

## 파상풍 특소이드를 함유한 생체분해성 미립구의 특성

김지윤<sup>#</sup> · 김수남 · 백선영 · 이명숙 · 민홍기 · 홍성화

식품의약품안전청 생물학평가부 세균제제과

(Received March 21, 2000)

### Characteristics of Tetanus Toxoid Loaded in Biodegradable Microparticles

Ji Yoon Kim<sup>#</sup>, Su Nam Kim, Sun Young Baek, Myoung Sook Lee,  
Hong Ki Min and Seung Hwa Hong

*Division of Bacterial Products, Biologics Evaluation Department, Korea Food and Drug Administration*

**Abstract** — Biodegradable microspheres made from poly-lactide-co-glycolide polymers have been considered as a new delivery system for single-dose vaccine. Purified tetanus toxoid (TT) was encapsulated in poly-lactide(PLA) and poly-lactide-co-glycolide (PLGA) microparticles using a solvent evaporation method in a multiple emulsion system (water-in oil-in water). The morphology of TT-loaded microparticles was spherical and the surface of them was smooth. The particle size was in a range of 2-10. Protein loading efficiency was 68~97.8%. PLGA (85:15) microparticle showed the highest efficiency. Protein release pattern was influenced by polymer molecular weight and composition. The release rate of PLA (Mw 100,000) microsphere was higher than any other microspheres. In consequence of the hydrolysis of PLGA(50:50) microspheres, environmental pH decreased from 7.4 to 5.0. The PLA, PLGA (75:25) and PLGA (85:15) microspheres showed no significant pH change. The antigenicity of TT in microspheres was assayed by indirect sandwich ELISA using equine polyclonal tetanus antitoxin for capture antibody and human polyclonal tetanus antitoxin for primary antibody. The antigenicity of TT in PLA (Mw 100,000), PLGA(50:50, Mw 100,000) and PLGA (75:25, Mw 73,300) after 30 days incubation showed 54, 40.9 and 76.7%, respectively.

**Keywords** □ Poly (lactic acid)(PLA), poly (lactic/glycolic acid) (PLGA), tetanus toxoid.

Adjuvant란 항원에 대한 면역반응을 증강시키는 물질을 말한다. 이러한 물질들은 화학적으로나 작용기전 등에 있어서 아주 다양한 형태를 보인다. Adjuvant는 면역반응을 증강시키는 기전에 따라 세 부류로 구분할 수 있다. 첫째, 접종 부위에 저장소를 형성하는 것. 둘째, 면역 능력을 가진 세포에 항원을 전달해 주는 수단으로 작용하는 것. 셋째, 면역 촉진제로 작용하는 것 등이다. 이러한 adjuvant는 적은 양의 항원으로 조기에 높은 면역 반응을 유도하므로 백신 생산 비용 절감의

효과를 가져온다. 최근 들어 면역력이 약한 정제 백신이나 부분(subunit) 또는 합성(synthetic)백신의 개발로 이러한 항원에 대한 면역반응을 촉진시킬 수 있는 adjuvant에 대한 관심이 높아지고 있다.

현재 사람에게 널리 사용되고 있는 adjuvant인 알루미늄 화합물(이하 alum adjuvant)은 널리 사용되고 있지만 몇 가지 단점을 가지고 있다. 주사부위에 염증을 유발하며 국부육아종 생성을 촉진하는 부작용이 보고되고 있으며,<sup>1,4)</sup> humoral immunity는 충분히 증가시키나, 또다른 중요한 면역기능인 cell-mediated immunity에는 별다른 영향을 주지 못한다.<sup>1,2)</sup> 또한, alum adjuvant는 장기적으로 적정 면역력을 나타내도

<sup>#</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 02-380-1744 (팩스) 02-383-8322

록 하기 위해 일정 간격으로 여러 번 접종을 해야하는 불편함이 있다. 이러한 특성은 개발 도상국에서 면역율을 높이는데 많은 어려움으로 작용하고 있다. 따라서, 단 한번의 접종으로 오랜 기간 동안 높은 면역 반응을 유지하며 효과적이고 안전한 새로운 백신 전달체의 개발이 필요하게 되었다.

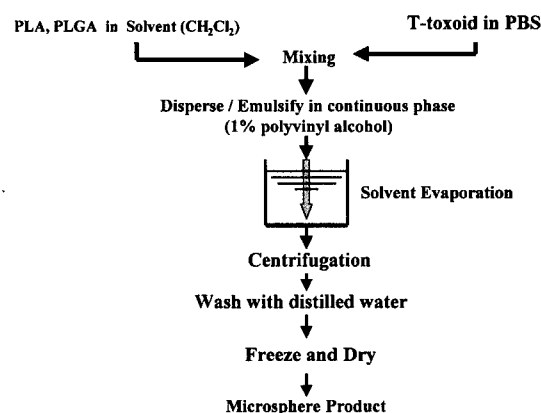
최근에 이러한 요구를 충족할 수 있는 새로운 adjuvant로 생체분해성 미립구(biodegradable microparticles)에 대한 연구가 활발히 진행 중이다.<sup>1-21</sup> 생체분해성 미립구의 제조에 사용되는 polymer는 외과치료용으로 오랜 기간 동안 사용되어 왔기 때문에 안전성이 확보되어 있고 또한, 체내에서 분해되는 속도를 조절하여 몇 단계에 걸쳐 항원을 방출하게 하여 한 번의 백신접종으로 여러 번의 접종효과를 기대할 수 있는 것으로 알려져 있다.

이번 연구에서는 파상풍 독소이드 항원을 포함하는 polylactide(이하 PLA), polylactide-co-glycolide(이하 PLGA) 생체분해성 미립구에 대한 제조방법을 확립하고 제조한 생체분해성 미립구의 형태학적 특성을 비롯한 물리·화학적 특성을 확인하고자 하였다.

### 실험방법

**재료 및 시약** - 실험에 사용된 6가지 polymer 중 PLA(Mw 70,300), PLGA(50:50, Mw 56,100), PLGA(75:25, Mw 73,300), PLGA(85:15, Mw 91,200)는 LG 바이오텍에서 공급받았고 PLA(Mw 100,000), PLGA(50:50, Mw 91,200), 파상풍 독소이드(1500 Lf/ml)는 녹십자로부터 제공받아 사용하였다. ELISA에 사용된 사람 다클론 파상풍 항독소 및 말 다클론 파상풍항독소는 WHO의 National Institute for Biological Standards and Control(NIBSC)에서, horse-radish peroxidase 접합 염소 항사람 항체, dichloromethane (DCM), polyvinyl alcohol(Mw 30,000~70,000), orthophenylene diamine(OPD)과 bichoninic acid (BCA) 시약은 Sigma에서 구입하였다.

**미립구의 제조** - 미립구는 solvent evaporation 방법<sup>21)</sup>으로 제조하였다(Scheme 1). 간단히 설명하면, PLA 또는 PLGA polymer를 DCM에 녹여 최종농도가 5% 되게 만들고, 그 중 20 mL에 파상풍 독소이드(1500 Lf/ml) 2 mL을 넣어 TAITEC homogenizer (Ultra G HG-29)로 8,000 rpm에서 2분동안 유체화



Scheme 1 - T-toxoid loaded PLA and PLGA microsphere preparation.

(water-in oil, W/O)시켰다. 이 용액 전량을 1% polyvinyl alcohol 용액 40 mL에 방울방울 가한 후 8,000 rpm에서 4분 동안 균질화(water-in oil-in water, W/O/W)시킨 후, 300 rpm에서 하룻밤 동안 서서히 교반하여 유기층(organic phase)인 DCM층을 증발시키고 10,000 g에서 원심분리하여 고형의 미립구를 얻었다. 증류수로 3회 세척하여 미립구 제조에 사용되지 않고 남은 PVA를 제거하고, 동결건조하여 분말 상태의 미립구를 얻어 4°C의 진공 데시케이터에 보관하였다.

**미립구의 morphology** - SEM(scanning electron microscopy, Philips, SEM 515)을 이용하여 미립구의 크기 및 형태학적 특성을 알아보았다. 동결건조된 시료를 알루미늄 stub에 붙인 후 금으로 코팅하여 적당한 배율에서 관찰하였다.

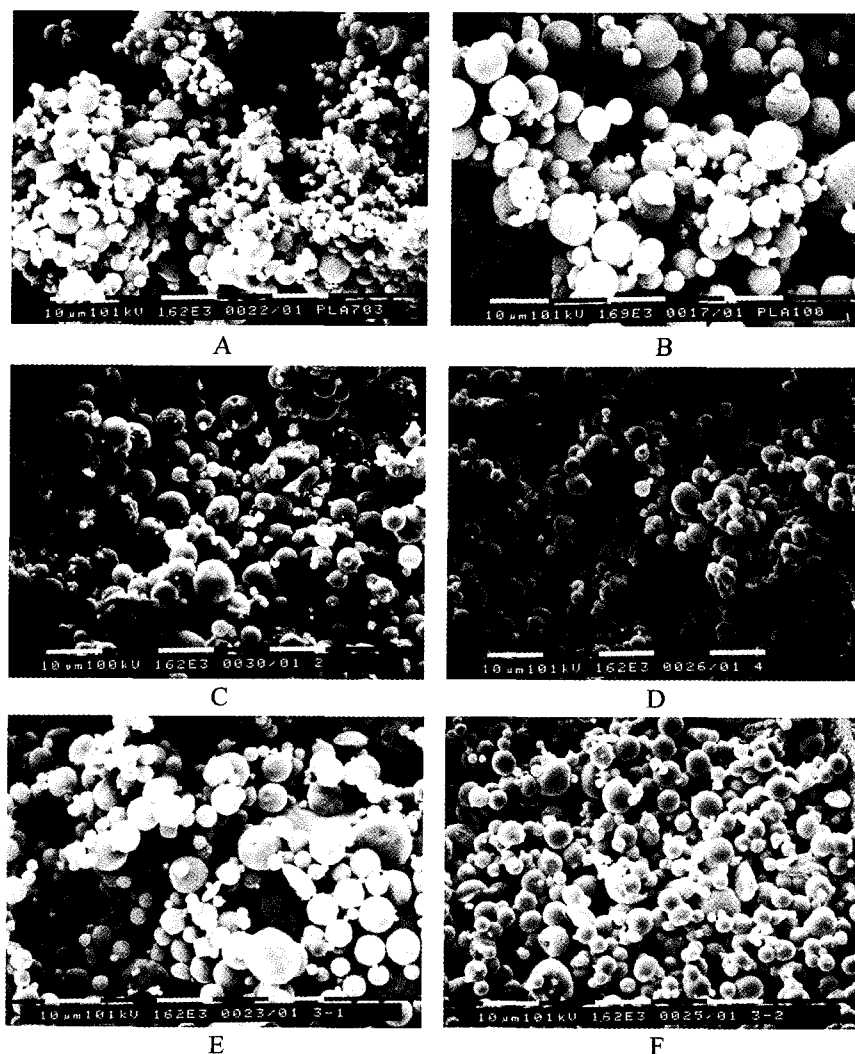
**미립구 내 파상풍 독소이드 함유율** - 동결건조된 미립구를 0.1M NaOH, 5% SDS 용액에 재현탁하여 하룻밤 동안 진탕배양한 후 원심분리하여 상등액을 얻었다. BCA법<sup>20)</sup>으로 상등액 중에 방출된 단백질 양을 측정 후, 제조시 넣어준 파상풍 독소이드에 대한 백분율(%)을 구했다.

**미립구의 분해에 따른 pH의 변화 및 파상풍 독소이드의 방출 양상** - 각각의 미립구를 생체와 비슷한 PBS, 37°C 조건으로 진탕배양하여 시간이 경과함에 따른 pH 변화양상을 확인하고자 하였다. 12개의 시험관을 준비하여, 제조된 6가지 미립구 100 mg씩을 각각 두개의 시험관에 넣고, 0.02% sodium azide를 함유한 PBS(pH 7.4) 2 mL을 가하여 37°C에서 간헐적

으로 흔들어 주며 방치하였다. 한 시험관은 처음 1일째에 pH를 측정하고, 원심분리하여 상등액을 다른 시험관에 모으고, 침전물에 새로운 완충액을 부어 재현탁시켜서 37°C에 방치하였다. 3일째에 다시 pH를 측정하고, 상등액을 다른 시험관에 모으고, 침전물에는 완충액을 갈아 주었다. 이후 매 3일에 한 번씩 30일까지 pH를 측정하여 상등액을 모으고, 완충액을 갈아 주면서 37°C에 방치하였다. 모아진 상등액 중에 방출된 단백질의 양은 BCA법으로 측정하였으며, 이 상등액의 일부를 취해 방출된 파상풍 독소이드의 항원성을 측정하였다. 다른 시험관은 완충액을 교환하지 않고 완

충액을 교환해 준 시험관과 같은 주기로 pH만 측정하였다.

**파상풍 독소이드의 항원성 측정** - 방출된 파상풍 독소이드 중 PLA(Mw 100,000), PLGA(50:50, Mw 38,000), PLGA(75:25, Mw 73,300) 세 종류의 미립구에 대하여 그 항원성을 indirect sandwich ELISA를 이용하여 측정하였다. 사용된 ELISA 방법은 다음과 같다. 50 mM carbonate buffer(pH 9.6)에 500 ng/ml이 되도록 말 다클론 파상풍 항독소액을 만든 후 이를 96 well plate의 각 well에 100  $\mu$ l씩 가하여 4°C에서 18시간 방치하여 coating하였다. 0.05%



**Fig. 1** – Scanning electron micrographs of microparticles. Panel A: blank PLGA50:50 (Mw 38,000) microparticles containing saline, Panel B: PLA (Mw 100,000), Panel C: PLA (Mw 70,300), Panel D: PLGA 50:50 (Mw 56,000), Panel E: PLGA 75:25 (Mw 73,300), and Panel F: PLGA 85:15 (Mw 91,200).

tween20을 함유하는 PBS 용액(PBST)으로 3회 washing한 후, PBST에 1%되게 bovine serum albumin(BSA) 용액을 만들어 각 well에 100  $\mu$ 씩 가하고, 37°C에서 1시간 방치하여 blocking 하였다. 다시 PBST로 3번 washing하고, 표준곡선을 구하기 위해서 미립구를 제조할 때 사용한 파상풍 독소이드를 방출된 파상풍 독소이드와 함께 1000 ng/ml에서 시작하여 2배씩 연속적으로 PBST에 10단계 희석하여 well 당 희석된 파상풍 독소이드액 100  $\mu$ 씩 가한 후, 37°C에서 2시간 방치했다. PBST로 3번 washing한 후, 사람 다클론 파상풍 항독소(120 IU/ml)를 1:1,600이 되게 PBST에 희석하여 각 well에 100  $\mu$ 씩 가하고 37°C에서 2시간 방치했다. PBST로 3번 washing하고 HRP 접합 염소 항사람 항체(minimum titer 1:20,000)를 1:2,000으로 희석해서 100  $\mu$ 씩 가하여 37°C에서 1시간 방치했다. 50 ml citrate phosphate buffer에 OPD 20 mg과 200  $\mu$  3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 가한 것을 기질용액으로 하여 각 well당 100  $\mu$ 씩 가한 후 상온에서 발색시켰다. 12분후 1M 황산용액 50  $\mu$ 를 가하여 반응을 정지 시키고 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

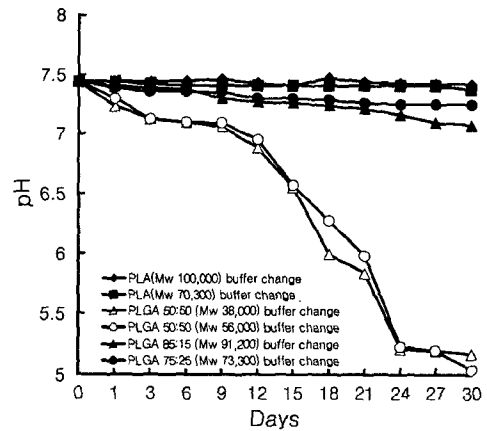
**실험결과**

**미립구의 특성** - 제조된 6종류의 미립구의 형태 및 크기에 대한 주사전자현미경사진은 Fig. 1과 같았으며 크기와 항원 함유율을 비교한 결과는 Table I과 같았다. 미립구의 모양은 매끄러운 구형이었다. 크기는 2-10  $\mu$ m 범위에서 다양하게 나타났으며, PLA(Mw 100,000)로 제조된 것이 가장 컸다. 항원 함유율은 미립구의 종류에 따라 68~98%를 보였으며, PLGA(85:15, Mw 91,200)에서 98 %로 가장 높게 나타났다.

**미립구의 분해에 따른 pH의 변화** - 미립구에 0.1M

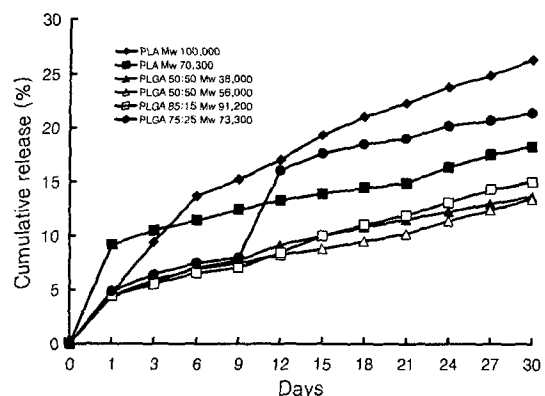
**Table I** - Characteristics of microparticles produced according to the different types of polymers

Polymer	Molecular weight	Size Range ( $\mu$ m)	Protein loading efficiency (%)
PLA	100,000	5.0~9.5	82
PLA	70,300	3.0~7.5	80
PLGA 50:50	38,000	2.2~5.0	68
PLGA 50:50	56,000	2.0~6.0	77
PLGA 85:15	91,200	2.5~8.7	98
PLGA 75:25	73,300	2.5~10	85

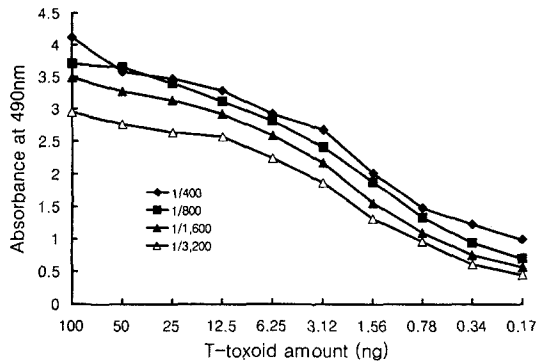


**Fig. 2** - pH profiles measured in the PBS buffer during incubation of T toxoid-loaded microparticles.

PBS를 가해 37°C에 방치한 후, 미립구 분해에 따른 pH 변화양상을 Fig. 2에 나타내었다. PLA 및 PLGA를 구성하고 있는 단위체는 lactic acid와 glycolic acid이다. 미립구가 분해될 때에 생성되는 이러한 단위체는 주위 환경의 pH를 떨어뜨리게 된다. pH가 떨어질 경우 미립구에 존재하는 단백질 항원들은 직접적인 영향을 받게 되고 denaturation되어 항원성이 떨어질 것이 예상된다. PLA, PLGA(75:25) 및 PLGA(85:15)에서는 30일까지 관찰한 결과, 완충액을 교환한 것과 교환하지 않은 것 모두에서 pH의 변화가 거의 없이 7.4로 유지되는 반면, PLGA(50:50)으로 제조된 미립구는 완충액을 교환한 것과 교환하지 않은 것 모두에서 pH가 2.0~2.5 단위까지 급격히 떨어져서 30일째의 pH는 5.2와 5.0을 나타내었다.



**Fig. 3** - Cumulative T toxoid release rate(%) from microparticles during incubation of T toxoid-loaded microparticles at 37°C.



**Fig. 4** – Indirect sandwich ELISA standard curve for measuring T toxoid quantity. 50 ng Equine tetanus antitoxin per well was used for capture antibody. 100  $\mu$ l T toxoid at 10 doubling dilutions from 100ng/ml was added to each wells. Human tetanus antitoxin was used as primary antibody. HRP conjugated goat anti-human IgG was used as secondary antibody.

**파상풍 특소이드의 방출 양상** – 미립구로부터 단백질이 방출되는 양상은 Fig. 3과 같았다. 처음 1일에 급격히 단백질이 방출된 다음 그 후로는 서서히 방출되어 30일 후에는 미립구 속의 총단백질 중 10~25%까지 방출되었으며 PLA(Mw100,000)에서 가장 많은 단백질이 방출되었다.

**Indirect sandwich ELISA법의 확립** – 말 다클론 파상풍 항독소를 capture antibody로 하고 사람 다클론 파상풍 항독소를 1차 항체로 하여 파상풍 특소이드의 농도 변화에 따라 O.D.(490 nm)값이 직선성을 나타내는 영역의 조건을 확립하였다(Fig. 4). 즉, 말 다클론 파상풍 항독소의 양은 50 ng으로 고정한 상태에서 사람 다클론 파상풍 항독소(120 IU/ml)를 1:1,600으로 희석하여 100  $\mu$ l 넣어 준 상태에서 약 0.34 ng까지의 파상풍 특소이드를 검출할 수 있었다.

**미립구 내의 파상풍 특소이드의 항원성** – PLA(Mw 100,000), PLGA(50:50, Mw 38,000), PLGA(75:25, Mw 73,300) 등 세 종류의 미립구를 PBS(pH 7.2) 용액에 넣고 37°C에서 배양하였다. 6일, 15일, 30일째에 방출된 파상풍 특소이드의 항원성을 ELISA로 측정된 결과를 Table II에 나타내었다. 30일이 경과한 후 파상풍 특소이드의 항원성은 PLGA(75:25, Mw 73,300)에서 67.7%를 나타내어 가장 잘 보존되었고, PLGA(50:50, Mw 38,000)에서는 40.9%를 나타내어 가장 낮은 수치를 보였다.

**Table II** – Antigenicity(%) of tetanus toxoid in the PBS buffer during incubation of T toxoid-loaded microparticles

Microparticles	Incubation time (days)			
	0	6	15	30
PLA (Mw 100,000)	100	87.5	64.3	54
PLGA 50:50 (Mw 38,000)	100	76.9	48.4	40.9
PLGA 75:25 (Mw 73,300)	100	100	77.5	67.7

**고 찰**

이번 연구의 목적은 생체분해성 미립구를 이용한 백신을 제조하여 *in vitro*에서 미립구의 물리, 화학적 특성을 알아보고 기존의 알루미늄 adjuvant 백신을 대체할 수 있는지에 대한 가능성을 확인하는 것이었다. Solvent evaporation 방법으로 제조된 미립구의 형태학적 특징은 polymer의 종류에 따라 다양하였다. Polymer의 분자량이 클수록 미립구의 크기가 증가하였다.

체내에서 크기가 10  $\mu$ m 이하인 미립구는 antigen presenting cell(APC)에 의해 직접 흡수되어 빠른 면역반응을 유도하는 반면, 10  $\mu$ m 이상의 미립구는 직접 APC에 흡수되지 않고 체내에서 서서히 분해되면서 면역반응을 유도한다고 알려져 있다.<sup>3)</sup> 따라서, 10  $\mu$ m 이상의 미립구와 10  $\mu$ m 이하의 미립구를 동시에 접종할 경우, 10  $\mu$ m 이하의 미립구는 초기 면역에 작용하고 10  $\mu$ m 이상의 미립구는 boosting 효과를 나타내어 single dose 백신의 가능성을 기대할 수 있다. 그러나, 실험결과에서 보듯이 한 종류의 polymer에서 얻어진 미립구의 크기가 균일하지 않음을 볼 때, 제조과정에서 미립구의 크기를 정밀하게 조절하기 위해서는 polymer의 종류, polymer의 농도, 에멀전화시키는 시간, polyvinyl alcohol과 같은 water phase의 농도 등 여러 요인들에 대한 연구가 더 진행되어야 할 것이다. 또한, 미립구에 함유된 항원 단백질이 방출되는 양상도 면역반응에 중요한 요소인데 polymer의 종류에 따라 다양하므로 이에 대한 충분한 고려가 있어야 될 것으로 보인다. Single dose 백신으로 작용하기 위해서는 접종 초기에 항원을 방출하고 일정한 시간이 경과한 뒤에 또다시 항원을 방출하는 계단식 방출이 효과적이다. 그러나, 이번 연구에서 제조된 미립구들의 분해 양상은 초기에 항원을 방출한 이후 서서히 조금씩의 항원을 방출하지만 booster dose 될 만한 대량의

항원을 방출하는 계단식 방출 양상은 보이지 않았다.

PLA 및 PLGA를 구성하고 있는 단위체는 lactic acid와 glycolic acid이다. 미립구가 분해될 때에 생성되는 이러한 단위체는 주위 환경의 pH를 떨어뜨리게 된다. pH가 떨어질 경우 미립구에 존재하는 단백질 항원들은 직접적인 영향을 받게 되고 denaturation되어 항원성이 떨어질 것이 예상된다. 따라서, 이번 연구에서는 각각의 미립구를 생체와 비슷한 PBS, 37°C 조건으로 진탕 배양하여 시간이 경과함에 따른 pH 변화양상을 확인하였다. 생체 내에서는 끊임없이 체액이 순환하므로 미립구를 incubation하면서 정기적으로 PBS 완충액을 교환하는 조건에서도 함께 pH 변화를 확인하였다. 그 결과, PLGA(50:50) 미립구에서만 pH가 급격하게 떨어졌다. 그 이유는 glycolic acid가 lactic acid보다 더 산성이 강하여 glycolic acid가 많이 함유된 PLGA(50:50)가 분해되면서 낮은 pH 환경을 만든 것으로 보인다. 또한, single dose 백신의 개념에서는 미립구가 체내에서 오랫동안 머물며 항원을 방출해야 하는데 단백질 항원인 파상풍 독소이드가 체온에서 오랜 기간 머물며 항원성을 계속 유지하는 것이 효과적인 면역반응을 유도하기 위해 중요하다. 따라서 이번 연구에서는 미립구를 PBS 용액에 넣어 37°C에서 incubation하며 용액 중으로 방출된 파상풍 독소이드의 항원성을 indirect sandwich ELISA 방법으로 정기적으로 측정하였다. 그 결과 시간이 지남에 따라 파상풍 독소이드의 항원성이 떨어짐을 확인할 수 있었다. 결국 생체분해성 미립구가 효과적인 single dose 백신으로 사용되기 위해서는 미립구 내에 있는 단백질 항원의 stability를 유지할 수 있는 방법이 함께 모색되어야 할 것으로 보인다.

### 감사의 글

이 연구에 도움을 주신 KIST 정서영 박사님과 녹십자 목암연구소에 감사의 뜻을 전합니다.

### 문헌

- Men, Y., Thomasin, C., Merkle, H. P., Gander, B. and Corradin, G. : 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 (1995).
- Esparza, I., Kissel, T. : Parameters affecting the immunogenicity of microencapsulated tetanus toxoid. *Vaccine*, **10**, 714 (1992).
- Singh, M., Li, X., Wang, H., McGee, J. P., Zamb, T., Koff, W., Wang, C. H. and OHagan, D. T. : Controlled release microparticles as a single dose diphtheria toxoid vaccine : immunogenicity in small animal models. *Vaccine*, **16**, 346 (1998).
- Kerten, G. F. A., Donders, D., Akkermans, A. and Beuvery, E. C. : Single shot with tetanus toxoid in biodegradable microspheres protects mice despite acid-induced denaturation of the antigen. *Vaccine*, **14**, 1627 (1996).
- Lavelle, E. C., Yeh, M. K., Coombes, A. G. A., Davis, S. S. : The stability and immunogenicity of a protein antigen encapsulated in biodegradable microparticles based on blends of lactide polymers and polyethylene glycol. *Vaccine*, **17**, 512 (1998).
- Gupta, R. K., Alory, J., Alonso, M. J., Langer, R. and Siber, G. R. : 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 (1997).
- Raychaudhuri, S. and Rock, K. L. Fully mobilizing host defense : Building better vaccines. *Nature biotechnology*, **16**, 1025 (1998).
- Igaruta, M., Hernandez, R. M., Esquisabel, A., Gascon, A. R., Calvo, M. B., Pedraz, J. L. : Enhanced immune response after subcutaneous and oral immunization with biodegradable PLGA microspheres. *Journal of controlled release*, **56**, 63 (1998).
- Isaka, m., Yasuda, Y., Kozuka, S., Miura, Y., Taniguchi, T., Matano, K., Goto, N. and Tochikubo, K. : Systemic and mucosal immune responses of mice to aluminium-adsorbed or aluminum-non-adsorbed tetanus toxoid administrated intranasally with recombinant cholera toxin B subunit. *Vaccine*, **16**, 1620 (1998).
- Diwan, M., Misra, A., Khar, R. K. and Talwar, G. P. : Long-term high immune response to diphtheria toxoid in rodents with diphtheria toxoid conjugated to dextran as a single contact point delivery system.

- Vaccine*, **15**, 1867 (1997).
- 11) Rafati, H., Lavellet, E. C., Coommes, A. G. A., Stolnik, S., Holland, J. and Davis, S. S. : The immune response to a model antigen associated with PLG microparticles prepared using different surfactants. *Vaccine*, **15**, 1888 (1997).
  - 12) Tsai, T., Mehta, R. C., DeLuca, P. P. : Adsorption of peptide to poly (D, L-lactide-co-glycoside) : 1. Effect of physical factors on the adsorption. *International journal of pharmaceutics*, **127**, 31 (1996).
  - 13) Yeyanthi, R., Mehta, R. C., Thanoo, B. C. and Deluca, P. P. : Effect of processing parameters on properties of peptide-containing PLGA micropheres. *Journal of microencapsulation*, **14**, 163 (1997).
  - 14) Kissel, T., Koneberg, R., Hilbert, A. K., Hungerer, K. D. : Microencapsulation of antigen using biodegradable polystyrene : facts and phantasies. *Behring instmitt*, **98**, 172 (1997).
  - 15) Schwendeman, S. P., Tobio, M., Joworowicz, M., Alonso, M. J., Langer, R. : New strategies for the microencapsulation of tetanus vaccine. *Journal of microencapsulation*, **15**, 299 (1998).
  - 16) Chang, A. C., Gupta, R. K. : Stabilization of tetanus toxoid in poly (D, L-lactide-co-glycolic acid) microspheres for the controlled release of antigen. *Journal of pharmacial science*, **85**, 129 (1996).
  - 17) Schwendeman, S. P., Constantino, H. R., Gupta, R. K., Tobio, M., Chang, A. C., Alonso, M. J., Siber, G. R., Langer, R. : Strategies for stabilising tetanus toxoid toward the development of a single-dose tetanus vaccine. *Dev biol stand*, **87**, 293 (1996).
  - 18) Kim, S. Y., Doh, H. J., Ahn, J. S., Ha, Y. J., Jang, M. H., Chung, S. I., Park, H. J. : Induction of mucosal and systemic immune response by oral immunization with *H. pylori* lysate encapsulated in poly (D, L-lactide-co-glycoside) microparticles. *Vaccine*, **17**, 607 (1999).
  - 19) Dorothy, K., Xing, L., Crane, D. T., Bolgiano, B., Corbel, M. J., Jones, C. and Sesardic, D. : Physicochemical and immunological studies on the stability of free and microsphere-encapsulated tetanus toxoid in vitro. *Vaccine*, **14**, 1205 (1996).
  - 20) Dorothy, K., Xing, L., McLellan, K., Corbel, M. J. and Sesardic, D. : Estimation of antigenic tetanus toxoid extracted from biodegradable microspheres. *Biologicals*, **24**, 57 (1996).
  - 21) Alonso, M. J., Gupta, R. K., Min, C., Siber, G. R. and Langer, R. : Biodegradable microspheres as controlled-release tetanus toxoid delivery systems. *Vaccine*, **12**, 299 (1994).