

## PLGA 미립구를 이용한 새로운 단회 접종 항원 전달 시스템의 개발

윤미경 · 최영욱<sup>†</sup>

중앙대학교 약학대학

(2004년 1월 10일 접수 · 2004년 2월 12일 승인)

### Improved Antigen Delivery Systems with PLGA Microsphere for a Single-Step Immunization

Mi Kyeong Yoon and Young Wook Choi<sup>†</sup>

College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

(Received January 10, 2004 · Accepted February 12, 2004)

**ABSTRACT**—A promising approach to the development of a new single-step vaccine, which would eliminate the requirement for multiple injections, involves the encapsulation of antigens into microspheres. Biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) microspheres gave us a bright insight for controlling antigen release in a pulsatile fashion, thereby mimicking two or three boosting injections. However, in spite of the above merits, the level of immunization induced by a single-shot vaccination is often lower than two doses of alum-adsorbed antigen. Therefore, optimal modification of the microsphere is essential for the development of single-step vaccines. In this review, we discuss the stability of antigen in microsphere, safety and non-toxic in human and encapsulation technology. Also, we attempted to outline relevant physicochemical properties on the immunogenicity of microsphere vaccine and attainment of pulsatile release pattern by combination of different microsphere, as well as to analyze immunological data associated with antigen delivery by microsphere. Although a lot of variables are related to the optimized microsphere formulation, we could conclude that judicious choice of proper polymer type, adjustment of particles size, and appropriate immunization protocol along with a suitable adjuvant might be a crucial factor for the generation of long-lasting immune response from a single-step vaccine formulation employing PLGA microsphere.

**Key words**—PLGA, Microsphere, Single-step vaccine, Immunogenicity, Antigen

효과적인 백신제제는 안전하면서도 지속적인 면역능을 유발시켜야 하며, 특히 T 세포 면역능을 유발시킬 수 있어야 하고 저비용으로 부작용이 없어야 한다. 이런 백신제제의 기본적인 조건을 바탕으로 최근 백신제제 개발에 있어서 주된 관심분야는 새로운 adjuvant, 안전하고 효율적인 수송시스템 개발, 합성펩타이드를 이용한 제제개발, 펩타이드 약물의 제조과정 중 변성을 극복하기 위한 제제화 연구, 생체적합성 고분자 내에 수용성 펩타이드 또는 단백항원을 함유시킨 미립구를 이용한 제제화 연구, 그리고 투여 빈도를 포함한 백신제제의 사용성 개선 등에 있다.<sup>1)</sup> 백신제제 개발의 문제점으로 제기되는 짧은 면역능 기간으로 인한 반복투여와 항원의 안정성문제, 낮은 면역능 등을 극복하기 위한 단회접종백신(single-step vaccine)의 개발이 중요한 이슈가 되고있으며 이들의 장점으로는 단회투여이므로 투여가 간편하다는 것과 탈락률(drop-out)의 비율이 낮다는 점 그리고 경제적인 면

등이 있다.

이러한 항원전달 시스템의 개발은 Table I과 같이 여러가지 방법으로 연구되고 있으며<sup>2)</sup> 그 중 리포솜은 생성된 리포솜의 형태나 이중층의 전체 전하값, 리포솜내 항원의 위치등에 변화를 주어 면역능을 조절하는 연구가 시도되어 왔고 예 멸전에서는 Freund's adjuvant 백신이 상당히 좋은 면역능을 나타내는 것으로 보고되었다.<sup>3-5)</sup> 최근 새로운 단회접종 백신 시스템의 하나로 항원을 봉입한 고분자 미립구가 활발히 연구되고 있는데, 이는 항원의 방출 속도를 조절하여 보다 강하고 효과적인 면역능을 획득하게 할 수 있는 장점이 있다. 이를 통해서 지속적인 항원의 방출 (continuous release)이나 펄스형 방출 (pulsatile release)을 계획할 수 있고 항원의 안정성도 보장될 뿐만 아니라 면역보조제로서의 역할도 할 수 있다.

미립구를 이용한 항원전달 시스템은 poly(ethylene-co-vinyl alcohol)과 poly(methyl methacrylate)등 생체내에서 분해되지 않는 고분자를 사용하여 선행 연구 되었으나 그 부작용으로 인해 최근에는 생분해성, 생체적합성이 인정된 폴리락티드-

<sup>†</sup>본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
Tel : 02)820-5609, E-mail : ywchoi@cau.ac.kr

Table I—Comparison of Various Antigen Delivery Systems with Adjuvant Properties (Adopted from Ref. 2)

Antigen delivery system	Factor apparently responsible for long-term immune response	Period of immune response obtained
<b>Polymeric implants</b>		
Nonbiodegradable	Antigen delivered in an initial pulse release followed by a trickle of continuous delivery	Over 10 weeks
Biodegradable	Long-term sustained delivery of the antigen and adjuvant activity of the polymer used	Over 56 weeks
Lipid implant	Antigen delivered in an initial pulse release followed by a trickle of continuous delivery	Over 43 weeks
<b>Liposome</b>		
Containing Monophosphoryl lipid A and adsorbed to Al (OH) <sub>3</sub>	The adjuvant effects of the delivery system and monophosphoryl lipid A	Sole single-dose effect not studied
Encapsulated in microspheres	Depot effect of the microsphere-encapsulated liposomes	Over 21 weeks
A combination of microspheres of two sizes	Multiphasic pulse release of the antigen due to differences in size of the microspheres	Both primary and secondary responses

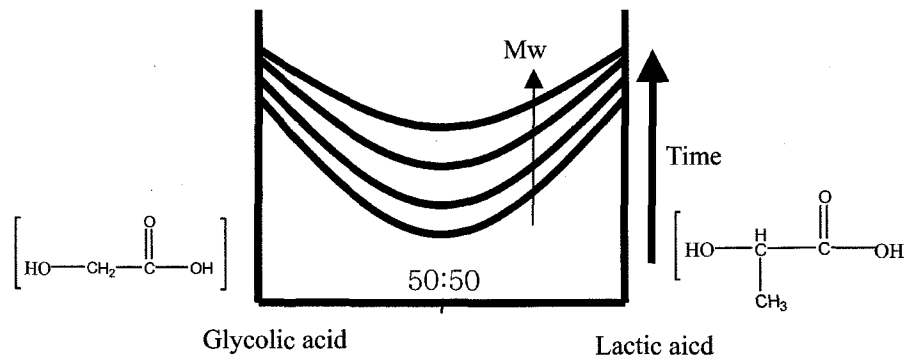


Figure 1—PLGA degradation rate according to molecular weight and glycolic acid and lactic acid ratio.

글리콜리드 (PLGA) 고분자를 사용하여 연구하고 있다. 이 고분자는 체내에서 lactic acid와 glycolic acid로 분해되며 이들은 CO<sub>2</sub>로 배출되므로 체내에 전혀 무해하여,<sup>9-10)</sup> 생체 적합성과 생분해성이 인정된 소재로 생분해기간 및 약물의 방출조절이 가능한 고분자이다. 공중합체 조성과 분자량, 미립구의 크기에 따라 조절이 가능하며 몇 주부터 몇 달까지 다양하게 조절할 수 있으며(Figure 1), adjuvant효과도 지니고 있어 면역능을 강화시킬 수도 있다. 이는 미립구가 병원균과 비슷한 크기이기 때문에 면역시스템은 미립구를 항원처럼 인식하게 되고 림프구의 포획과 macrophage에 의한 포획이 용이하기 때문이다. 나아가, 미립구의 표면에 흡착된 항원에 의해 초기면역능을 형성할 수 있고 세포매개성면역을 유도할 수 있어 cytotoxic T lymphocyte(CTL)을 유도한다.<sup>6-8)</sup> 항원을 봉입한 미립구가 면역계에 작용하는 메카니즘은 Figure 2와 같이 미립구로부터 방출된 항원이 정상적인 항원으로 작용하여 체액성 면역능을 일으키는 경로 뿐 아니라 미립구 자체가 adjuvant효과를 나타내어 세포매개성 면역을 나타내는 경로로 모두 작용하여 효과적인 면역능을 유발

할 수 있다.

PLGA미립구를 사용한 백신제제의 개발연구 경향을 살펴보면(Table II<sup>11)</sup>) 입자도와 *in vitro*방출과 같은 기본적인 연구를 토대로 연구초기에는 생분해 속도와 PLGA 고분자특성에 의존한 연구가 많았으며<sup>12)</sup> 최근에는 PLGA 미립구자체의 adjuvant나 입자도 미립구 표면의 특성 등 면역능 조절에 집중하고 있다.<sup>13)</sup> PLGA 고분자를 사용한 지속성 방출제형으로서 상용화된 경우는 Zoladex®(I.C.I.), Decapeptyl®(Debiopharm)등이 있으나<sup>14)</sup> 이들은 모두 펩타이드 및 단백질성 제제를 대상으로 하고 있으며, 실제로 단회접종백신이 제품으로 실용화된 예는 아직 보고되지 않은 실정이다. 항원을 봉입한 미립구들은 대부분은 항원 방출이 이상적으로 이루어지지 않기 때문에 결과적으로 생체내에서도 충분한 면역반응을 유도하지 못하게 되는 문제점이 있고 기존의 백신제제에 비해 낮은 면역능을 나타낸다고 많은 연구에서 보고되고 있다.<sup>15-17)</sup> 따라서 본 종설에서는 PLGA 미립구를 사용한 백신 제제 중 항원의 안정성 및 체내 안전성에 대한 내용, 미립구를 제조하는 방법들의 장단점을 살펴보고 나아가 미

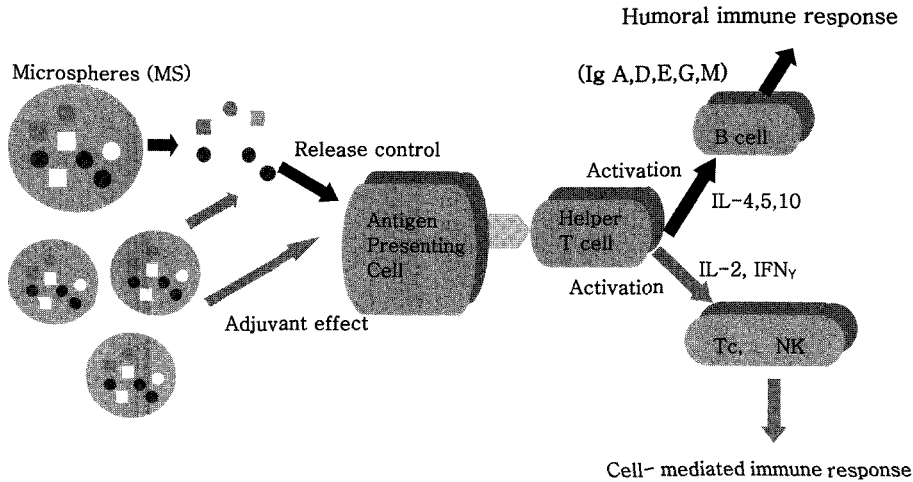


Figure 2—Ideal antigen delivery system.

Table II—Hypothetical Impact of Relevant Physicochemical Properties on the Immunogenicity of Microparticulate Vaccine (Adopted from Ref. 11)

Polymer(s)	Mean size	In vitro release profile
PLGA55:45, 40 kDa	45 μm	Not reported
PLGA 50:50, 100 kDa L-PLA, 3 kDa	9 – 55 μm (various)	Initial Pulse, then continuous
PLGA 50:50, 3 and 100 kDa PLA, 3 and 50 kDa	6 and 60 μm 9 and 60 μm	Pulsed with high MW polymers; initial pulse then continuous with low MW polymers
PLGA 50:50, 12 kDa PLGA 75:25, 17 kDa PLA, 130 kDa	<15 and >20 μm <15 and >15 μm 32 – 70 μm	Pulsed release as a result of combination of formulations

립구의 혼합을 통한 단위접종을 위한 연구내용등으로 분류하여 서술하였으며 미립구들의 면역능에 영향을 미치는 인자들을 포함하여 궁극적으로 높은 면역능을 얻을 수 있는 연구방법들을 제시하고자 한다.

### PLGA 미립구를 사용한 백신 제제의 안정성과 안전성

#### 미립구내 항원의 안정성

단회투여 접종은 1년 이상의 효과를 기대하는 경우가 많으므로 백신제제 개발에 있어서 최우선적으로 고려해야 하는 것은 미립구내 항원의 안정성이다. 그러나, 대부분의 경우 미립구 제조과정 중 유기용매의 사용과 발생하는 열로 인해 항원에 불안정성을 초래한다. 이를 극복하기 위해 spray drying, phase separation method, W/O/W emulsion method 등의 다양한 제조방법이 시도되고 있으며, chlorinated 계열 유기용매를 대신할 아세톤, 에칠아세테이트, ethyl formate 등이 활용되기도 한다. 그 중 에칠아세테이트를 이용하여 W/O/W emulsion법으로 제조한 미립구가 가장 안정한 것으로

알려져 있으며 잔류유기용매 측정, DSC, ELISA 등을 통해 항원의 안정성이 증명되고 있다.<sup>18-22)</sup>

또한, Hilbert 등<sup>23)</sup>은 PLGA미립구내 항원의 안정성을 높이기 위해 리포솜 내에 항원을 1차 봉입시킨 후 이를 다시 미립구에 봉입시키는 방법을 사용하였으나 항원의 방출이 더디어져서 면역능에서는 효과를 나타내지 못하였다. 보다 최근에는 항원의 안정성을 확보하면서도 면역능을 향상시키기 위해 여러가지 안정화제를 사용하기도 한다.<sup>24-29)</sup> Sanchez 등<sup>30)</sup>은 dextran, albumin, alginate, trehalose, NaCl, poloxamer, heparin을 안정화제로 사용하여 면역능을 평가하였는데 안정화제의 종류에 따라 면역능이 달라지고 안정화제의 선택이 항원을 PLGA 미립구에 봉입에 중요한 요인이 될 수 있음을 증명하였다. 또 다른 문헌에서는 saccharide를 안정화제로 첨가하여 좋은 결과를 얻었는데,<sup>31)</sup> 이는 분자량이 큰 saccharide가 미립구 내부 수상매질의 점도를 높여 항원을 보호해주는 역할을 하기 때문이다.

#### PLGA 미립구 백신 제제의 체내 안전성

Freund's complete adjuvant(FCA) 과 같이 오일에 기본을

둔 항원전달시스템은 인체에 사용하기에 너무 독성이 강하다. 이들은 잘 분해되지 않는 미네랄오일과 체내독성유발 물질을 내포하고있기 때문에 종종 육아종을 발생시킨다.<sup>32-33)</sup> 이에 비해 PLGA미립구는 상당히 인체에 안전한 것으로 알려져 있으나 PLGA가 분해되면서 주변을 산성화 시킨다는 점<sup>34)</sup>과 미립구제조시 사용되는 유기용매가 미립구내에 잔류할 수 있다는 점 등이 문제시 된다. 그러나 체내 투여시 분해산물이 축적되지 않고 계속하여 혈액중으로 씻겨나갈 수 있으므로 실질적으로 산성화는 큰 문제가 되지 않는다. 한 예로써 Park<sup>35)</sup>과 O'Hagan 등<sup>36)</sup>에 의하면 고분자 분해산물이 집중 부위에 남아있기 어려운 *in vivo*상태와 상당히 비슷한 조건인 dialysis bag이나 flow-through system을 이용하여 *in vitro* 방출실험하였을 때 매질의 pH값이 저하되지 않았다.

또 다른 문헌<sup>37)</sup>에서는 PLGA 미립구를 이용하여 HIV-1백신제제를 제조한 후 일반적인 안전성 평가, 발열시험, 독성 시험을 실시하여 체내 안전성을 예측하였다. 일반적인 안전성 평가에서는 흰쥐와 기니아피크 모든 동물이 부작용 없이 안전하게 생존하였으며 발열시험에서는 체온의 증가가 나타나는 토끼가 없었으며, 독성시험에서는 토끼에 미립구를 경구 투여하였을 때 부작용이 보고되지 않았으며, 동물의 모든 장기에서 투약 전 후 별다른 변화가 나타나지 않았다. Diwan 등<sup>38)</sup>은 미립구를 투여하여 면역접종 후 집중 부위에서 염증 등이 보이지 않았고 음식섭취나 행동면에서도 정상적이어서 별다른 부작용을 발견하지 못하였다.

## 미립구 제조에 사용되는 고분자소재 및 제조방법

### 생분해성 고분자

체내 투여를 위해서는 생분해성이면서 독성이 없는 고분자를 사용해야 하며 동시에 수술적 제거가 필요없고, 방출속도의 조절이 가능해야한다. 고분자 소재 선택에 있어서는 높은 장력강도, 분해속도의 조절, 소수성의 조절 등이 고려되어야 하며 그 외에도 고분자 체인 선형성, 분자량, 단위체의 비율 등이 고분자의 특성을 결정짓는다.<sup>38)</sup>

생분해성 고분자는 합성고분자와 천연고분자로 나눌 수 있는데 그중 합성 고분자로는 polyorthoesters, polyanhydrides, polyamides, polyalkylcyanoacrylates, polyester(lactides/glycolides), polycaprolactones, polyphosphazenes, pseudo-polyaminoacid 등이 있다.<sup>39)</sup> 이 중 미립구 제조에 가장 빈번이 사용되는 고분자는 polyester고분자이다. PLGA의 분해속도는 고분자 분자량, 매트릭스의 기포화 정도, 매트릭스의 소수성 정도, 고분자 기본구조의 순서나 비율과 같은 요인들에 의존하여 달라지며 1년 이상 장기적인 단백질 방출도

가능하게 한다.<sup>40)</sup> 이와 같은 장점으로 인해 수많은 연구에서<sup>41-45)</sup> 단백질을 봉입한 미립구를 제조할 때 PLGA를 가장 많이 사용하고 있다.

천연고분자로는 알부민, 젤라틴, 콜라겐, 카세인등의 단백질과, starch, cellulose, chitosan, alginic acid, dextran등의 polysaccharides등이 있다. Bowersock 등<sup>46)</sup>은 alginate를 미립구 고분자로 사용하여 OVA를 미립구에 봉입시키고 그 면역능을 평가하였을 때, 기존 제제와 거의 유사한 면역능을 나타내었다고 주장하였다. Alginate는 키토산과 더불어 경구용 백신제제의 제조에 많이 사용되는데, 이들 고분자들은 자체 점성이 있어 위장관내 장벽에 잘 부착 할 수 있기 때문이다. 그러나 일반적으로 alginate로 제조된 미립구는 PLGA를 사용한 것보다 덜 효과적인 것으로 알려졌다. 이는 항원제시 세포에 alginate 미립구의 접근이 좀더 어렵기 때문이다.<sup>47)</sup>

### 미립구 제조방법

미립구 제조방법은 통상 세가지 방법으로 분류된다.: W/O/W 방법, 상 분리방법(phase separation), spray drying.<sup>48)</sup> 고속의 파쇄기나 초음파분쇄기를 사용하여 항원이나 단백질을 함유한 수상을 고분자 유기용매에 분산시켜 W/O 에멀전을 형성시킨후 다시 과량의 수상에 가하여 미립구를 형성시키거나 실리콘 오일과 같은 비유기용매에 고분자를 녹여 고분자의 coacervation을 유도하여 미립구를 형성시킨다. 첫번째 과정은 주로 W/O/W 방법<sup>49)</sup>에서 사용되는 반면 후자는 상분리 방법<sup>50)</sup>에서 주로 사용된다. 이 두가지 경우 모두 지질층에서 미립구가 형성된다는 공통점을 가지고 있으나 무리한 힘을 가해서 열이 발생한다는 점과 항원이 유기용매에 오랫동안 노출된다는 점, 그리고 안정적인 분말을 얻기 위해 동결건조과정이 필요하다는 점등이 단점으로 지적되고 있고 결과적으로는 항원능을 감소시키게 된다.

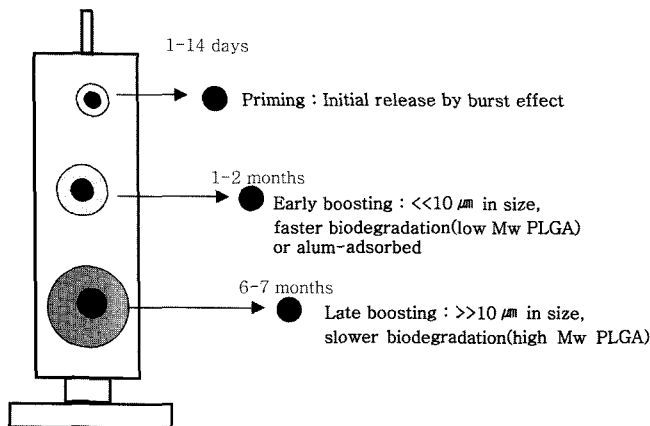
이런 점들을 보완하기 위해 spray drying방법이 사용되기도 한다. 이방법은 폴리머와 항원의 에멀전을 에어로졸화하여 microdroplets를 생성시키고 뜨거운 공기를 짧게 쏘여주어 고형화시키는 것인데 제조관점에서 한단계로 제조가 완성된다는 점과 실질적으로 대량화시킬 수 있다는 장점이 있다.<sup>51)</sup> 또한 동결건조 과정 없이도 안정화된 분말을 얻을 수 있으며 분무 건조시 유기용매가 빨리 증발하므로, 미립구의 온도는 더운공기의 온도 이하로 유지될 수 있어서,<sup>52)</sup> 온도에 민감한 물질들에 적용 할 수 있다. 여러 연구에서<sup>53-55)</sup> 이미 spray-drying법을 사용하여 미립구를 제조하였을 경우 좋은 면역능을 나타내었고 Baras 등<sup>56)</sup>도 역시 PLGA 50:50 고분자를 디클로로메탄에 녹인 후 글루타치온을 저분자량 모델로써 봉입시켰는데 모든 미립구에서 항원의 변성이 일어나

지 않았음을 SDS-PAGE를 통해 확인하였고 면역능 역시 고분자의 분자량에 따라 조금씩 차이는 있으나 대체적으로 지속적인 면역능을 나타낸다고 보고하였다.

그러나 spray drying방법은 대량의 항원이 필요하여 실험실적인 연구에는 적합하지 않아 보통 연구에서 주로 사용되는 방법은 W/O/W 방법을 선택하고 있으며 이 방법이 가지고 있는 문제 점들을 보완하기 위해 유기용매의 선택, homogenization의 속도조절, 안정화제의 첨가 등을 중심으로 여러 요소들을 조절하고 있다.<sup>57-58)</sup> Song 등<sup>59)</sup>과 Cho 등<sup>60)</sup>은 OVA를 모델 항원으로 위의 요인들을 조절하여 미립구를 제조하고 항원의 안정성을 평가하였다. 유기용매로는 dichloromethane과 ethyl acetate를 사용하였고, 유기용매를 제거하는 방법은 용매증발(solvent evaporation)과 용매추출(solvent extraction)방법 두가지를 비교하였다. 또한 최위상 용적의 비율과 교반 속도등에 대해서도 연구하였다. 유기용매 제거방법에 있어서 입자도에는 차이가 있었으나 항원의 안정성 면에서는 별 차이를 나타내지 않았으며 유기용매의 선택은 많은 영향을 초래하였다. Ethyl acetate를 사용하였을 경우는 항원의 안정성이 확보되었으나 dichloromethane을 사용하였을 경우는 그 안정성이 크게 낮아짐을 CD, DSC, ELISA 등을 통해 확인하였다.

**단회 접종 백신 제제화 방법**

제 접종을 해야 되는 시기에 저절로 항원이 방출되어 면역계를 자극하는 일련의 방법을 autobosting이라고 하며 이러한 효과를 노리기 위해 서로 다른 시기에 항원을 방출시키는 미립구들을 혼합투여하는 방법이 선택되기도 한다 (Figure 3). 미립구에서 항원을 방출하는 시기는 대체적으로



**Figure 3**—Strategy for release control in the aspect of particle size and biodegradation of the PLGA microspheres.

PLGA 미립구가 분해되는 시기와 비슷하며 미립구의 분해속도를 조절하는 요소에는 미립구의 입자도, PLGA의 조성비율 그리고 PLGA 분자량 등이 있다.

**서로 다른 입자도를 갖는 미립구들의 혼합**

미립구의 분해속도는 미립구의 입자도에 따라 달라진다. 일반적으로 작은 입자도를 갖는 미립구는 빠르게 분해되어 초기 1-2달 이내에 항원을 방출하며 면역능을 높이고 큰 입자도를 갖는 미립구는 3달 이상의 기간내에서 분해되는 특성을 갖는다. 이 두가지를 적절히 혼합하면 초기에는 작은 입자도를 갖는 미립구에 의해 면역능이 발생할 것이며 boosting이 가해져야 할 시점에서는 큰 입자도를 갖는 미립구에 의해 면역능이 발생해서 추가적인 접종없이도 autobosting이 이루어질 수 있다.

Figure 4는 이러한 양상을 잘 보여주고 있다.<sup>61)</sup> 왼쪽의 그래프는 작은 입자도와 큰 입자도를 가지는 미립구를 각각 따로 투여하였을 경우로 기존 제제에 비해 면역능이 떨어지는 반면, 오른쪽 그림처럼 입자도가 다른 두가지 미립구를 혼합하여 투여하였을 경우 단회 투여로서의 개발 가능성을 보여주고 있다. Raghuvanshi 등<sup>62)</sup>은 파상풍균을 봉입하고 있는 나노입자와 마이크로입자를 각각 15Lf용량으로 혼합하여 흰쥐에 투여할 때 기존의 백신보다는 낮은 면역능을 나타내었지만 150일 이상의 지속적인 면역능을 관찰하였다.

입자도를 조절하는 방법으로는 제조방법이나 제조과정을 제어하는 것이 가장 일반적이지만 사용하는 고분자를 달리하여 입자도를 조절하는 방법도 사용된다. Johansen 등<sup>63)</sup>도 사용되는 고분자와 제조방법을 달리하여 입자도를 조절하였다. 같은 고분자(PLGA 50)에 대해 spray drying, coacervation, solvent evaporation방법에 따라 각각 1-5 μm, 10-90 μm, 5-30 μm 입자를 나타내었다. 또한 spray drying의 동일한 제조방법으로 각기 다른 고분자(PLGA 50과 PLA)를 사용했을 경우 PLGA 50은 1-5 μm, PLA는 10-90 μm를 나타내었다. 이와 같이 사용되는 고분자, 제조방법 등에 따라 입자도를 다르게 조절할 수 있다.

Men 등<sup>87)</sup>은 입자도가 다른 미립구 세가지를 혼합하여 기존 백신과 거의 동등한 효과를 얻었다고 주장하였다. Spray dry 방법과 coacervation 방법을 이용하여 입자도를 조절하였고 또한 미립구 제조에 사용하는 고분자를 PLGA 50과 PLGA 75, PLA 세가지를 사용하여 입자도에 변화를 주었다. PLGA 50을 이용하여 spray dry방법으로 제조한 미립구는 15 μm 이하의 입자도를 나타내었고, PLGA 75를 이용하여 coacervation방법으로 제조한 미립구는 80 μm정도의 입자도를 나타내었으며, PLA를 이용하여 coacervation방법으로

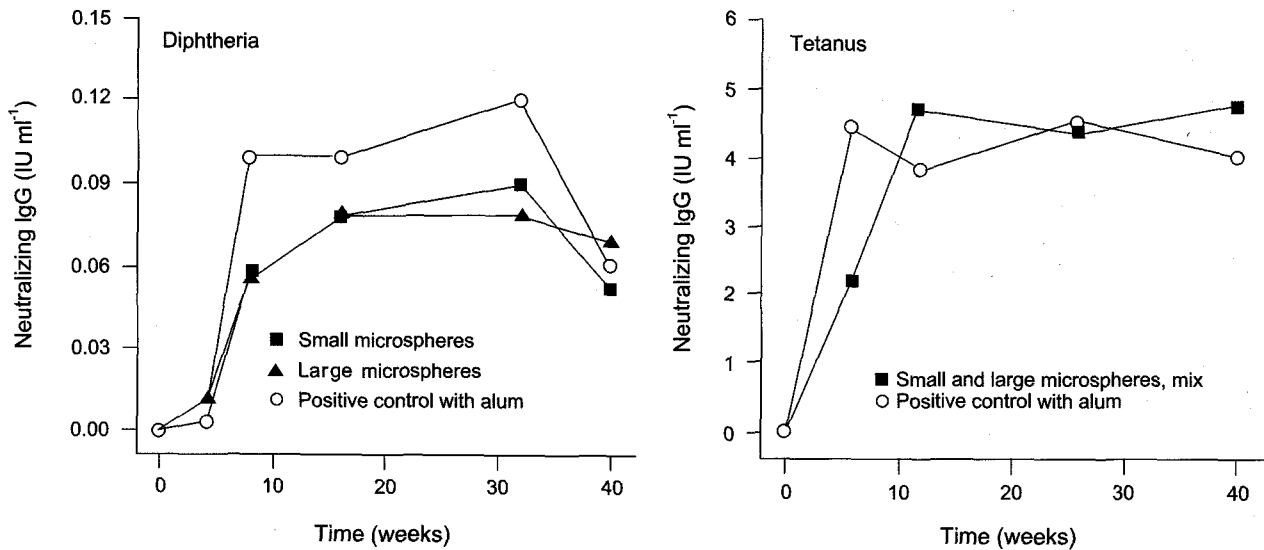


Figure 4—Examples to mimic multiple vaccination schedule by mixing microspheres of different particle size (Adopted from Ref. 61).

제조한 미립구는 그 중간정도의 입자도를 나타내었다. 흰쥐에 투여 후 T 세포증식반응을 관찰한 결과 10일 동안은 작은 입자도의 미립구에 의해 강한 증식을 나타내었고 21일부터는 점점 큰 입자의 미립구에 기인한 증식이 증가하였다. 30  $\mu\text{m}$  보다 작은 입자도의 미립구는 비특이적으로 식작용을 받아서 초기에 높은 면역능을 나타내며, 항원을 빨리 방출하여 림프계를 초기에 자극시켜 10일 이내에 면역능을 나타내었다. 작은 입자도, 중간 입자도, 그리고 큰 입자도의 세가지 미립구를 혼합하여 단회투여하였을 때 45일 후까지도 높은 면역능이 유지되었다. 이는 alum흡착백신을 3회 투여하는 기존 백신과 거의 동등한 효과를 나타내었다.

다른 문헌<sup>64)</sup>에서는 30  $\mu\text{g}$ 의 HBsAg를 봉입한 PLGA 100, PLGA 50, PLGA 85 세가지 고분자를 이용하여 제조한 미립구들을 혼합하였다. PLGA 100은 입자도가 26–37  $\mu\text{m}$ 로 입자도가 큰 미립구로, PLGA 50과 85는 0.35–0.88  $\mu\text{m}$ 로 입자도가 작은 미립구로 사용되었다. 그리고 10  $\mu\text{g}$ 의 HbsAg을 alum에 흡착시켜 0, 1, 6달에 각각 투여하였다. 투여 1년 후 비교하였을 때 초기에는 alum흡착백신이 상대적으로 상당히 높은 면역능을 나타내었으나 후반기에는 혼합 미립구가 동등이상의 효과를 나타냄으로써 미립구의 혼합이 단회접종백신으로 가능성이 있다고 주장하였다.

#### 조성이 다른 PLGA를 이용하여 제조한 미립구들의 혼합

PLGA는 lactide/glycolide의 혼합 고분자이며 그 구성비율에 따라 특성이 달라지는데 lactic acid의 비율이 증가할수록 소수성이 강해진다. PLGA 50:50보다는 PLGA 75:25가 그리고 PLGA 75:25보다는 PLA(PLGA100)가 훨씬 더 소수

성을 나타낸다. 이렇게 소수성이 강해질수록 분해속도는 더 더러지며 따라서 PLGA 50:50은 가장 빠른분해를 나타내므로 초기면역능을 상대적으로 강하게 유발시킬 수 있고 PLGA 75:25나 PLA는 후기면역능에 유리하게 관여할 수 있다. 이렇게 분해되는 속도가 다르므로 이를 이용하여 autoboosting을 시도할 수 있게된다.

Johansen 등<sup>65)</sup>은 PLGA 50과 PLA를 사용한 미립구들을 혼합하였다. 디프테리아 백신제제로써 PLGA50은 초기면역능에 관여하고 PLA는 후기 면역능에 관여할 것으로 예상하고 기니피에 혼합미립구와 단독미립구를 투여하고 alum흡착백신을 2회 투여한 것과 그 효과를 비교하였다. 총 40주에 걸쳐 중화항체역가(neutralising antibody titers)를 측정할 결과 단독 미립구들은 40주까지 protective antibody level에 도달하지 못한 반면 혼합미립구와 alum흡착백신은 초기부터 protective antibody level을 넘어서서 32주까지 그 면역능을 유지하여 혼합미립구가 지속적이고 강력한 효과를 지니는 것을 확인하였다.

Rosas 등<sup>66)</sup>은 SPf66 말라리아 균을 봉입한 PLGA 미립구를 제조하여 면역능을 실험하였다. PLGA 50과 PLGA 75 두 가지를 사용하여 두 가지 미립구를 제조한 후 서로 다른 비율로 혼합하여 Aotus monkey에 투여하였다. PLGA 50:50과 PLGA 75:25의 비율을 1:1, 2:1, 1:2의 비율로 달리하여 혼합한 결과 1:2가 가장 우수한 효과를 나타내었고 이는 alum흡착백신과 비교하였을 때 초기 30일까지는 동등한 효과를 나타내었고 40일 이후 120일까지 기존백신보다 훨씬 높은 면역능을 유지하였다. Singh 등<sup>67)</sup>의 연구에서는 파상풍균을 PLGA 50:50과 PLA에 각각 봉입하여 투여하였

을 때 단독으로는 기존 백신제제보다 낮은 면역능을 나타내었지만 두 가지를 혼합하여 투여하였을 경우는 상당히 높은 면역능을 나타냄을 제시하였다. 이러한 결과는 PLGA 50:50은 고분자가 쉽게 분해되어 보다 빨리 항원을 방출하는 반면 PLA의 소수성으로 인해 고분자의 분해가 늦기 때문이다. 따라서 이상적인 단회접종 백신의 개발은 조성이 다른 미립구를 혼합하는 것이라고 주장하고 있다.

**분자량이 다른 PLGA 미립구의 혼합**

같은 조성을 갖는 PLGA고분자라 할지라도 그 분자량에 따라서 분해속도가 달라진다. 작은 분자량을 갖는 경우가 훨씬 빠른 분해속도를 가지며 분자량이 클 경우 상대적으로 그 분해속도가 늦다. 이는 저분자량 PLGA일수록 고분자가 갖는 고유의 Tg값이 37°C 근처로 체온과 비슷하여 빨리 녹기 때문이다.<sup>68)</sup>

Raghuvanshi 등<sup>62)</sup>은 PLGA 50:50을 저분자량(14 kD)과 고분자량(45 kD)을 사용하여 미립구를 제조하였을때 입자도에는 차이가 없었으나 고분자량 PLGA를 사용한 미립구보다 저분자량 미립구가 훨씬 높은 면역능을 나타낸다고 보고하였다. 이는 저분자량 PLGA가 39°C 정도의 낮은 유리 전이 온도(Tg)값을 가지고 있어 체온에서 고분자 매트릭스를 부드럽게 하여 보다 빨리 항원을 방출시킬 수 있기 때문이다. 저분자량 고분자 미립구의 빠른 분해는 결과적으로 항원들이 항원제시세포에 빨리 노출될 수 있게 한다.

**PLGA 미립구 백신의 면역능에 영향을 미치는 인자**

미립구 백신 제제에서 면역능에 영향을 주는 인자들에 대해 Table III에 정리하였다.<sup>69)</sup> 여기서는 표면항원, 미립구 표면의 특성, 첨가제에 따라서 어떻게 면역능에 영향을 주는지에 대해 알아보았다.

**표면 항원**

미립구를 이용한 백신제제 개발에 있어 문제점 중의 하나는 초기 면역능이 낮다는 점이다. 미립구내에 봉입된 항원만 이 면역능에 기여하는 것은 아니고 미립구 표면에 흡착된 항원 역시 면역능을 유발시킬수 있기 때문에<sup>70)</sup> 미립구의 표면에 항원을 많이 존재하게 하여 초기에 항원방출을 높이는 방법이 제시되고 있다. 또한 높은 초기면역능은 많은 기억세포를 생성하게 되어 후에 추가 자극이 적더라도 강하고 지속적인 면역능을 확보할 수 있다는 장점을 갖는다. 미립구로부터 항원의 방출을 단계적으로 살펴보면 초기 표면에 존재하는 표면항원이 먼저 방출되고 이에 따라 생성하는 pore를 통해 방출매질이 스며들면서 고분자가 분해되기 시작하면서 미립구 내에 존재하는 항원이 방출된다.<sup>71)</sup> 이러한 단계에 따라 통상적으로 표면항원의 방출은 초기 면역능에 관여하는 것으로 알려져 있고 따라서 초기면역능을 높이기 위한 방법으로 표면항원의 증가가 제시되고 있다.

표면항원을 높이는 방법에는 이미 제조된 미립구를 항원에 다시 노출시켜 표면에 흡착되게 하는 방법이 가장 많이 제시되고 있고,<sup>72-75)</sup> 또한 미립구 표면의 특성을 달리하여 표면항원의 양을 증가시키는 방법도 제시되고있다. Coombes 등<sup>15)</sup>은 공 PLGA 미립구를 제조한 후 OVA 용액에 상온에서 24시간 동안 잘 반응시켜 공 미립구 표면에 단백질 흡착되도록 하였다. 알부민을 표면에 흡착시킨 PLGA 50:50 공 미립구나 PLGA 75:25 공 미립구는 알부민을 봉입한 PLGA 미립구에 비해 매우 낮은 IgG값을 나타내었다. 이는 흡착된 항원이 방출된 이후 지속적인 항원의 방출이 없어 일시적인 자극에만 머물렀기 때문이다. 또 다른 보고에서는<sup>76)</sup> 알부민을 PLA미립구에 흡착시켜보았는데 그 기전은 알부민과 같은 단백질의 전하와 기질사이의 소수결합과 van der Waals 작용 때문인 것으로 해석하고 있으며 이 경우도 기존 제제에 비해 면역능이 떨어졌다.

이런 점들을 보완하기 위해 최근에는 미립구 표면의 특성

**Table III—Hypothetical Impact of Relevant Physicochemical Properties on the Immunogenicity of PLGA Microsphere(MS) Vaccine (Adopted from Ref. 69)**

MS size	MS typically <10 μm : Uptake by APC, which enhances stimulation of primary and MHD-restricted responses (also cytotoxic T lymphocyte)	MS typically >10 μm : Ag release to extracellular fluid for secondary Ab responses; Recruitment of APC for possibly direct Ag transfer into APC, or disintegration and subsequent uptake by APC
MS surface properties	Hydrophobic MS : recruit possibly more phagocytosing cells than hydrophilic MS	Morphology and surface coatings possibly influence interaction with phagocytosing cells
Antigen(Ag) contents in MS	High Ag contents may produce Th2-responses, but poor maturation	Low Ag contents (high amounts of MS) may limit the transport rate to secondary lymphatic tissue
Ag release kinetics from MS	A short initial Ag burst release, possibly followed by timely separated pulses of additional Ag doses, may be advantageous, if memory cells are long-lived	Continuous or pulsatile Ag release may be appropriate, if memory cells need re-stimulation

을 변화시켜 표면에 존재하는 항원의 양을 증가시키는 방법 등을 선택하고 있다. Rafati 등<sup>77)</sup>은 Tagat, bile salt, PVA를 사용하여 미립구 표면의 특성, 즉, 소수성, 전하, 화학적 구조 등을 변화시킴으로써 표면항원의 양에 변화를 주었다. 이 결과 단순 흡착시켰을 때와는 달리 첨가제들의 작용으로 인해 처음 24시간이내 급속한 방출(burst phase)은 일으키지 않으면서도 초기 방출(initial phase)의 양을 증가시켜 첨가제를 가하지 않은 미립구보다 훨씬 좋은 면역능이 나타남을 관찰하였다.

### 미립구 표면의 특성

일반적으로 소수성이 면역계를 더욱 자극하는 것으로 알려져 있는데 이는 소수성 물질일수록 항원제시세포에 접근이 용이하여 macrophage에 의한 phagocytosis가 쉽게 일어나기 때문이다. 이와 같은 개념을 이용하여 미립구에 사용되는 고분자의 특성을 보다 소수성인 것으로 사용하여 면역능을 높이고 있다. 즉 같은 PLGA라 할지라도 PLGA 50보다는 PLGA 75이 그리고 PLA가 더 소수성을 나타내므로 보다 면역능 유발에 유리하다 할 수 있다. 소수성을 갖는 고분자가 면역능 유도면에서 유리하다는 사실은 인플루엔자 백신,<sup>23)</sup> 알부민,<sup>78)</sup> 파상풍 백신<sup>79)</sup> 등에서 보고되고 있다. Raghuvanshi 등<sup>62)</sup>은 PLGA 50:50과 PLA를 사용하여 미립구를 제조하였을 때 PLA를 사용한 미립구가 2배정도 높은 면역능을 나타남을 관찰하였다. PLA는 lactic acid의 메칠기로 인해 더욱 소수성을 나타내며 이러한 소수성 때문에 항원제시세포에 더욱 잘 노출 될 수 있다.

그러나 Kissel 등<sup>48)</sup>은 친수성 고분자의 경우 더 면역능에 유리한 점을 제시하고 있다. Polyethyleneoxide과 PLGA 두 가지를 결합시켜 ABA 형태의 고분자를 사용하였을 때 PLGA를 단독으로 사용하였을 때보다 더욱 우수한 효과를 나타남을 증명하였고, Jung 등은<sup>80)</sup> polyoxyethylene과 PLGA를 사용하여 ABA triblock-copolymer에 항원을 봉입시켰을 때와 PLGA 75, PLGA 50을 사용하여 미립구를 제조하고 흰쥐에 투여하였을 때 그 면역능에는 차이가 없이 거의 비슷한 면역능을 관찰하였다. 이들은 친수성 도메인을 가지고 있는 생분해성 고분자가 항원의 안정성면에서 유리하고 *in vivo* 조건하에서 항원의 방출에도 유리하기 때문이라고 주장하고 있다. 위와 같은 주장을 뒷받침하는 논문들<sup>81-84)</sup>에서는 다음과 같은 이유로 친수성고분자가 더욱 유리하다고 주장하고 있다. 첫째로, 일반적인 PLGA는 소수성이며 bulk erosion이므로 항원의 방출이 더디게 되어 단회투여백신에 적합하지 않다고 주장하고 있다.<sup>80)</sup> 두번째로는 고분자 분해과정 중 미립구 내에 pH를 산성화시켜 항원의 안정성에 영향을 줄 수 있는

점인데, 한 연구에서 pH 7이하에 항원을 노출시켰을 경우 확연하게 항원의 활성이 감소됨이 확인되었다.<sup>85)</sup>

### 첨가제

미립구 백신의 면역능은 adjuvant효능을 갖는 투여매질 또는 adjuvants의 미립구내 봉입등을 통해 향상될 수 있다.<sup>86)</sup> Rajeev 등<sup>62)</sup>은 PLGA 미립구와 squalene 에멀전을 함께 투여하였는데 파상풍균을 15L(함유하는 고분자입자를 squalene 에 분산시켰을 때 입자자체 보다 매우 높은 항체반응을 나타내었다. 기존백신제제로 2회 투여하였을 때 보다는 낮았지만 단독으로 입자만 투여하였을 때 보다는 높은 항체 역가를 나타내었다.

다른 문헌<sup>25)</sup>에서는 MF59 에멀전에 항원을 분산시켜 미립구를 제조하였다. 이렇게 형성된 미립구는 일반적인 미립구에 비해 상당히 높은 면역능을 유도하였으며 특히 HIV-1 p24 gag에 대한 CTL작용을 매우 높게 유도하였다. 그러나 MF59자체만을 투여하였을 경우는 매우 저조한 면역능을 나타내었다. 이 이유에 대해서는 아직 밝혀지지 않았지만, 적절한 adjuvant의 활용이 중요함을 알 수 있다.

## 미립구 백신의 면역학적 특성 평가

미립구 백신은 체액성 면역과 세포매개성 면역을 모두 유발시킬 수 있으므로, 두가지 면역반응을 모두 평가할 필요가 있다. 최근 *in vivo*에 관한 연구 내용들에서는<sup>87-94)</sup> 대부분이 두가지 부분을 모두 평가하고 있다.

### 체액성 면역 반응 평가

면역원에 대한 B세포의 반응은 체액성 면역반응에 의해만 들어지는 특이적인 항체를 분석하여 측정할 수 있다. 항체 반응의 가장 중요한 특징으로는 특이성(specificity), 양(amount), class 또는 개별 형(isotype) 및 항체의 친화력(affinity)등이 있다. 특이성이라고 하는 것은 항체가 특이적인 항원을 구분할 수 있는 능력을 말한다. 항체의 양은 여러가지 방법으로 측정할 수 있으며, 이것은 항체를 생산하는 B세포의 수와 그들의 생산속도 및 생산된 항체의 지속성 등에 영향을 받는다. 마지막으로 항체의 항원에 대한 결합력을 이 항체의 친화력이라하며 이 항체의 친화력은 면역반응에 있어 매우 중요하다. 일반적으로 사용되는 대표적인 두 가지 방법은 방사면역 측정법(radioimmunoassay)과 효소면역측정법(ELISA), 중화능 측정법, 첼린지 테스트 등이다.<sup>95)</sup>

가장 많이 사용되는 방법은 항원 특이성 항체를 주로 solid-phase immunoassay(SPIA)방법을 이용하여 정량하고



있고 항체의 양은 일반적으로 단계적인 희석을 통한 항혈청의 적정 후에 항원 결합반응을 통해 결정된다. 이때 최고 반응농도의 50%가 되는 항체의 희석농도를 그 항혈청의 역가(titer)라고 부른다. 특히, 효소반응을 응용한 SPIA를 효소면역측정법이라고 부르며 이것은 표준항체에 의해 생성된 것과 시험용 항체의 반응 수준을 직접 비교하여 평가한다. 이 실험방법 중 결합한 것과 유리되어 있는 것을 제대로 분리하지 못하면 데이터에 오차를 가져올 수 있어 이를 극복하기 위해 경쟁적 효소면역측정법이 선택되기도 하고, 보다 최근에는 이것 이외에 중화능 측정과 챌린지 테스트를 함께 병행하는 경우도 많다.<sup>96-97)</sup>

Singh 등<sup>98)</sup>에는 소동물에서는 직접 챌린지 테스트를 실시하기 어려우므로 경쟁적 효소면역측정법을 사용하였는데 hepatitis B 바이러스를 미립구에 봉입시킨 후 투여하고 HbsAg의 중화부위에 대한 단클론항원을 사용하여 경쟁적 효소면역을 측정법을 활용하였다. Yan 등<sup>99)</sup>은 ricin toxoid(RT)를 PLGA미립구에 봉입시킨 후 그 면역능을 평가하는 방법으로 ELISA와 동시에 챌린지 테스트를 실행하였다. ELISA는 IgG2a에 대하여 40주 동안 항원의 역가를 측정하였고, 챌린지 테스트로는 미립구에 봉입된 50 µg의 RT를 투여하여 면역을 유발시키고 6주 후에 치사량인 60 µg/kg을 투여하여 생존여부를 확인하였다. 여러 문헌에서 사실상 실험대상이 된 미립구에 봉입된 항원에서, 체액성 반응은 모두 우수하고 오랫동안 유지 되었다. 항체의 중화능에서는 모두 성공적이었고 몇몇 챌린지테스트는 그 가능성을 보여주었다.

### 세포매개성 면역 반응의 평가

세포매개성 면역능을 평가하는 방법으로는 주로, T 세포 증식 평가(T-cell proliferation assay), 효과 T 세포 반응 평가(Th-responses, CTL-response), 싸이토카인 생성측정(cytokine production) 등이 사용된다. 다클론 마이토젠에 의한 T 세포의 증식능력을 검사하는 림프구 기능검사는 매우 유용한 방법이다. 이것은 면역 후 T세포 반응을 평가하는 가장 일반적인 방법이며 항원을 투여한 후 동물의 림프절이나 비장에서 나오는 T 세포를 가지고 항원 특이적인 T 세포의 증식을 세포 배양액에서 <sup>3</sup>H-thymidine 소비량으로 측정하는 것이다. Ertl 등<sup>100)</sup>은 흰쥐에 봉입된 항원을 투여후 림프절의 T 세포 뿐 아니라 비장의 T 세포도 증식됨을 보고하였고, Johansen 등<sup>87)</sup>은 파상풍 독소이드를 봉입한 미립구를 흰쥐에 투여한 후 림프절세포에서 강하고 지속적인 T 세포 증식을 관찰하였다. 반대로 Walker<sup>101)</sup>는 동일한 조건에서 T 세포 증식이 매우 저조함을 관찰하였다.

T 세포의 생성은 항원을 전달하는 표적 세포에 영향을 주

는 것, 혹은 표적세포에 작용하는 싸이토카인을 분비하는 것으로 감지된다. 이러한 효과 세포의 기능을 측정하는 것이 T 세포의 항원에 대한 특이성이나 효과 기능을 평가하는데 사용되는 T 세포에 대한 생물학적 검사방법의 기본이다. 활성화된 CD8 T 세포는 그들이 인식하는 MHC class I과 펩티드의 복합체를 가지는 세포는 모두 죽인다. 그러므로, CD8 T세포의 기능은 가장 빠르고 간단한 T세포 생물학적 활성 측정법인 세포독성 T세포에 의한 표적 세포 살상력 검증으로 쉽게 알 수 있다. O'Hagan 등<sup>25)</sup>은 HIV-1이 특히 CD8<sup>+</sup>에 특이성이 있음에 착안하여 미립구의 면역능을 CTL 반응으로 평가하였다.

CD4 T 세포들은 일반적으로 CD4세포에 특이적인 펩티드와 MHC class II 복합체를 가지는 세포들을 활성화시키는 역할을 한다. CD4 T 세포는 T세포가 항원을 인식하였을 때 분비하는 싸이토카인이라고 하는 비 특이적 매개 단백질로 B세포나 식세포를 활성화시키므로 CD4 T 세포의 활성을 연구하기 위하여는 주로 이들이 분비하는 싸이토카인의 종류와 양을 측정한다. 다양한 T 세포들은 서로 다른 싸이토카인을 다양한 농도로 분비하기 때문에 이들을 측정함으로써 T세포의 기능에 대해 연구가 가능하다. T 세포의 싸이토카인 생성을 측정한 실험들을 살펴보면, HIV gp120, OVA 등을 봉입한 미립구들에서는 인터페론 감마가 많이 생성되었고 interleukin-4, interleukin-10은 매우 소량 측정되었다. 이는 Th-1반응이 일어난 것이라고 주장하였고, 반대로 Igartua 등<sup>102)</sup>은 BSA를 봉입한 미립구가 Th2 반응이 일어남을 관찰하였다.

### 앞으로의 전망

이 외에도 현재 진행 중이면서 앞으로도 연구되어야 할 분야는 여러가지 항원을 함께 투여할 수 있는 혼합백신제제와 경구투여용 백신제제의 개발 등이다. 혼합백신제제에 대한 연구가 현재 몇몇 연구자들에 의해 진행 되고 있으나 아직은 혼합백신제제의 개발에는 한계점에 부딪치고 있는 실정이다. 한 예로, Xing 등<sup>103)</sup>은 디프테리아 균과 파상풍균을 함께 미립구내에 봉입시켜 면역능을 측정하여 보았으나 단독항원을 봉입하였을 때보다 훨씬 낮은 면역능을 나타내었다. 이는 두 항원들 사이에 상호경쟁 때문인 것으로 주장하고 있다. 이러한 부분들을 극복하는 방법을 찾아내어 혼합백신으로써의 가능성도 검토해 보아야 할 과제이다.

또한, 백신의 특성상 불특정 다수의 사람들에게 투여해야 한다는 점에서 주사제 사용에는 한계가 있고 보다 편리하고 투여하기 쉬운 경구용 제제로의 개발이 필요하다. 그러나 항

원을 봉입한 미립구는 위장관을 통해 잘 흡수 되지 않아 여러가지 방법으로 연구가 진행 중이다. 예를 들어 점막부착성이 있는 고분자를 사용하여 Peyer's patch 부근의 장관벽에 잘 부착되게 하여 백신의 생체이용률을 높일 수 있는 방법들도 연구중이다.<sup>104)</sup>

위 연구들과 같이 적절한 고분자의 선택, 입자도 조절, 적절한 접종 프로토콜 등은 단회접종 백신 개발에 매우 중요한 인자라고 할 수 있다. 이러한 연구들을 토대로 사용되는 항원의 특성과 목표로 하는 면역능 기간을 고려하여 백신제제를 제조한다면 보다 효과적인 면역능을 획득할 수 있을 뿐만 아니라 나아가 단회접종 백신을 개발 할 수 있을 것으로 기대한다.

## 감사의 글

본 논문은 보건복지부 신약개발지원사업 연구비(단독기초 : 과제번호 01-PJ1-PG3-21700-0009)의 일부 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## 문헌

- 1) M. Singh and D.T. O'Hagan, Recent advances in vaccine adjuvants, *Pharm. Res.*, **19**, 715-728 (2002).
- 2) M. Zahiru, I. Khan, J.P. Opdebeeck and I.G. Tucker, Immunopotential and delivery systems for antigens for single-step immunization: Recent trends and progress, *Pharm. Res.*, **11**, 2-10 (1994).
- 3) S. Wright and L. Huang, Antibody-directed liposomes as drug delivery vehicles, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **3**, 343-389 (1989).
- 4) N. van Rooijen, Liposomes as carrier and immunoadjuvant of vaccine antigens, *Adv. Biotechnol. Process*, **13**, 255-279 (1990).
- 5) C.R. Alving, Liposomes as carriers of antigens and adjuvants, *J. Immunol. Methods*, **140**, 1-13 (1991).
- 6) D.F. Nixon, C. Hioe, P.D. Chen, Z. Bian, P. Kuebler, M.L. Li, H. Aiu, X.N. Li, M. Singh, J. Richardson, P. McGee, T. Zamb, W. Koff, C.Y. Wang and D.T. OHagan, Synthetic peptides entrapped in microparticles can elicit cytotoxic T cell activity, *Vaccine*, **14**, 1523-1530 (1996).
- 7) K.J. Maloy, A.M. Donachie, D.T. OHagan and A.M. Mowat, Induction of mucosal and systemic immune responses by immunization with albumin entrapped in poly(lactide-co-glycolide) microparticles, *Immunology*, **81**, 661-667 (1994).
- 8) A. Moore, P. McGuirk, S. Adams, W.C. Jones, J.P. McGee, D.T. OHagan and K.H. Mills, Immunization with a soluble recombinant HIV protein entrapped in biodegradable microparticles induces HIV-specific CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes and CD4<sup>+</sup> Th1 cells, *Vaccine*, **13**, 1741-1749 (1995).
- 9) E.J. Frazza and E.E. Schmitt, A new absorbable study, *J. Biomed. Mater. Res. Symp.*, **1**, 43-52 (1971).
- 10) J.M. Brady, D.E. Cutright, R.A. Miller and G.C. Battestone, Resorption rate, route of elimination and ultra structure of the implant site of polylactic acid in abdominal wall of the rat, *J. Biomed. Mater. Res.*, **7**, 155-173 (1973).
- 11) J. Hanes, J. L. Cleland and R. Langer, New advances in microsphere-based single-dose vaccines, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **28**, 97-119 (1997).
- 12) C. Thomasin, G. Corradin, Y. Men, H.P. Merkle and B. Gander, Tetanus toxoid and synthetic malaria antigen containing poly(lactide)/poly(lactide-co-glycolide) microspheres : Importance of polymer degradation and antigen release for immune response, *J. Control. Release*, **41**, 131-145 (1996).
- 13) C.D. Partidos, P. Vohra, D. Jones, G. Farrar and M.W. Steward, CTL responses induced by a single immunization with peptide encapsulated in biodegradable microparticles, *J. Immunol. Methods*, **206**, 143-151 (1997).
- 14) V.R. Sinha and A. Trehan, Biodegradable microspheres for protein delivery, *J. Control. Release*, **90**, 261-280 (2003).
- 15) M. Higaki, Y. Azechi, T. Takase, R. Igarashi, S. Nagahara, A. Sano, K. Fujiko, N. Nakagawa, C. Aizawa and Y. Mizushima, Collagen minipellet as a controlled release delivery system for tetanus and diphtheria toxoid, *Vaccine*, **19**, 3091-3096 (2001).
- 16) M. Diwan, T.K. Khar and G.P. Talwar, Tetanus toxoid loaded preformed microspheres of crossed linked dextran, *Vaccine*, **19**, 3853-3859 (2001).
- 17) G.F.A. Kersten, D. Donders, A. Akkermans and E.C. Beuvery, Single shot vaccine with tetanus toxoid in biodegradable microsphere protects mice despite acid-induced denaturation of the antigen, *Vaccine*, **14**, 1627-1632 (1996).
- 18) D.T. OHagan, D. Rahman, J.P. McGee, H. Jeffery, M.C. Davies, P. Williams, S.S. Davis and S.J. Challacombe, Biodegradable microparticles as controlled release antigen delivery systems, *Immunology*, **73**, 239-242 (1991).
- 19) M. Singh, A. Singh and G.P. Talwar, Controlled delivery of diphtheria toxoid using biodegradable poly(D,L-lactide) microcapsules, *Pharm. Res.*, **8**, 958-961 (1991).
- 20) M.J. Alonso, S. Cohen, T.G. Park, R.K. Gupta, G.R. Siber and R. Langer, Determinants of release rate of tetanus vaccine from polyester microspheres, *Pharm. Res.*, **10**, 945-953 (2003).
- 21) J.P. McGee, M. Singh, X.M. Li, H. Qui and D.T. OHagan, The encapsulation of a model protein in poly(lactide-co-glycolide) microparticles of various sizes: an evaluation of process reproducibility, *J. Microencap.*, **14**, 197-203 (1997).
- 22) J.L. Cleland and A.J.S. Jones, Stable formulations of recombinant human growth hormone and interferon for microencapsulation in biodegradable microspheres, *Pharm. Res.*, **13**, 1464-1475 (1996).

- 23) A.K. Hilbert, U. Fritzsche and T. Kissel, Biodegradable microspheres containing influenza A vaccine: Immune response in mice, *Vaccine*, **17**, 1065-1073 (1999).
- 24) A.B. Sasiak, B. Bolgiano, D.T. Crane, D.F. Hockley, M.J. Corbel and D. Sesardic, Comparison of in vitro and in vivo methods to study stability of PLGA microencapsulated tetanus toxoid vaccines, *Vaccine*, **19**, 694-705 (2001).
- 25) D.T. O'Hagan, M. Ugozzoli, J. Barackman, M. Singh, J. Kazzaz, K. Higgins, T.C. Vancott and G.S. Ott, Microparticles in MF59, a potent adjuvant combination for a recombinant protein vaccine against HIV-1, *Vaccine*, **18**, 1793-1801 (2000).
- 26) P. Johansen, Y. Men, R. Audran, G. Corradin, H.P. Merkle and B. Gander, Improving stability and release kinetics of microencapsulated tetanus toxoid by co-encapsulation of additives, *Pharm. Res.*, **15**, 1103-1110 (1998).
- 27) R. Audran, Y. Men, P. Johansen, B. Gander and G. Corradin, Enhanced immunogenicity of microencapsulated tetanus toxoid with stabilizing agents, *Pharm. Res.*, **15**, 1111-1116 (1998).
- 28) D.K.L. Xing, D.T. Crane, B. Bolgiano, M.J. Corbel, C. Jones and D. Sesardic, Physicochemical and immunological studies on the stability of free and microsphere-encapsulated tetanus toxoid *in vitro*, *Vaccine*, **14**, 1205-1213 (1996).
- 29) E.C. Lavelle, M.K. Yeh, A.G.A. Coombes and S.S. Davis, The stability and immunogenicity of a protein antigen encapsulated in biodegradable microparticles based on blends of lactide polymers and polyethylene glycol, *Vaccine*, **17**, 512-529 (1999).
- 30) A. Sánchez, B. Villamayor, Y. Guo, J. McIver and M.J. Alonso, Formulation strategies for the stabilization of tetanus toxoid in poly(lactide-co-glycolide) microspheres, *Int. J. Pharm.*, **185**, 255-266 (1999).
- 31) A.-C. Chang and R.K. Gupta, Stabilization of tetanus toxoid in poly(DL-lactic-co-glycolic acid) microspheres for the controlled release of antigen, *J. Pharm. Sci.*, **85**, 129-132 (1996).
- 32) J.A. Reynolds, D.G. Harrington, C.L. Crabbs, C.J. Peters and N.R. Di Luzio, Adjuvant activity of a novel metabolizable lipid emulsion with inactivated viral vaccines, *Infect. Immun.*, **28**, 937-943 (1980).
- 33) M. Brugh, J.D. Stone and H.W. Lupton, Comparison of inactivated Newcastle disease viral vaccines containing different emulsion adjuvants, *Am. J. Vet. Res.*, **44**, 72-75 (1983).
- 34) W. Lu and T.G. Park, Protein release from poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: protein stability problems, *J. Pharm. Sci. Tech.*, **49**, 13-19 (1995).
- 35) T.G. Park, W. Lu and G. Crotts, Importance of *in vitro* experimental conditions on protein release kinetics, stability and polymer degradation on protein encapsulated poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid) microspheres, *J. Control. Release*, **33**, 221-235 (1995).
- 36) D.T. O'Hagan, J.P. McGee, M. Lindblad and J. Holmgren, Cholera toxin B subunit retains antigenicity and immunogenicity following encapsulation in biodegradable microparticles, *Int. J. Pharm.*, **119**, 251-255 (1995).
- 37) D.T. O'Hagan, J.P. McGee, R. Boyle, D. Gumaer, X.M. Li, B. Potts, C.Y. Wang and W.C. Koff, The preparation, characterization and pre-clinical evaluation of an orally administered HIV-1 vaccine, consisting of a branched peptide immunogen entrapped in controlled release microparticles, *J. Control. Release*, **36**, 75-84 (1995).
- 38) C.G. Pitt, M.M. Gratzl, G.L. Kummel, J. Surles and A. Schindler, Aliphatic polyesters, The degradation of poly(DL-lactide) and their copolymers in vivo, *Biomaterials*, **2**, 215-224 (1981).
- 39) R.S.R. Murthy, Biodegradable polymers: In *Controlled and Novel Drug Delivery*, N.K. Jain (Ed.), CBS Publishers and Distributors, New Delhi, India, pp. 27-51 (1997).
- 40) D.H. Lewis, Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers: In *Biodegradable Polymers as Drug Delivery System*, Drugs and, M. Chasin, R and Langer (Eds.), Marcel Dekker, New York, U.S.A., pp. 9-41 (1990).
- 41) D.H. Jones, B.W. McBride and G.H. Farrar, Poly (lactide-co-glycolide) microencapsulation of vaccine antigens, *Biotechnology*, **44**, 29-36 (1996).
- 42) S. Takada, Y. Yamagata, M. Misaki, K. Taira and T. Kurokawa, Sustained release of human growth hormone from microcapsules prepared by a solvent evaporation technique, *J. Control. Release*, **88**, 229-242 (2003).
- 43) R.K. Gupta, A.C. Chang, P. Griffin, Y.Y. Guo and G.R. Siber, Determination of protein loading in biodegradable polymer microspheres containing tetanus toxoid, *Vaccine*, **15**, 672-678 (1997).
- 44) D.T. O'Hagan, M. Singh and R.K. Gupta, Poly(lactide-co-glycolide) microparticles for the development of single-dose controlled-release vaccines, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **32**, 225-246 (1998).
- 45) A.M. Carcaboso, R.M. Hernández, M. Igartua, A.R. Gascón, J.E. Rosas, M.E. Patarroyo and J.L. Pedraz, Immune response after oral administration of the encapsulated malaria synthetic peptide SPf66, *Int. J. Pharm.*, **260**, 273-282 (2003).
- 46) T.L. Bowersock, H. HogenEsch, M. Suckow, R.E. Porter, R. Jackson, H. Park and K. Park, Oral vaccination with alginate microsphere systems, *J. Control. Release*, **39**, 209-220 (1996).
- 47) T.L. Bowersock and S. Martin, Vaccine delivery to animals, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **38**, 167-194 (1999).
- 48) T. Kissel, Y.X. Li, C. Volland, S. Gorich and R. Koneberg, Parenteral protein delivery systems using biodegradable polyesters of ABA block structure, containing hydrophobic poly(lactide-co-glycolide) A blocks and hydrophilic poly(ethylene oxide) B blocks, *J. Control. Release*, **39**, 315-326 (1996).
- 49) Y. Ogawa, H. Okada, Y. Yamamoto and T. Shimamoto, A new technique to efficiently entrap leuporelide acetate into microcapsules of poly(lactic acid) or copoly(lactic/glycolic)

- acid, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 1095-1108 (1988).
- 50) R. Jalil and J.R. Nixon, Biodegradable poly(lactic acid) and poly(lactide-co-glycolide) microcapsules : Problems associated with preparative techniques and release properties, *J. Microencapsul.*, **7**, 297-325 (1990).
- 51) K. Masters, Spray-drying fundamentals process stages and lay-outs: In *Spray-drying handbook*. Nsters K, (Ed.), Longman Scientific and Technical, Essex, U.K., pp. 23-66 (1994).
- 52) B. Baras, M. Benoit, O. Poulain-Godefroy, A. Schacht, A. Capron, J. Gillard and G. Riveau, Vaccine properties of antigens entrapped in microparticles produced by spray-drying technique and using various polyester polymers, *Vaccine*, **18**, 1495-1505 (2000).
- 53) B. Baras, M.A. Benoit and J. Gillard, Parameters influencing the antigen release from spray-dried poly(DL-lactide) microparticles, *Int. J. Pharm.*, **200**, 133-145 (2000).
- 54) M. Murillo, C. Gamazo, M. Goñi, J. Irache and M. Blanco-Prieto, Development of microparticles prepared by spray-drying as a vaccine delivery system against brucellosis, *Int. J. Pharm.*, **242**, 341-344 (2002).
- 55) A.I. Bot, D.J. Smith, S. Bot, L. Dellamary, T.E. Tarara, S. Harders, W. Phillips, J.G. Weers and C.M. Woods, Receptor-mediated targeting of spray-dried lipid particles co-formulated with immunoglobulin and loaded with a prototype vaccine, *Pharm. Res.*, **18**, 971-979 (2001).
- 56) N. Clarke, K. O'Connor and Z. Ramtoola, In fluence of formulation variables on the morphology of biodegradable microparticles prepared by spray-drying, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **24**, 169-174 (1998).
- 57) A.G.A. Coombes, M.K. Yeh, E.C. Lavelle and S.S. Davis, The control of protein release from poly(DL-lactide co-glycolide) microparticles by variation of the external aqueous phase surfactant in the water-in oil-in water method, *J. Control. Release*, **52**, 311-320 (1998).
- 58) M.K. Yeh, A.G.A. Coombes, P.G. Jenkins and S.S. Davis, A novel emulsification-solvent extraction technique for production of protein loaded biodegradable microparticles for vaccine and drug delivery, *J. Control. Release*, **33**, 437-445 (1995).
- 59) I.Y. Song, S.H. Song, W.H. Song, S.W. Cho and Y.W. Choi, Particle size control of poly(lactide-co-glycolide) microspheres for oral antigen delivery system, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **29**, 315-321 (1999).
- 60) S.W. Cho, S.H. Song and Y.W. Choi, Effects of solvent selection and fabrication method on the characteristics of biodegradable poly(lactide-co-glycolide) microspheres containing ovalbumin, *Arch. Pharm. Res.*, **23**, 385-390 (2000).
- 61) P. Johansen, B. Gander, H.P. Merkle and D. Sesaric, Ambiguities in the preclinical quality assessment of microparticulate vaccines, *Trends Biotechnol.*, **18**, 203-211 (2000).
- 62) R.S. Raghuvanshi, Y.K. Katare, K. Lalwani, M.M. Ali, O. Singh and A.K. Panda, Improved immune response from biodegradable polymer particle entrapping tetanus toxoid by use of different immunization protocol and adjuvants, *Int. J. Pharm.*, **245**, 109-121 (2002).
- 63) P. Johansen, F. Estevez, R. Zurbriggen, H.P. Merkle, R. Glick, G. Corradin and B. Gander, Towards clinical testing of a single-administration tetanus vaccine based on PLA/PLGA microspheres, *Vaccine*, **19**, 1047-1054 (2001).
- 64) M. Singh, X.-M. Li, H. Wang, J.P. McGee, T. Zamb, W. Koff, C.Y. Wang and D.T. O'hagan, Controlled release microparticles as a single dose diphtheria toxoid vaccine : Immunogenicity in small animal models, *Vaccine*, **16**, 346-352 (1998).
- 65) P. Johansen, L. Moon, H. Tamber, H.P. Merkle, B. Gander and D. Sesaric, Immunogenicity of single-dose diphtheria vaccines based on PLA/PLGA microspheres in guinea pigs, *Vaccine*, **28**, 209-215 (2000).
- 66) J.E. Rosas, J.L. Pedraz, R.M. Hernández, A.R. Gascón, M. Igartua, F. Guzmán, R. Rodríguez, J. Cortés and M.E. Patarroyo, Remarkably high antibody levels and protection against *P. falciparum* malaria in Aotus monkeys after a single immunization of SPf66 encapsulated in PLGA microspheres, *Vaccine*, **20**, 1707-1710 (2002).
- 67) M. Singh, X.-M. Li, H. Wang and D.T. O'Hagan, Immunogenicity and protection in small animal models with controlled-release tetanus toxoid microparticles as a single-dose vaccine, *Infect. Immun.*, 1716-1721 (1997).
- 68) D.T. O'Hagan, G.S. Ott and G.V. Nest, Recent advances in vaccine adjuvants: The development of MF59 emulsion and polymeric microparticles, *Molecular Medicine Today*, **3**, 69-75 (1997).
- 69) P. Johansen, Y. Men, H.P. Merkle and B. Gander, Revisiting PLA/PLGA microspheres: An analysis of their potential in parenteral vaccination, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **50**, 129-146 (2000).
- 70) D.T. O'Hagan, H. Jeffery and S.S. Davis, Long term antibody responses in mice following subcutaneous immunization with ovalbumin entrapped in biodegradable microparticles, *Vaccine*, **11**, 965-969 (1993).
- 71) S. Cohen, T. Yoshioka, M. Lucarelli, L.H. Hwang and R. Langer, Controlled delivery systems for protein based on poly(lactic/glycolic acid) microspheres, *Pharm. Res.*, **8**, 713-720 (1991).
- 72) I. Jabbal-Gill, W. Lin, P. Jenkins, P. Watts, M. Jimenez, L. Illum, S.S. Davis, J.M. Wood, D. Major, P.D. Minor, X. Li, E.C. Lavelle and A.G.A. Coombes, Potential of polymeric lamellar substrate particles (PLSP) as adjuvants for vaccines, *Vaccine*, **18**, 238-250 (1999).
- 73) P. Johansen, G. Corradin, H.P. Merkle and B. Gander, Release of tetanus toxoid from adjuvants and PLGA microspheres: How experimental set-up and surface adsorption fool the pattern, *J. Control. Release*, **56**, 209-217 (1998).
- 74) F.-L. Mi, S.-S. Shyu, C.-T. Chen and J.-Y. Schoung, Porous chitosan microsphere for controlling the antigen release of Newcastle disease vaccine : preparation of antigen-adsorbed

- microsphere and in vitro release, *Biomaterials*, **20**, 1603-1612 (1999).
- 75) A.G.A Coombes, E.C. Lavelle, P.G. Jenkins and S.S. Davis, Single dose, polymeric, microparticle-based vaccines: The influence of formulation conditions on the magnitude and duration of the immune response to a protein antigen, *Vaccine*, **14**, 1429-1438 (1996).
- 76) R.K. Gupta, H. Alroy, M.H. Alonso, R. Langer and G.R. Siver, Chronic local tissue reactions, long term immunogenicity and immunologic priming of mice and guinea pigs to tetanus toxoid encapsulated in biodegradable polymer microspheres composed of poly lactide-co-glycolide polymers, *Vaccine*, **15**, 1716-1723 (1997).
- 77) H. Rafati, E.C. Lavelle, A.G.A. Coombes, S. Stolnik, J. Holland and S.S. Davis, The immune response to a model antigen associated with PLG microparticles prepared using different surfactants, *Vaccine*, **15**, 1888-1897 (1997).
- 78) R. Nakaoka, Y. Inoue, Y. Tabata and Y. Ikada, Size effect on the antibody production induced by biodegradable microspheres containing antigen, *Vaccine*, **14**, 1251-1256 (1996).
- 79) R.S. Raghuvanshi, O.M. Singh and A.K. Panda, Formulation and characterization of immunoreactive tetanus toxoid biodegradable polymer particles, *Drug Delivery*, **8**, 99-106 (2001).
- 80) T. Jung, R. Koneberg, K.-D. Hungerer and T. Kissel, Tetanus toxoid microspheres consisting of biodegradable poly(lactide-co-glycolide)-and ABA-triblock-copolymers: immune response in mice, *Int. J. Pharm.*, **234**, 75-90 (2002).
- 81) M. Tovio, S.P. Schwendeman, Y. Guo, J. McIver, R. Langer and M.J. Alonso, Improved immunogenicity of a core-coated tetanus toxoid delivery system, *Vaccine*, **18**, 618-622 (2000).
- 82) Y.X., Li, T. Kissel, Synthesis and properties of biodegradable ABA triblock copolymers consisting of poly (L-lactic acid) or poly(L-lactic-co-glycolic acid) A-blocks attached to central poly(oxyethylene) B-blocks, *J. Controll. Release*, **27**, 247-257 (1993).
- 83) A.G.A Coombes, S. Tasker, M. Lindblad, J. Holmgren, K. Hoste, V. Toncheva, E. Schacht, M.C. Davies and L. Illum, Biodegradable polymeric microparticles for drug delivery and vaccine formulation: the surface attachment of hydrophilic species using the concept of poly(ethylene glycol) anchoring segments, *Biomaterials*, **18**, 1153-1161 (1997).
- 84) P. Johansen, H. Tamver, H.P. Merkle and B. Gander, Diphtheria and tetanus toxoid microencapsulation into conventional and end-group alkylated PLA-PLGAs, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **47**, 193-201 (1999).
- 85) T. Jung, W. Kamm, A. Breitenbach, K.-D. Hungerer, E. Hundt and T. Kissel, Tetanus toxoid loaded nanoparticles from sulfobutylated poly(Vinyl Alcohol)-graft-poly(lactide-co-glycolide): Evaluation of antibody response after oral and nasal application in mice, *Pharm. Res.*, **18**, 352-360 (2001).
- 86) D.T. O'Hagan, H. Jeffery, M.J.J. Roberts, J.P. McGee and S.S. Davis, Controlled release microparticles for vaccine development, *Vaccine*, **9**, 768-771 (1991).
- 87) M. Ying, C. Thomasin, H.P. Merkle, B. Gander and G. Corradin, A single administration of tetanus toxoid in biodegradable microspheres elicits T cell and antibody responses similar or superior to those obtained with aluminum hydroxide, *Vaccine*, **13**, 683-689 (1995).
- 88) H.M. Vordermeier, A.G.A. Coombes, P. Jenkins, J.P. McGee, D.T. O'Hagan, S.S. Davis and M. Singh, Synthetic delivery system for tuberculosis vaccines: immunological evaluation of the M. tuberculosis 38 kDa protein entrapped in biodegradable PLGA microparticles, *Vaccine*, **13**, 1576-1582 (1995).
- 89) K.F. Griffin, B.R. Conway, H.O. Alpar and E.D. Williamson, Immune responses to V antigen of Yersinia pestis co-encapsulated with IFN- $\gamma$ : Effect of dose and formulation, *Vaccine*, **16**, 517-521 (1998).
- 90) J.S. Moynihan, D.H. Jones, G.H. Farrar and C.R.A. Howard, A novel microencapsulated peptide vaccine against hepatitis B, *Vaccine*, **19**, 3292-3300 (2001).
- 91) M. Singh, J.P. McGee, X.M. Li, W. Koff, T. Zamb, C.Y. Wang and D.T. O'Hagan, Biodegradable microparticles with an entrapped branched octameric peptide as a controlled-release HIV-1 vaccine, *J. Pharm. Sci.*, **86**, 1229-1233 (1997).
- 92) R.K. Gupta, A.-C. Chang, P. Griffin, R. Rivera and G.R. Siber, In vivo distribution of radioactivity in mice after injection of biodegradable polymer microspheres containing  $^{14}\text{C}$ -labeled tetanus toxoid, *Vaccine*, **14**, 1414-1416 (1996).
- 93) R.K. Gupta, A.C. Chang and G.R. Siber, Biodegradable polymer microspheres as vaccine adjuvants and delivery systems, *Dev. Biol. Stand.*, **92**, 63-78 (1998).
- 94) S. Sharpe, T. Hanke, A. Tinsley-Bown, M. Dennis, S. Dowall, A. McMichael and M. Cranage, Mucosal immunization with PLGA-microencapsulated DNA primes a SIV-specific CTL response revealed by boosting with cognate recombinant modified vaccine virus Ankara, *Virology*, **313**, 13-21 (2003).
- 95) J.E. Butler and R.G. Hamilton, Quantitation of specific antibodies: Methods of expression, standard, solid-phase considerations, and specific applications: In *Immunochemistry of Solid-phase Immunoassays*, J.E. Butler (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S.A., pp. 173-198 (1991).
- 96) S. Kodihalli, D.L. Kobasa and R.G. Webster, Strategies for inducing protection against avian influenza A virus subtypes with DNA vaccines, *Vaccine*, **18**, 2592-2599 (2000).
- 97) E. Fattal, S. Pecquet, P. Couvreur and A. Andremont, Biodegradable microparticles for the mucosal delivery of antibacterial and dietary antigens, *Int. J. Pharm.*, **242**, 15-24 (2002).
- 98) M. Singh, X.M. Li, J.P. McGee, T. Zamb, W. Koff, C.Y. Wang and D.T. O'Hagan, Controlled release microparticles as a single dose hepatitis B vaccine: Evaluation of immunogenicity in mice, *Vaccine*, **15**, 475-481 (1997).
- 99) Y. Changhong, W.L. Rill, R. Malli, J. Hewetson, H. Naseem, R. Tammariello and M. Kende, Intranasal stimulation of long-lasting immunity against aerosol ricin challenge with ricin toxoid, *Vaccine*, **14**, 1031-1038 (1996).

- 100) H.C.J. Ertl, I. Varga, Z.Q. Xiang, K. Kaiser, L. Stephens and L. Otvos Jr., Poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres as carriers for peptide vaccines, *Vaccine*, **14**, 879-885 (1996).
- 101) K.B. Walker, D.K. Xing, D. Sesardic and M.J. Corbel, Modulation of the immune response to tetanus toxoid by polylactide-polyglycolide microspheres, *Dev. Biol. Stand.*, **92**, 259-267 (1998).
- 102) M. Igartua, R.M. Hernandez, A. Esquisabel, A.R., Gascon, M.B. Calvo and J.L. Pedraz, Enhanced immune response after subcutaneous and oral immunization with biodegradable PLGA microspheres, *J. Control. Release*, **56**, 63-73 (1998).
- 103) D.K. Xing, K. McLellan, M.J. Corbel and D. Sesardic, Estimation of antigenic tetanus toxoid extracted from biodegradable microspheres, *Biologicals*, **24**, 57-65 (1996).
- 104) M. Helliwell, The use of bioadhesives in targeted delivery within the gastrointestinal tract, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **11**, 221-251 (1993).