<b>o/w</b>	<b>oil in water</b>
<b>°C</b>	<b>degree celcius (centigrade)</b>
<b>OD</b>	<b>optical density</b>
<b>OPD</b>	<b>o-phenylenediamine</b>
<b>PAGE</b>	<b>polyacrylamide gel electrophoresis</b>
<b>PBS</b>	<b>phosphate buffer saline</b>
<b>pH</b>	<b>the negative logarithm of the molar concentration of dissolved hydrogen ions</b>
<b>pI</b>	<b>isoelectric point</b>
<b>PLGA</b>	<b>poly (D,L-lactic-co-glycolide acid)</b>
<b>prM</b>	<b>pre-membrane protein of JE</b>
<b>PVA</b>	<b>polyvinyl alcohol</b>
<b>rpm</b>	<b>round per minute</b>
<b>SDS</b>	<b>sodium dodecyl sulfata</b>
<b>SEM</b>	<b>scaning electron microscope</b>
<b>TEM</b>	<b>transmission electron microscope</b>
<b>Th</b>	<b>T helper cells</b>
<b>USP</b>	<b>The United States Pharmacopoeia</b>
<b>UV</b>	<b>ultraviolet</b>
<b>VCAM-1</b>	<b>vascular cell adhesion molecule-1</b>
<b>w/o</b>	<b>water in oil</b>
<b>(w/o)/w</b>	<b>water in oil in water</b>
<b>w/v</b>	<b>weight by volume</b>
<b>w/w</b>	<b>weight by weight</b>