

Sistema de administración oral del toxoide tetánico

Oral delivery system for tetanus toxoid

AHIRE VJ^{a*}, DOSHI JB^b, RAVETKAR SD^b Y SAWANT KK^a

^a Center of Relevance and Excellence in New Drug Delivery Systems (TIFAC-CORE in NDDS),
Department of Pharmacy, The Maharaja Sayajirao University of Baroda, Vadodara, India.
Nº de teléfono +91-265-2434417 Nº de fax +91-265-2423898

^b Toxoid Purification Department, Serum Institute of India Pvt Ltd., 212/2, Soli Poonawala Road, Hadapsar,
Pune, India

*Autor de contacto, vijayjahire@yahoo.com

RESUMEN

Se ha estudiado la respuesta sistémica e inmune local frente al toxoide tetánico (TT) encapsulado en micropartículas de quitosano (CS), (CS-TT) preparado mediante reticulación iónica con tripolifosfato de sodio (STPP). Se administraron a ratones micropartículas CS-TT, TT en tampón de fosfato salino (PBS) y micropartículas CS simples, y se administró TT (adsorbido) por vía intramuscular. Se analizó el suero para determinar los niveles de IgG anti-TT y se realizó un lavado intestinal para determinar los niveles de IgA anti-TT mediante la técnica ELISA. El estudio demuestra la eficacia del sistema de suspensión de micropartículas de quitosano, con TT, para inducir IgA en el intestino e IgG en la circulación sistémica.

PALABRAS CLAVE: Quitosano. Inmunidad mucosal. Inmunidad sistémica. Toxoide tetánico.

ABSTRACT

Systemic and local immune response against tetanus toxoid (TT) encapsulated in chitosan (CS) microparticles (CS-TT) prepared by ionic cross-linking using Sodium Tripolyphosphate (STPP) was studied. CS-TT microparticles, TT in PBS and plain CS microparticles were orally administered to mice and TT (adsorbed) was administered through intramuscular route. Sera were analyzed for anti-TT IgG and intestinal lavage for anti-TT IgA levels using an ELISA. The study shows the efficacy of chitosan microparticle suspension system, containing a TT, in inducing the IgA in intestine and IgG in systemic circulation.

KEY WORDS: Chitosan. Mucosal immunity. Systemic immunity. Tetanus toxoid.

Fecha de recepción: 09-11-2006

Fecha aceptación: 13-11-2007

INTRODUCCIÓN

La administración por vía oral es la más atractiva y aceptable pero es también la que supone más esfuerzo y presenta mayor dificultad para proteínas, péptidos y moléculas de alto peso molecular. De ahí que, debido a factores como la degradación del antígeno en el tracto gastrointestinal (GI) y la baja absorción del tejido linfoide asociado al intestino (GALT), exista un considerable interés

INTRODUCTION

The oral route of delivery is most attractive and acceptable, but is also the most challenging and difficult for proteins, peptides and other high molecular weight molecules. Hence, due to factors like the degradation of the antigen in the gastrointestinal (GI) tract and low uptake by the gut associated lymphoid tissue (GALT) there is considerable interest in the development

en el desarrollo de sistemas novedosos para la administración oral de vacunas que pueden utilizarse para agrupar y liberar diversos antígenos de importantes patógenos. Principalmente por motivos de seguridad, sería deseable que estos nuevos sistemas de administración se basaran en sistemas portadores inactivos más que en vectores virales o bacterianos modificados.

Las placas de Peyer (PP), situadas en el íleon terminal², son el objetivo principal para la vacuna oral. El uso de micropartículas poliméricas ofrece un potencial significativo para el desarrollo de vacunas administradas por vía oral. Las micropartículas se pueden preparar a partir de diversos polímeros, que se pueden diseñar para proteger la vacuna capturada contra la degradación, retrasar el tránsito gástrico de la vacuna o desarrollar vacunas que se absorban en los tejidos linfoides asociados a las mucosas (MALT) de las PP. El antígeno incorporado en partículas induce una mayor respuesta inmune específica del antígeno que el antígeno en forma soluble en agua. La forma incorporada en partículas evita la degradación ocasionada por el bajo pH del estómago y la actividad proteolítica de las sales biliares del intestino, y además mejora la absorción del antígeno a través de células M fagocíticas (2). Después del transporte de las micropartículas a la cúpula de las PP, se degradan y se libera la vacuna en el tejido linfoide. Tras la estimulación mediante un antígeno en las PP y la presentación a las células B y T, el antígeno induce la proliferación de estas células, que posteriormente abandonan las PP a través de los vasos linfáticos eferentes y pasan a la circulación sistémica por el conducto torácico (1-4). Eldridge sugirió que las partículas más grandes (de 5 a 10 μm) permanecían en las PP mientras que las más pequeñas (<5 μm) se transportaban por vía sistémica al sistema linfático (5).

En nuestros anteriores estudios se determinó que la solución de quitosano (CS) 1% en ácido acético, tripolifosfato de sodio (STPP), propileno glicol (PG) y glicerol es compatible con el toxoide tetánico (TT) cuando se analiza utilizando la técnica rocket electroforesis (6). El CS tiene propiedades biológicas favorables, como la biodegradabilidad y biocompatibilidad. El CS tiene una toxicidad oral baja, con valores de LD50 de 16 g/kg en ratas (7,8).

El tétanos es todavía un problema de salud importante en los países en vías de desarrollo y

of novel delivery systems for oral administration of vaccines, which can be used to package and deliver a range of antigens from important pathogens. Mainly for reasons of safety, it would be desirable if these novel delivery systems were based on non-living carrier systems, rather than modified bacterial or viral vectors (1).

Peyer's patches (PPs) are the main target for oral vaccine, which are present in the lower ileum². The use of polymeric microparticles offers significant potential for the development of orally administered vaccines. Microparticles can be prepared from a range of different polymers, which can be designed to protect entrapped vaccine against degradation, to delay the gastric transit of the vaccine or to target vaccines for uptake into the mucosal associated lymphoid tissues (MALTs) of the PPs. The antigen incorporated into particulates will induce antigen-specific immune response to a greater extent than an antigen in the water soluble form. The particle-incorporated form protects them from degradation by low pH of the stomach and proteolytic activity of enzymes and bile salts in the gut, and additionally enhances the antigen uptake via phagocytic M cells (2). After transport of the microparticles to the dome of the PPs, the microparticles are degraded and the vaccine is released into the lymphoid tissue. Following stimulation by an antigen in PPs and its presentation to B- and T-cells, the antigen induces B- and T-cells proliferation and these cells subsequently leave the PPs via efferent lymphatics and reach the systemic circulation through the thoracic duct (1-4). Eldridge suggested that larger particles (5-10 μm) remained in the PPs while smaller particles (<5 μm) were transported systemically in the lymph (5).

It has been reported in our previous studies that Chitosan (CS) solution in 1% acetic acid, sodium tripolyphosphate (STPP), propylene glycol (PG), glycerol are compatible with tetanus toxoid (TT) when analyzed using rocket electrophoresis technique (6). CS has favorable biological properties such as biodegradability and biocompatibility. CS has low oral toxicity with LD50 of 16 g/kg in rats (7,8).

Tetanus is still a major health problem in developing countries and continues to occur in countries with high medical standard (9). Tetanus kills on an average 140 times more individuals in poor developing countries than in rich developed countries. There are about 57 countries

sigue apareciendo en países con altos estándares médicos (9). La mortalidad en los países pobres en vías de desarrollo es 140 veces superior a la de los países ricos desarrollados. Existen aproximadamente 57 países en los que el tétanos se considera una de las enfermedades principales (10).

En la actualidad, el toxoide tetánico se administra por vía intramuscular y se debe almacenar a temperaturas entre 4 y 8 °C.

Por tanto, una formulación que no requiera su almacenamiento en frío y se pueda autoadministrar sería beneficiosa (11).

Los estudios actuales se llevaron a cabo con el fin de investigar el potencial de las micropartículas de quitosano para la administración oral de vacunas a través de las vías mucosas. Se investigó la inducción de respuestas sistémicas e inmunes locales después de la administración oral de TT asociado a micropartículas de CS. La vacuna con micropartículas de CC con TT se administró por vía oral a ratones y se determinó la volumetría de IgG en suero y de IgA en lavado intestinal. La respuesta inmune a la formulación se comparó con TT simple para evaluar la mejora en la inmunidad sistémica y en la mucosa oral.

PARTE EXPERIMENTAL

La muestra de CS fue proporcionada gratuitamente por el Central Institute of Fisheries Technology, Cochin (peso molecular ~600.000 dalton, grado de desacetilación >85%; el pH de la solución al 1% en ácido acético al 1% fue de 4.5 con una viscosidad de 132 cP). El STPP se adquirió a National Chemicals, Baroda, India. El toxoide tetánico (TT, 3840 Lf/ml) y el anticuerpo primario [IgG, policlonal de caballo contra TT, 500 UI/ml] fueron regalados generosamente por Serum Institute of India Ltd., Pune.

Los anti IgG de ratón, anti IgG de caballo y anti IgA de ratón conjugados con fosfatasa alcalina, Tween 80, albúmina de suero bovino (ASB) y p-nitrofenil fosfato (pNPP) se adquirieron a Sigma, EE. UU. Las placas ELISA de 96 pozos de fondo plano (Nunc-Immuno™ con superficie Maxisorb™) se adquirieron a Nunc, Dinamarca. Para la lectura de las placas ELISA se utilizó una lavadora de microplacas BioRad y un lector de microplacas BioRad modelo 550,

where tetanus is considered as a one of the major disease (10).

At present, Tetanus toxoid is administered through i.m. route and should be stored at 4-8°C. Therefore, formulation, which does not require cold storage condition and which can be self-administered, would prove to be beneficial (11).

The current studies were performed to investigate the potential of CS microparticles for oral mucosal vaccine delivery. The induction of systemic and local immune responses after oral administration of TT associated to CS microparticles were investigated. Mice were orally vaccinated with TT loaded CS microparticles; both IgG titres in serum and IgA titres in intestinal lavage were determined. The extent of immune response from the formulation was compared with plain TT to assess improvement in oral mucosal and systemic immunity.

EXPERIMENTAL

CS was a gift sample from Central Institute of Fisheries Technology, Cochin (Molecular weight ~6,00,000 Daltons, Degree of deacetylation >85%, pH of 1% solution in 1% acetic acid was 4.5 with viscosity of 132cP). STPP was purchased from National Chemicals, Baroda. Tetanus toxoid (TT, 3840 Lf/ml) and Primary antibody [IgG, horse polyclonal against TT, 500 IU/ml] was a generous gift from Serum Institute of India Ltd., Pune.

Alkaline phosphatase conjugated anti-mouse IgG, anti-horse IgG and anti-mouse IgA; Tween 80, bovine serum albumin (BSA), p-nitrophenyl phosphate (pNPP) were purchased from Sigma, USA. Flat bottomed 96 well ELISA plates (Nunc-Immuno™ with Maxisorb™ surface) were purchased from Nunc, Denmark. Bio-Rad Microplate washer, BioRad Microplate Reader 550 was used to read ELISA plates and data was analyzed using Microplate Manager™ software. All other reagents were of analytical grade.

Preparation of Plain CS Microparticles:

CS solution, 2ml of 2%, was diluted upto 40ml with Milli Q water and to this 1mg/ml solution of STPP was added drop-wise till the solution turned turbid indicating crosslinking

y los datos se analizaron mediante el software Microplate Manager™. El resto de los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

Preparación de micropartículas de CS simples:

Se diluyeron 2 ml de solución de CS al 2% en 40 ml de agua Milli Q y a ésta se añadió mediante goteo una solución de STPP (1mg/ml) hasta que se volvió turbia, indicando la formación de micropartículas y reticulación. La formación de micropartículas se verificó al microscopio. Se optimizó la cantidad exacta de STPP necesaria para la reticulación del CS.

Optimización de la cantidad de STPP para reticulación de CS:

La cantidad de CS se fijó en 40 mg y se determinó la cantidad óptima de STPP necesaria para la reticulación de CS midiendo el cambio porcentual de transmitancia (%T) a 600 nm con un espectrofotómetro UV visible Shimadzu UV-1601. Durante la reacción, se controló el pH utilizando un medidor digital de pH global DPH-500. El CS (40 mg) se extrajo de la solución de almacenamiento (2% de ácido acético en agua Milli Q al 1%) y el volumen se completó con agua Milli Q hasta 40 ml para obtener una solución de 1 mg/ml. A esta solución se añadió 1 ml de solución de STPP (2 mg/ml) y se dejó reaccionar durante 10 minutos removiendo de forma constante y se midió el porcentaje de transmitancia (T%). Este paso se repitió hasta que el %T se hizo constante. El %T se trazó en función de la cantidad de STPP añadido.

Estimación del TT mediante ELISA:

Para realizar la estimación del TT (12) se utilizó el método ELISA modificado. En resumen, se preparó la curva estándar de TT mediante la adsorción de placas ELISA de 96 pocillos de fondo plano con diluciones dobles de TT en 50 mM de tampón con revestimiento bicarbonato de pH 9.6 e incubado a 37,5 °C durante 1 hora con lavado posterior, bloqueado y con tratamiento con anticuerpos primarios y secundarios, [conjugado anti IgG de caballo con fosfatasa alcalina]. Se

and microparticle formation. The formation of microparticles was verified microscopically. The exact quantity of STPP required to crosslink CS was optimized.

Optimization of amount of STPP to cross-link CS:-

CS amount was fixed at 40mg and optimum amount of STPP required to cross-link CS was determined by measuring change in percent transmittance (%T) at 600nm using Shimadzu-1601 UV-Visible Spectrophotometer. pH was monitored during the reaction using global digital pH meter, DPH-500. CS (40mg) was taken from stock solution (2% in 1% acetic acid Milli Q water) and volume was made up to 40ml to get 1 mg/ml solution using MilliQ water. To this, 1ml of STPP 2mg/ml solution was added and allowed to react for 10 min under continuous stirring and %T was measured. The step was repeated till %T became constant. %T was plotted against the amount of STPP added.

Estimation of TT using ELISA:

Modified ELISA method was used for the estimation of TT (12). In short, TT standard curve was prepared by adsorbing flat bottomed 96 well ELISA plates with two fold dilutions of TT in 50 mM bicarbonate coating buffer of pH 9.6 and incubated at 37.5°C for 1 hr followed by washing, blocking and treatment with primary and secondary antibodies, [antihorse IgG conjugated with alkaline phosphatase]. To this 100µl of p-NPP was added and incubated at room temperature for 30 minutes in dark. Plate was read at 450nm. Standard calibration plot was prepared during every analysis to compensate for the variation due the binding of the TT with the plate. The unknown samples, suitably diluted, were estimated with respect to the standard curve. The plot of optical density at 450nm vs concentration of TT (Lf/ml) showed linear relationship with $r^2 > 0.99$.

añadieron 100 μ l de p-NPP y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos a oscuras. La placa se leyó a 450 nm. Durante cada análisis se preparó un gráfico de calibración estándar para compensar la variación debida a la unión del TT con la placa. Se realizó una estimación de las muestras desconocidas, diluidas adecuadamente, con respecto a la curva estándar. El gráfico de densidad óptica a 450 nm en relación a concentración de TT (Lf/ml) mostró una relación lineal con $r^2 > 0,99$.

Preparación de micropartículas cargadas con TT:

Las micropartículas cargadas con TT se prepararon añadiendo 1000 Lf TT a la solución de CS. A esta solución se añadió 1 ml de STPP cada 10 minutos. Se optimizaron diferentes variables como a viscosidad del medio de reacción, el pH del medio de reacción y la velocidad de adición del STPP en términos de porcentaje de captura.

La proporción de CS respecto a STPP se optimizó a 1,16:1 (p:p). Se optimizaron otras condiciones de formulación de variables con el objeto de capturar 1000 Lf de TT por lote. La Fase A se preparó tomando 2 ml de CS de la solución de almacenamiento. A esto se le añadió una solución de TT (1000 Lf) y se completó el volumen hasta 40 ml. A la Fase A se le añadió 1 ml de una solución de STPP (2,8 mg/ml) cada 10 minutos. La eficacia de captura se calculó midiendo el TT no capturado del sobrenadante obtenido tras la centrifugación mediante el método ELISA.

Se estudió el efecto de la viscosidad del medio de reacción en la captura (Tabla 1). El volumen final del medio fue 50 ml (40 ml de CS + 10 ml de STPP). El volumen del agua (Tabla 2) se optimizó determinando la eficacia del encapsulamiento en diferentes volúmenes, 25 ml (15 ml de CS+10 ml de STPP), 50 ml (40 ml de CS+ 10 ml de STPP) y 60 ml (50 ml de CS +10 ml de STPP) del volumen del medio de reacción final. Se comprobó el efecto del pH sobre la captura de TT con pH de 4,5; 6 y 7. El pH del medio de reacción se ajustó a pH 6 y 7, utilizando una solución de carbonato sódico al 1%. Se comprobó el efecto de la velocidad de adición de STPP en cuatro niveles: 1 ml por minuto, 5 ml por minuto, 1 ml por 5 minutos y

Preparation of TT Loaded Microparticles:

TT loaded microparticles were prepared by adding 1000Lf TT to CS solution. To this 1ml STPP was added at every 10 minutes. Different variables like viscosity of reaction medium, pH of reaction medium and rate of addition of STPP were optimized in terms of % entrapment.

The ratio of CS to STPP was optimized to 1.16:1 (w:w). Other variable formulation conditions were optimized so as to entrap 1000Lf of TT per batch. Phase A was prepared by taking 2 ml of CS from stock solution. To this, TT (1000Lf) solution was added and volume was made up to 40ml. To Phase A, 1ml of 2.8 mg/ml solution of STPP was added after every 10 min. Entrapment efficiency was calculated by measuring the untrapped TT from supernatant obtained after centrifugation using ELISA method.

Effect of viscosity of the reaction medium on entrapment was studied (Table 1). Final volume of medium was 50 ml (40ml CS + 10 ml STPP). Volume of water (Table 2) was optimized by determining encapsulation efficiency at different volumes i.e. 25ml (15ml CS+10ml STPP), 50 ml (40ml CS+ 10ml STPP) and 60ml (50ml CS +10ml STPP) of the final reaction medium volume. Effect of pH on the entrapment of TT was checked at pH 4.5, 6 and 7. The pH of the reaction medium was adjusted to pH 6 and 7, using 1% sodium carbonate solution. Effect of rate STPP addition was checked at four levels: 1ml per min, 5ml per min, 1ml per 5min and 1ml per 10 min after mixing CS and TT (Table 2).

1 ml por 10 minutos después de mezclar CS y TT (Tabla 2).

TABLA 1: Efecto de la viscosidad del medio de reacción sobre el porcentaje de eficacia de captura de TT.
TABLE 1: Effect of viscosity of reaction medium on the % entrapment efficiency of TT.

Composición del disolvente <i>Solvent composition</i>	Viscosidad (cP) <i>Viscosity (cps)</i>	% EC± D.E. %EE± S.D.
Glicerol <i>Glycerol</i>	377,9	21,54 ± 0,72
Agua: Glicerol (50:50) <i>Water: Glycerol (50:50)</i>	185,0	46,34 ± 0,61
Propileno glicol <i>Propylene glycol</i>	48,00	47,81 ± 0,90
Agua: PG (50:50) <i>Water: PG (50:50)</i>	22,50	61,20 ± 0,87
Agua <i>Water</i>	9,600	83,50 ± 0,12

TABLA 2: Efecto del volumen de agua, el pH del medio de reacción y la velocidad de adición de tripoli-fosfato de sodio (STPP) en el porcentaje de eficiencia de captura (%EC) del TT.

TABLE 2: Effect of volume of water, pH of reaction medium and rate of sodium tripolyphosphate (STPP) addition on %entrapment efficiency (%EE) of TT.

Volumen de agua (ml) <i>Volume of water (ml)</i>	% EC± D.E. %EE ± S.D.	pH <i>pH</i>	% EC± D.E. %EE ± S.D.	Velocidad de adición de STPP <i>Rate of addition of STPP</i>	% EC± D.E. %EE ± S.D.
25	61,70 ± 0,92	4.5	99,20 ± 0,98	5 ml/min	85,07 ± 0,26
50	85,20 ± 0,63	6	83,10 ± 0,12	1 ml/min	71,20 ± 0,13
60	99,10 ± 0,05	7	76,80 ± 1,02	1 ml/5 min	99,10 ± 0,05
				1 ml/10 min	99,24 ± 0,12

Método de preparación de micropartículas de CS-TT

La proporción de CS – STPP se tomó como 1,16:1 (p/v). Para lograr la distribución de tamaño de partículas requerida se utilizó el siguiente método:-

Fase A: CS - 80 mg; TT-1500 Lf; agua Milli Q qs 100 ml

Fase B: STPP- 56 mg; agua Milli Q qs- 20 ml

La Fase A se mezcló a 1000 rpm durante 20 minutos en un agitador magnético. A la Fase A se le añadió la Fase B mediante goteo, remo-

Method of Preparation of CS-TT microparticles

Ratio of CS to STPP was taken as 1.16:1 (w/w). Following method was used to achieve the required particle size distribution:-

Phase A: CS - 80 mg; TT-1500 Lf; Milli Q water qs 100ml

Phase B: STPP- 56 mg; Milli Q water qs- 20ml

Phase A was allowed to mix at 1000 rpm for 20 min on magnetic stirrer. To phase A, phase B was added drop wise, under continuous stirring, at the rate of 1ml per 5min. After completion of

viendo de forma constante, a una velocidad de 1 ml cada 5 minutos. Tras haber completado la adición, se dejó madurar el sistema durante 20 minutos removiendo de forma constante. Después se centrifugó a 1200 rpm durante 15 minutos en una centrifugadora industrial Remi K-70 y se retiró cuidadosamente el sobrenadante. El sedimento se volvió a dispersar en 20 ml de propileno glicol y se mezcló adecuadamente. Esta suspensión se pasó por un microfluidizador Emulsiflex C-5 (EC-5), dos ciclos sin presión, para asegurar una mezcla adecuada. Después de enfriar el sistema durante 10 minutos a 4 °C, se volvió a pasar por el EC-5, 2 ciclos a una presión de 5000 psi. El producto obtenido se almacenó a 4 °C durante 15 minutos, se le añadieron 5 ml de carboximetilcelulosa de sodio al 2% y se procesó utilizando un homogeneizador tipo silverson CAT-560 durante 12 minutos a 4500 rpm en un baño de hielo. La distribución del tamaño de las partículas se determinó con el analizador de tamaño de partícula Malvern, Reino Unido. La eficacia de captura se calculó midiendo el TT no capturado en el sobrenadante obtenido tras la centrifugación mediante ELISA.

Estudio de liberación de TT en 0,1 N HCl y solución salina de tampón fosfato (PBS) (pH 7.4):

Del lote final, que contenía 1500 Lf TT, se tomó 1 ml, que se añadió a 5 ml de 0,1 N HCl o PBS (pH 7.4) y se colocó en un agitador incubador a 100 rpm a una temperatura de 37,5 °C. Se extrajeron muestras a los 30, 60 y 120 minutos y se sustituyeron por PBS ó 0,1 N HCl fresco. Las muestras extraídas se diluyeron adecuadamente con 50 mM de tampón con revestimiento bicarbonato (pH 9.6) y se analizó el TT mediante ELISA.

Estudios sobre vacunación oral:

Las respuestas inmunes local y sistémica se midieron en ratones BALB/c de 5 a 6 semanas de edad y con un peso entre 15 y 20 g. El comité de ética para animales de laboratorio de M.S. University of Baroda, Gujarat, India, dio su aprobación a todos los experimentos con animales.

addition, the system was allowed to cure for 20 min under continuous stirring. After centrifugation using Remi K-70, industrial centrifuge, at 1200 rpm for 15 min, the supernatant was removed carefully. The sediment was redispersed in 20 ml propylene glycol and proper mixing was ensured. This suspension was passed through Emulsiflex C-5 microfluidizer (EC-5), two cycles without pressure, to ensure proper mixing. After cooling the system for 10 minutes at 4°C, it was again passed through EC-5, 2 cycles at 5000psi pressure. The product obtained was stored at 4°C for 15 minutes and to this 5 ml of 2% Sodium carboxymethylcellulose was added and processed using CAT-560 silverson type homogenizer for 12 minutes at 4500 rpm on an ice bath. Particle size distribution was studied using Malvern particle size analyzer, UK. Entrapment efficiency was calculated by measuring the untrapped TT from supernatant obtained after centrifugation using ELISA.

Release study of TT in 0.1 N HCl and Phosphate Buffered saline(PBS) (pH 7.4):

From final batch containing 1500Lf TT, 1 ml was taken and added in 5ml of 0.1N HCl or PBS (pH 7.4) and placed in incubator shaker at 100rpm and 37.5°C. Samples were withdrawn after 30, 60, 120 minutes and replaced by fresh 0.1N HCl or PBS. Withdrawn samples were suitably diluted with 50mM bicarbonate coating buffer (pH 9.6) and analyzed for TT using ELISA.

Oral vaccination studies:

Local and systemic immune responses were measured in 5-6 weeks old BALB/c mice weighing 15-20 g. The Ethical Committee for Laboratory Animals of The M.S. University of Baroda, Gujarat, India, approved all animal experiments.

Systemic immune response was determined by measuring the IgG level in serum and local immune response was determined by measuring IgA level in intestinal lavage and fecal extracts. Following procedures were used.

La respuesta inmune sistémica se determinó midiendo el nivel de IgG en suero, y la respuesta inmune local se determinó midiendo el nivel de IgA en lavado intestinal y en extractos fecales. Se utilizaron los siguientes procedimientos.

Evaluación de la relación dosis-respuesta en la inmunidad sistémica

Se tomaron siete grupos de animales, cada uno de ellos compuesto por 5 ratones BALB/c. Los 3 primeros grupos fueron tratados con micropartículas de quitosano que contenían TT 20, 40, 60 Lf respectivamente; los tres grupos siguientes se trataron con TT simple 20, 40, 60 Lf, respectivamente por vía oral. Al séptimo grupo se le administró 10 Lf TT adsorbido en fosfato de aluminio por vía intramuscular. La dosificación se realizó los días 1, 2, 3 y 15, 16 y 17. Seis horas antes de administrar la dosis se les retiró la comida, pero tuvieron agua disponible ad libitum. El día 22 se extrajo sangre del plexo retroorbital y se dejó coagular, se centrifugó a 14.000 rpm para retirar el suero y se almacenó a -20 °C.[2]

Evaluación de la respuesta inmune cinética sistémica.

Tres grupos de animales, cada uno de ellos con 10 ratones BALB/c, fueron tratados con CS con 40 Lf TT; micropartículas de CS simples y 40 Lf TT simple, respectivamente. Se administraron por vía oral 0,5 ml del compuesto anterior los días 1, 2, 3 y 15, 16 y 17 utilizando una aguja de administración oral modificada. Los días 14, 22 y 29 se extrajo sangre del plexo retroorbital, se recogió el suero y se almacenó a -20 °C.

Evaluación de la respuesta inmune local.

Se tomaron dos grupos de animales, cada uno formado por 10 ratones BALB/c. Al primer grupo se le administraron micropartículas de CS con 40 Lf TT; al segundo se le administraron 40 Lf TT simple por vía oral los días 1, 2, 3 y 15, 16, 17. Seis horas antes de administrar la dosis se les retiró la comida, pero tuvieron agua disponible ad libitum.

Assessment of dose response relationship for systemic immunity

Seven animal groups, each group containing 5 BALB/c mice were taken. First 3 groups were treated with chitosan microparticles containing TT 20, 40, 60 Lf respectively; the next three groups with plain TT 20, 40, 60 Lf respectively through oral route. In Seventh group 10Lf TT adsorbed on aluminium phosphate was administered through *i.m.* route. Dosing was done on 1st, 2nd, 3rd and 15th, 16th, 17th day. Food was withdrawn 6 hour before administration of the dose but water was available ad libitum. Blood was withdrawn from retro-orbital plexus on 22nd day and allowed to clot, centrifuged at 14000 rpm to remove the sera and stored at -20°C.[2]

Assessment of systemic kinetic immune response.

Three animal groups, each containing 10 BALB/c mice were treated with CS containing 40Lf TT; plain CS microparticles; and plain 40Lf TT respectively, 0.5ml of the above were administered orally on 1st, 2nd, 3rd and 15th, 16th, 17th day using modified oral feeding needle. Blood was withdrawn from retro-orbital plexus on 14th, 22nd and 29th day and sera was collected and stored at -20°C.

Assessment of local immune response.

Two animal groups, each group containing 10 BALB/c mice were taken. In first group CS microparticles containing 40Lf TT; in second group plain 40Lf TT were administered orally on 1st, 2nd, 3rd and on 15th, 16th, 17th day. Food was withdrawn 6 hour before administration of the dose but water was available ad libitum.

Procedure for collection of intestinal lavage fluid:

Each mouse was kept in glass petri dish and four doses of 0.5ml of the lavage solution [25mM NaCl, 40mM Na₂SO₄, 10mM KCl, 20mM NaHCO₃, and 48.5mM (162gm/ltr) Polyethylene Glycol (PEG)(average MW 3350)] were administered orally at 15 min intervals. Thirty minutes after the last dose of lavage solution, the mice were administered 0.1 mg pilocarpine intra-peritoneally.

Procedimiento para la obtención de fluido del lavado intestinal:

Se colocó a cada ratón en una placa de Petri de cristal y se les administraron por vía oral y a intervalos de 15 minutos cuatro dosis de 0,5 ml de solución del lavado [25 mM NaCl, 4 mM Na₂SO₄, 10 mM KCl, 20 mM NaHCO₃ y 48,5 mM (162 gm/ltr) polietileno glicol (PEG) (media MW 3350)]. Treinta minutos después de la última dosis de solución del lavado se les administró 0,1 mg de pilocarpina intraperitoneal. Durante los siguientes 20 minutos, se recogió el contenido intestinal descargado en un tubo de plástico que contenía tampón con 0,5 ml de mezcla de inhibidores de proteasas (50 mM EDTA, 1% BSA, 0,1 mg/ml de inhibidor de tripsina de la soja y 2 mM PMSF en PBS, pH 7,3) y se congeló a -70 °C hasta la realización de la prueba (13,14).

Procedimiento para la obtención de muestras de materia fecal:

Se recogieron cinco muestras (~100mg) de heces recién evacuadas de cada ratón y se incubaron durante 15 minutos en 4 ml de tampón de homogeneización (50 mM EDTA, 1% BSA, 0,1 mg/ml de inhibidor de tripsina de soja y 2 mM PMSF en PBS, pH 7.3) en hielo, que se machacaron a continuación con una aguja roma. Los sobrenadantes obtenidos centrifugando la suspensión durante 25 minutos a 13.000 rpm a 4 °C, se almacenaron a -20 °C hasta la realización de la prueba (13,14).

Estimación de IgG específico de TT en suero de ratones:

Para realizar la detección de IgG específico de TT se utilizó el método ELISA modificado (2,15). En resumen, se utilizó la técnica ELISA recubriendo placas ELISA de 96 pocillos y fondo plano con 100µl de 1 Lf/ml TT con 50 mM en tampón con revestimiento bicarbonato pH 9,6, se incubó durante 1 hora, se lavó con PBS-T-0,05%, se bloqueó utilizando BSA al 0,5% en un tampón fosfato (10 mM) y se volvió a incubar durante 1 hora. Se le añadió anticuerpo primario [IgG, policlonal de caballo contra TT] y se incubó durante 1 hora, seguido por un lavado y seguidamente se añadieron anticuerpos

Discharged intestinal contents, over the next 20 min, were collected in plastic tube containing 0.5 ml of protease inhibitor cocktail buffer (50mM EDTA, 1% BSA, 0.1 mg/ml soybean trypsin inhibitor and 2 mM PMSF in PBS, pH 7.3) and frozen at -70°C until tested (13,14).

Procedure for collection of fecal matter samples:

Five pieces (~100mg) of freshly voided faeces from each mouse were collected and incubated for 15 min in 4ml of homogenization buffer (50mM EDTA, 1% BSA, 0.1 mg/ml soybean trypsin inhibitor and 2 mM PMSF in PBS, pH 7.3) on ice, followed by mashing it with a blunt needle. The supernatants, obtained by centrifuging the suspension for 25 min at 13000 rpm at 4°C, were stored at -20°C until tested (13,14).

Estimation of TT specific IgG in mice sera:

Modified ELISA method was used for detection of TT specific IgG (2,15). In short, ELISA was performed by coating flat bottomed 96 well ELISA plates with 100µl of 1Lf/ml TT in 50 mM bicarbonate coating buffer of pH 9.6, incubated for 1 hr, washed with PBS-T-0.05%, blocked using 0.5% BSA in 10mM phosphate buffer and again incubated for 1 hr. To this primary antibody [IgG horse polyclonal against TT] was added and incubated for 1 hr followed by washing and addition of secondary antibodies, [antihorse IgG, alkaline phosphatase conjugated] and incubated. To this p-NPP was added and incubated at RT for 30 minutes in dark. Plate was read at 450nm. The plot of optical density at 450nm vs concentration of IgG (IU/ml) showed linear relationship with $r^2 > 0.99$. This linear relationship was utilized to determine IgG levels in serum of mice after suitable dilution.

TT specific IgA estimation in experimental animals using ELISA:

Estimation of TT specific IgA in samples of fecal extracts and intestinal lavage was done by using ELISA by following the same method as that of IgG in mice except anti-mouse IgA conjugated with alkaline phosphatase enzyme was used as secondary antibody (2).

secundarios [conjugado, fosfatasa alcalina, anti IgG de caballo] y se incubó. Se añadió p-NPP y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos a oscuras. La placa se leyó a 450 nm. El gráfico de la densidad óptica a 450 nm frente a concentración de IgG (UI/ml) mostró una relación lineal con $r^2 > 0,99$. Esta relación lineal se utilizó para determinar los niveles de IgG en el suero de los ratones después de haberlo diluido adecuadamente.

Estimación de IgA específico de TT en animales experimentales mediante ELISA:

La estimación de IgA específico de TT en muestras de extractos fecales y lavado intestinal se realizó mediante ELISA siguiendo el mismo método que con IgG en ratones, pero se utilizó conjugado anti IgA de ratón con enzima de fosfatasa alcalina como anticuerpo secundario (2).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

Preparación de micropartículas:

Se utilizó STPP reticulante iónico para la reticulación de CS. Las reacciones de CS con componentes cargados negativamente se pueden demostrar mediante espectro de IR, volumetría turbidimétrica o viscosimetría. Las micropartículas de quitosano se pueden formar mediante la adición de reticulante iónico o covalente. La reticulación iónica es un procedimiento simple y suave en comparación con la reticulación covalente (16,17).

La reacción de reticulación se puede controlar midiendo el pH, ya que la adición de tripolifosfato provoca la liberación de iones OH^- . Con objeto de estudiar la cantidad de STPP requerida para la completa reticulación del quitosano, se midió el cambio del %T en función del aumento de la cantidad de STPP. El %T se comparó según la cantidad de STPP añadido, como se muestra en la Figura 1.

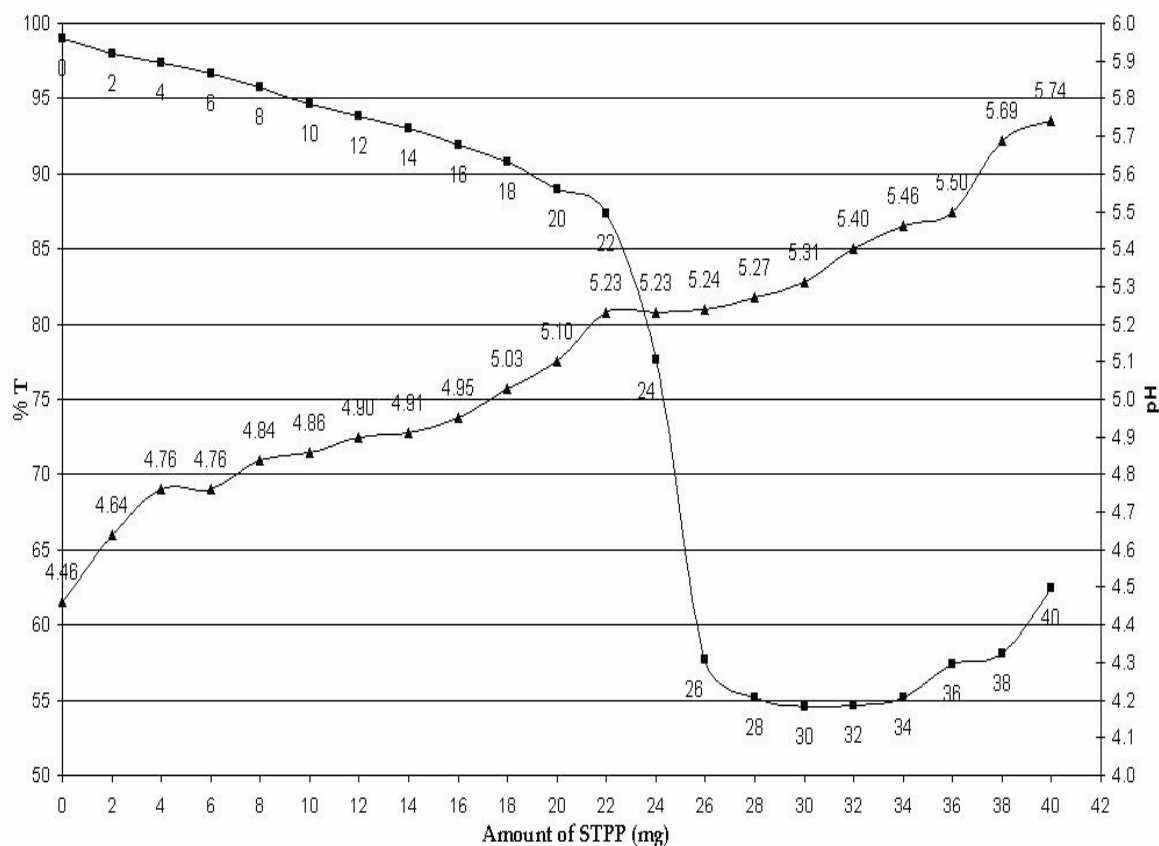
RESULTS AND DISCUSSION:

Preparation of microparticles:

Ionic crosslinker STPP was used for crosslinking of CS. Reactions of CS with negatively charged components can be demonstrated by IR spectra, turbidimetric titration or viscometry. Chitosan microparticles can be formed by the addition of either covalent or ionic crosslinker. Ionic crosslinking is a simple and mild procedure as compared to covalent crosslinking (16,17).

The crosslinking reaction can be monitored by pH measurement as addition of tripolyphosphate leads to the release of OH^- ions. To study the required amount of STPP for complete crosslinking of chitosan, change in %T was measured as a function of increased amount of STPP. %T was plotted against the amount of STPP added as shown in Figure 1.

FIGURA 1: Efecto de la adición de STPP en el pH y el %T de CS.
FIGURE 1: Effect of addition of STPP on pH and %T of the CS.



El gráfico muestra claramente que el %T disminuyó al añadir STPP. La velocidad de disminución del %T fue lenta y constante hasta que se añadieron 22 mg de STPP. La velocidad de disminución del %T fue muy rápida cuando se añadieron entre 22 y 28 mg de STPP, tras lo cual el %T permaneció constante. El %T disminuye a medida que se realiza la reticulación de los grupos amino libres protonados mediante grupos de fosfato de STPP, disminuyendo la solubilidad del CS. La reducción del %T con el aumento de la concentración de STPP se puede atribuir a la reticulación de los grupos amino protonados de CS mediante iones de fosfato de STPP. El aumento del %T después de la reticulación completa se puede deber a la dilución del sistema. La cantidad de STPP requerida para la reticulación de 40 mg de CS se calculó desde el punto en el que el %T permaneció constante, que fue 28 mg.

El pH del sistema durante esta fase estuvo entre 5,2 y 5,4. El pH del sistema aumentó con la adición de STPP, permaneció constante en

The plot clearly shows that the %T decreased with addition of STPP. The rate of decrease of %T was slow and steady till 22mg of STPP was added. The rate of decrease in %T was very fast after 22 mg till 28mg of STPP was added, after which %T remained constant. The %T decreases as the free protonated amino groups are crosslinked by phosphate groups of STPP, decreasing solubility of CS. The reduction in %T with increasing concentration of STPP can be attributed to the crosslinking of the protonated amino groups of CS by phosphate ions of STPP. The increase in %T after complete crosslinking is may be due to the dilution of the system. The amount of STPP required to crosslink 40 mg of CS was calculated from the point at which %T remained constant and was found to be 28mg.

The pH of the system during this phase was found to be 5.2 to 5.4. The pH of the system increased with the addition of STPP, remained constant in between and again increased in last phase. The pH was below the isoelectric point of chitosan (pH 6.5) indicating that the decrease

la fase intermedia y volvió a aumentar en la última fase. El pH estuvo por debajo del punto isoeléctrico del quitosano (pH 6,5), lo que indica que la disminución del %T sólo se debió a la interacción iónica de los grupos amino protonados del quitosano y los grupos de fosfato del STPP y no a la reacción de separación de la fase de coacervación.

Optimización de las condiciones experimentales

Se optimizaron otras condiciones experimentales como la viscosidad, el pH y el volumen del medio de reacción y la velocidad de adición del STPP hasta lograr la carga de TT máxima y las características deseables del producto.

Se cambió la viscosidad del medio de reacción mediante distintas composiciones de solventes y se estudió su efecto en la captura de TT. Los resultados mostraron que la eficacia de captura disminuyó con el aumento de la viscosidad del medio de reacción (Tabla 1). Este hecho puede deberse a la reducción de la interacción entre el CS y el STPP debido al aumento de viscosidad, lo que da como resultado una captura baja; la estructura desenrollada ampliada también puede presentar dificultades debido a la elevada viscosidad, reduciendo la interacción con el TT y el STPP a causa de barreras estéricas. La captura máxima se obtuvo con agua, en comparación con otras composiciones de solventes. Por tanto, se seleccionó el agua como medio de reacción.

Se estudió el efecto del volumen de agua como medio de reacción de 25 a 60 ml. La captura fue casi del 100% en 60 ml de volumen. Esto se puede atribuir a la estructura extendida del quitosano debido al efecto de dilución en volúmenes mayores, permitiendo la máxima interacción entre CS-TT y CS-TT-STPP. (Tabla 2)

El pH del medio de reacción es un parámetro importante, porque se sabe que el pH influye sobre la cantidad de proteína incorporada en nanopartículas y micropartículas de polímero (19-21). También afecta la estructura del CS (22) y su reacción con los aniones de TPP (23) requeridos para la preparación de micropartículas de CS. Al mismo tiempo, el pH también tiene un efecto significativo en los cambios químicos y estructurales y en la estabilidad de las proteínas (24), y determinaría su interacción con el STPP y

in %T was only due to ionic interaction of the protonated amino groups of chitosan and phosphate groups of the STPP and not due to the coacervation-phase separation reaction.

Optimization of experimental conditions

Other experimental conditions like viscosity, pH and volume of the reaction medium, rate of STPP addition were optimized to achieve maximum TT loading and desirable product characteristics.

Viscosity of the reaction medium was changed by different solvent compositions and its effect on entrapment of TT was studied. The results showed that entrapment efficiency decreased with increase in viscosity of the reaction medium (Table 1). This may be due to reduction in interaction between the CS and STPP due to increased viscosity, leading to low entrapment and also the extended uncoiled conformation (18) of CS may be hindered due to high viscosity reducing the interaction with TT and STPP due to steric hindrances. The entrapment was found to be maximum in water as compared to the other solvent compositions. Therefore, water was selected as the reaction medium.

Effect of volume of water as a reaction medium was studied from 25ml to 60ml. The entrapment was found to be nearly 100% in 60ml volume. This can be attributed to the extended conformation of chitosan due to dilution effect at higher volumes enabling maximum interaction between CS-TT and CS-TT-STPP. (Table 2)

Reaction medium pH is important parameter because pH is known to influence the amount of protein incorporated into polymer nano- and microparticles (19-21). It also affects CS conformation (22) and its reaction with TPP anions (23) required for preparation of CS microparticles. At the same time, pH also has significant effect on the chemical and conformational changes and stability of proteins (24) and would govern its interaction with STPP and CS during microparticle formation (25). The entrapment decreased as the pH shifted towards neutral pH. (Table 2) This observation strengthens the importance of maintaining the reaction medium pH below pKa value of CS which is 6.5. As the pH approaches the pKa value, CS will precipitate due to the reduced solubility rather than reduced availability of the

el CS durante la formación de las micropartículas (25). La captura disminuyó a medida que el pH se volvía desplazaba hacia el neutro. (Tabla 2) Esta observación refuerza la importancia de mantener el pH del medio de reacción por debajo del valor de pKa del CS, que es de 6,5. A medida que el pH se aproxima al valor de pKa, el CS se precipita, debido principalmente a la reducción de la solubilidad más que a la reducción de la disponibilidad de los grupos amino iónicos por la interacción iónica con el STPP. Por ello, la interacción iónica entre el CS y el STPP sigue sin completarse y, por tanto, reduce la captura. El pH del medio de reacción también es importante desde el punto de vista de la interacción TT - CS. El punto isoeléctrico (pI) del TT está entre 4,8 y 5,0. Por debajo del valor de pI, el toxoide se cargará negativamente, lo que ocasiona la máxima interacción iónica con CS cargado positivamente. Las proteínas se pueden adsorber con gran eficacia en polímeros con un pH aproximado a su punto isoeléctrico (pI), debido a la minimización de la repulsión electrostática, el aumento de la estabilidad estructural y a la menor superficie específica (9) durante el proceso de encapsulación. Al mismo tiempo, la presencia de moléculas toxoides zwitteriónicas en estado globular puede favorecer su asociación hidrofóbica con el quitosano junto con enlaces H. Como pH inicial de la reacción se eligió 4,5. Como el pH inicial de la solución de CS es 4,5 y después de la adición del STPP requerido fue 5,3, un valor por debajo del pKa de CS y justo por encima del pI de toxoide, se utilizó el medio de reacción tal cual, sin ajustar el pH inicial. Se comprobó la velocidad de adición del STPP, ya que el cambio de pH es directamente proporcional a la velocidad de adición de STPP. Se observó que el % de EC aumentaba al disminuir la velocidad de adición (Tabla 2). Cuanto mayor era la velocidad de adición de STPP, menor era el período de interacción entre CS-TT y CS-TT-STPP y más baja era la captura. De aquí que se utilizara una velocidad de adición lenta de 1 ml en 5 minutos, ya que se obtenía un valor de EC del 99%.

ionic amino groups due to ionic interaction with STPP. Due to this, the ionic interaction between the CS and STPP will remain incomplete, thus giving low entrapment. The pH of the reaction medium is also important from TT - CS interaction point of view. The isoelectric point (pI) of TT is in between 4.8-5.0. Below pI value, the toxoid will be negatively charged, giving rise to maximum ionic interaction with positively charged CS. Proteins can adsorb very efficiently onto polymers at pH around their isoelectric point (pI) because of the minimization of electrostatic repulsion, increased conformational stability and smaller specific surface area (9) during the encapsulation process. At the same time, the presence of zwitterionic toxoid molecules in the globular state can favor their hydrophobic association with chitosan along with H-bonding. pH 4.5 was chosen as the initial pH of the reaction. As the initial pH of the CS solution is 4.5 and pH, after addition of required STPP was 5.3, which is below the pKa of CS and just above the pI of toxoid, the reaction medium was used as such without adjusting the initial pH.

Rate of STPP addition was checked as the change in pH is directly proportional to rate of addition of STPP. It was observed that %EE increased as rate of addition decreased (Table 2). Faster the rate of addition of STPP and lesser will be the interaction period between CS-TT and CS-TT-STPP and lower will be the entrapment. Hence, a slow addition rate of 1ml per 5min was used as it gave 99% EE.

Method of preparation CS-TT microparticles:

The initial formulation, prepared in water, was found to have large particles with mean diameter of 125.76 μm and very broad particle size distribution. The particle size was reduced when the batch was prepared in glycerol or propylene glycol instead of water but the entrapment was very poor. So the batch prepared in water was processed for particle size control using Emulsiflex C-5 microfluidizer, Canada and CAT-560 silverson type homogenizer, Switzerland, either alone or in combination, in the presence of sodium carboxymethyl cellulose (SCMC).

For non-loaded particles (CS Plain) 90% particles are below 25.451 μm and mean volume diameter is 15.234 μm . For TT loaded particles

Método de preparación de micropartículas de CS-TT

Se observó que la formulación inicial preparada en agua tenía partículas grandes, con un diámetro medio de 125,76 μm , y que la distribución del tamaño de las partículas era más amplia. El tamaño de las partículas se redujo cuando el lote se preparó en glicerol o propileno glicol en lugar de en agua, pero la captura fue muy baja. Por eso el lote preparado en agua se procesó para controlar el tamaño de las partículas utilizando un microfluidizador Emulsiflex C-5, Canadá, y un homogeneizador tipo silverson CAT-560, Suiza, solo o en combinación, en presencia de carboximetilcelulosa de sodio (SCMC).

El 90% de las partículas no cargadas (CS simple) está por debajo de 25,451 μm , y el diámetro de volumen medio es 15,234 μm . El 90% de las partículas cargadas de TT (CS-TT) está por debajo de 23,652 μm , y el diámetro de volumen medio es 15,154 μm .

Estudio de liberación de TT en 0,1 N HCl y PBS (pH 7.4):

Para garantizar que los toxoides encapsulados estén protegidos de las condiciones lumínicas externas y se liberen en forma de micropartículas hasta que el PP llegue al intestino bajo, es esencial que las micropartículas permanezcan intactas en el medio gástrico ácido, así como en el medio alcalino intestinal. Ya que la duración del vaciado gástrico es de hasta 2 horas, el estudio se llevó a cabo durante 2 horas en condiciones gástricas simuladas mediante el uso de 0,1 N HCl. Sólo se produjo una liberación del 2,4% del TT procedente de micropartículas de quitosano cargadas, en 0,1 N HCl. Esta cantidad se puede atribuir a toxoides ligados a la superficie.

El estudio en PBS (pH 7.4) no mostró ninguna liberación de TT y TT hasta las 2 horas. La razón puede ser que las condiciones de formulación optimizadas habrían garantizado la formación completa de complejos de CS y STPP, obteniéndose la máxima reticulación, y que la densidad de reticulación diera como resultado la captura máxima de toxoides. Además, la interacción iónica adicional entre el TT y el CS podría haber impedido su liberación en PBS.

(CS-TT) 90% particles are below 23.652 μm and mean volume diameter is 15.154 μm .

Release study of TT in 0.1 N HCl and PBS (pH 7.4)

In order to ensure that encapsulated toxoids are protected from the external luminal conditions and they are delivered in the form of microparticles up to the PP's present in lower intestine, it is essential that microparticles should remain intact in gastric acidic medium as well as in intestinal alkaline medium. As the gastric emptying time is up to 2 hours, the study was carried for 2 hrs in gastric conditions simulated by use of 0.1 N HCl. There was only 2.4% release of the TT from loaded chitosan microparticles, in 0.1N HCl. This amount can be attributed to the surface bound toxoids.

Study in PBS (pH 7.4) showed no release of TT and TT up to 2 hours. The reason may be that optimized formulation conditions had ensured there is complete complexation of CS and STPP giving maximum crosslinking and crosslinking density leading to maximum entrapment of toxoids. Further, the ionic interaction between the TT & CS might have prevented their release in PBS.

The stability of CS microparticles in gastric pH (0.1N HCl) and intestinal medium pH (PBS, pH 7.4) is important from the delivery point of view of entrapped TT to PPs, as the soluble TT is incapable of formation of memory cells. This observation is line with observations reported by van der Lubben who observed there was only very negligible i.e. only 2% release of the TT in 0.1N HCl and no release in PBS (pH 7.4) buffer from TT adsorbed on preformed chitosan microparticles (2).

Oral vaccination studies:

Assessment of dose response relationship for systemic immunity

The aim of this in vivo study was to determine a dose-response relationship following oral vaccination with TT. All mice vaccinated with CS-TT showed a strong and significant enhancement in IgG titres against TT. Only minor immune res-

La estabilidad de micropartículas de CS en el pH gástrico (0,1 N HCl) y en el pH del medio intestinal (PBS, pH 7,4) es importante desde el punto de vista de la liberación de TT capturado a las PP, ya que el TT soluble es incapaz de formar células de memoria. Esta observación coincide con las efectuadas por van der Lubben, que observó que el porcentaje de liberación de del TT en 0,1 N HCl era insignificante, un 2%, y que no había liberación en el tampón PBS (pH 7,4) del TT adsorbido en micropartículas preformadas de quitosano (2).

ponses were observed in the groups vaccinated with TT in PBS. Mice vaccinated with 20Lf TT entrapped in chitosan microparticles were found to have a significantly lower systemic immune response than the groups vaccinated with 40 or 60 LF TT entrapped in chitosan microparticles. The response obtained for 60 Lf was found to be lower than 40 Lf TT entrapped in CS. (Figure 2)

Estudios de vacunación oral:

Evaluación de la relación dosis-respuesta en la inmunidad sistémica

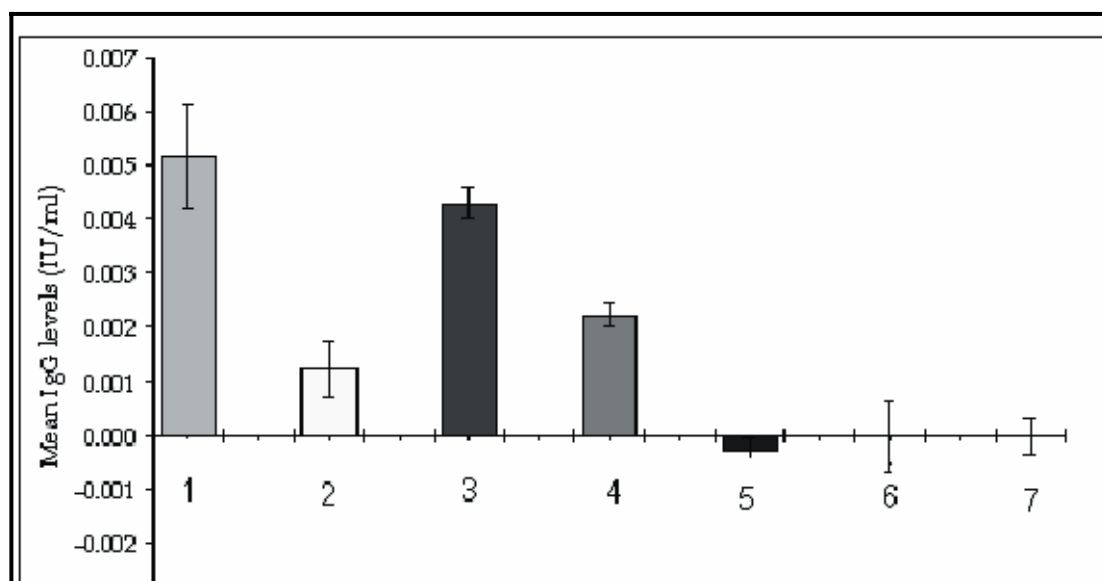
El objetivo de este estudio en vivo era determinar la relación dosis-respuesta tras la vacunación oral con TT. Todos los ratones vacunados con CS-TT mostraron una importante y significativa mejora en la volumetría de IgG frente a TT. Sólo se observaron respuestas inmunes menores en los grupos vacunados con TT en PBS. Se observó que los ratones vacunados con 20 Lf TT capturado en quitosano tenían una respuesta inmune sistémica significativamente inferior a la de los grupos vacunados con 40 ó 60 Lf TT capturado en micropartículas de quitosano. La respuesta obtenida con 60 Lf fue inferior a la obtenida con 40 Lf TT capturado en CS. (Figura 2)

FIGURA 2: Volumetría de IgG en suero el día 22 tras la vacunación oral con 20, 40, 60 Lf TT encapsulado en CS (CS-TT 20 Lf, CS-TT 40 Lf, CS-TT 60 Lf) y 20, 40, 60 Lf TT en PBS (TT-PBS 20 Lf, TT-PBS 40 Lf, TT-PBS 60 Lf).

1- TT 10 Lf (intramuscular); 2- CS-TT 20 Lf; 3- CS-TT 40 Lf; 4- CS-TT 60 Lf; 5- TT-PBS 20 Lf; 6-TT-PBS 40 Lf; 7 - TT-PBS 60 Lf

FIGURE 2: IgG titres in serum on 22nd day after oral vaccination with 20, 40, 60 Lf TT encapsulated in CS (CS-TT 20Lf, CS-TT 40Lf, CS-TT 60Lf) and 20,40,60 Lf TT in PBS (TT-PBS 20Lf, TT-PBS 40Lf, TT-PBS 60Lf).

1- TT 10Lf (i.m.); 2- CS-TT 20Lf; 3- CS-TT 40Lf; 4- CS-TT 60 Lf; 5- TT-PBS 20Lf; 6-TT-PBS 40Lf; 7 - TT-PBS 60 Lf



La respuesta inmune sistémica de los ratones vacunados con 40 Lf TT capturado en micropartículas de quitosano fue menor en comparación a la de los ratones vacunados por vía intramuscular con 10 Lf TT adsorbido en fosfato de aluminio. Esto indica que para obtener una respuesta inmune similar a la del control positivo mediante vacunación oral se requeriría una dosis aproximadamente cuatro veces mayor. Con esta dosis, la respuesta inmune es aproximadamente 144 veces mayor que la volumetría de IgG observada tras la administración oral con TT en PBS.

Los niveles de IgG fueron significativamente menores en el caso de CS-TT 20 Lf ($p < 0,02$) y de CS-TT 60 Lf ($p < 0,05$) cuando se compararon con los niveles de IgG tras la vacunación intramuscular con TT 10 Lf. Pero los niveles de IgG tras CS-TT 40 Lf no fueron significativamente distintos en comparación con los niveles medios de IgG medios tras la vacunación intramuscular con TT 10 Lf. Los niveles medios de IgG tras administrar CS-TT de 20, 40 y 60 Lf fueron significativamente superiores a los de TT-PBS

The systemic immune response of the mice vaccinated with 40 Lf TT entrapped in chitosan microparticles was less as compared to that of mice intramuscularly (i.m.) vaccinated with 10Lf TT adsorbed on aluminium phosphate. This indicates that for oral vaccination, approximately four times higher dose would be required to get similar immune response as that of positive control. At this dose, the immune response is approximately 144 times higher than the IgG titres observed after oral administration with TT in PBS.

The IgG levels were significantly lower in case of CS-TT 20Lf ($p < 0.02$) and CS-TT 60Lf ($p < 0.05$) when compared with IgG levels after i.m. TT 10Lf. But the IgG levels after CS-TT40Lf were not significantly different as compared to mean IgG levels after i.m. TT 10Lf. The mean IgG levels after CS-TT 20, 40 and 60 Lf were significantly higher than TT-PBS 20Lf ($p < 0.05$), TT-PBS 40Lf ($p < 0.002$) and TT-PBS 60 Lf ($p < 0.002$) respectively.

20 Lf ($p < 0,05$), TT-PBS 40 Lf ($p < 0,002$) y TT-PBS 60 Lf ($p < 0,002$) respectivamente.

Evaluación de la respuesta inmune cinética sistémica.

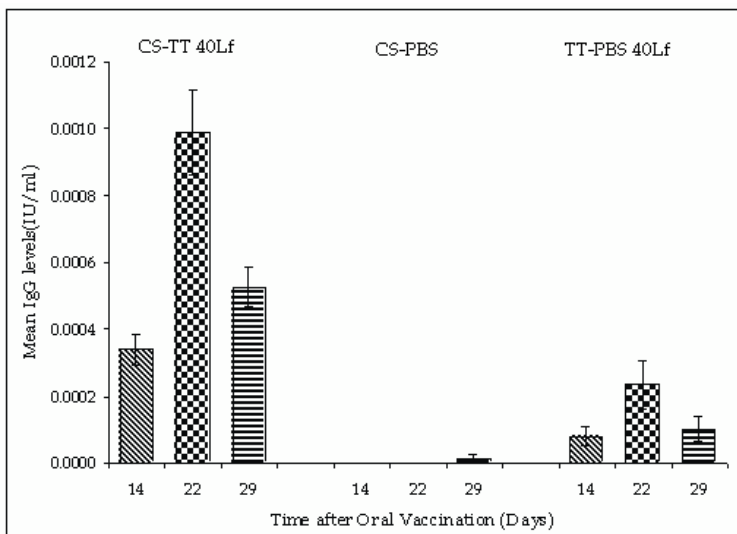
En este estudio se utilizaron 10 animales por grupo para la evaluación de la respuesta inmune sistémica al TT encapsulado en CS. En todos los días en los que se tomaron muestras, como se muestra en la Figura 3, no se pudo detectar volumetría de IgG específica de TT en grupos a los que sólo se administraron por vía oral micropartículas de quitosano no cargadas. Se pudo detectar una respuesta inmune muy baja a los 14 días de la vacunación oral con TT en PBS, que mejoró en cierta medida después de administrar una dosis de refuerzo el día 22, pero el nivel fue muy bajo el día 29. Tras la administración oral de micropartículas de TT cargadas, el día 14 se detectaron volumetrías medibles, que aumentaron considerablemente el día 22 tras la dosis de refuerzo. El día 29 el nivel de IgG era bajo en comparación con el del día 22, aunque todavía muy alto en comparación con el TT en PBS el día 29. La volumetría de IgG específico de TT era considerablemente elevada en CS-TT en comparación con la de TT-PBS en todos los días de muestreo.

Assessment of systemic kinetic immune response

In this study, 10 animals per group were used for the evaluation of the systemic immune response to CS encapsulated TT. On all sampling days, as shown in Figure 3, no measurable TT specific IgG titres could be detected in groups orally fed with non-loaded chitosan microparticles alone. Very minor immune response could be detected after 14 days of oral vaccination with TT in PBS, which was enhanced to some extent after booster dose on 22nd day but the level was very low on 29th day. Following oral administration of TT loaded microparticles, measurable titres were found on 14th day which increased very substantially on 22nd day, after booster dose. On 29th day the IgG level was low as compared to 22nd day but still the level was very high as compared to TT in PBS on 29th day. Highly elevated TT specific IgG titres could be found in CS-TT as compared to TT-PBS on all days of sampling.

FIGURA 3: Volumetría de IgG específica de TT en suero los días 14, 22 y 29 tras la vacunación oral con 40 Lf TT encapsulado en CS (CS-TT 40Lf); micropartículas de CS no cargadas en PBS (CS-PBS) y 40Lf TT en PBS solamente (TT-PBS). Los niveles de IgG se expresan como media \pm S.E.M.

FIGURE 3: TT specific IgG titres in serum on 14th, 22nd and 29th day after oral vaccination with 40 Lf TT encapsulated in CS (CS-TT 40Lf); non-loaded CS microparticles in PBS (CS-PBS) and 40Lf TT in PBS only (TT-PBS). IgG levels are expressed as mean \pm S.E.M.



El nivel medio de IgG específico de TT tras la vacunación oral con CS-TT 40 Lf, los días 14, 22 y 29 fue 10,1, 11,08 y 31,5 veces superior al obtenido tras administrar TT-PBS 40 Lf. Las volumetrías con CS-TT fueron significativamente superiores a las de CS-PBS y TT-PBS ($p < 0,01$) en todos los días de muestreo si se efectúa una comparación estadística mediante la prueba t-Student.

A partir de este experimento en vivo, se llegó a la conclusión de que la respuesta inmune sistémica frente al TT mejoró sustancialmente tras la captura de TT en micropartículas de CS, mientras que el TT en PBS sólo indujo respuestas inmunes menores. También se observó que la respuesta inmune se podía medir el día 14 y que aumentó tras la dosis de refuerzo, lo que indica la formación de células de memoria tras el cebado. La volumetría de IgG era considerablemente elevada en CS-TT en comparación con la de TT-PBS en todos los días en los que se tomaron muestras, lo que indica que la antigenicidad de los antígenos se retenía después de realizar la carga completa y reducir el tamaño de las partículas, y permitía administrar las vacunas oralmente de forma segura y eficaz.

Estudios sobre vacunación oral: Evaluación de la respuesta inmune local en lavado intestinal:

La determinación de IgA se realizó mediante ELISA específico de IgA, y como no se disponía del estándar de IgA específico de TT, se utilizaron valores de absorbencia a 450 nm para mostrar el cambio en los niveles de IgA en diferentes días en los que se tomaron muestras.

La respuesta inmune local a la dosis de TT de 40 Lf en el tracto gastrointestinal se inició transcurridos 8 días y alcanzó un valor máximo en aproximadamente 22 días, como muestra el nivel de IgA en el lavado intestinal (Figura 4). Se produjo un aumento en el nivel de IgA después de la dosis de refuerzo en el CS-TT, pero no se observó esa tendencia en TT-PBS. Los niveles de IgA no fueron significativamente diferentes en la muestra del día 4, pero fueron significativamente superiores en las muestras de los días 8, 14 y 22 para CS-TT ($p < 0,05$), en comparación con el TT en PBS de los días respectivos al realizar la comparación estadística mediante la prueba de t-Student.

The mean TT specific IgG level after oral vaccination with CS-TT 40Lf on 14th, 22nd and 29th day were 10.1, 11.08 and 31.5 times higher than the level obtained after TT-PBS 40Lf. The titres with CS-TT were significantly higher than that of CS-PBS and TT-PBS, ($p < 0.01$) on all sampling days, when compared statistically using Student's 't' test.

From this in vivo experiment, it was concluded that the systemic immune response against TT was strongly enhanced after entrapment of TT in CS microparticles, whereas TT in PBS only induced minor immune responses. It was also observed that immune response was measurable on 14th day and increased after booster dose, indicating the formation of memory cells after priming. Highly elevated IgG titres could be found in CS-TT as compared to TT-PBS on all days of sampling indicating that the antigenicity of the antigens was retained after the entire loading and particle size reduction operation and that it was capable of delivering the vaccines orally in a safe and effective form.

Oral vaccination studies: assessment of local immune response in intestinal lavage:

IgA determination was done by using IgA specific ELISA and as the TT specific IgA standard was not available with us, absorbance values at 450nm were used to show the change in IgA levels on different sampling days.

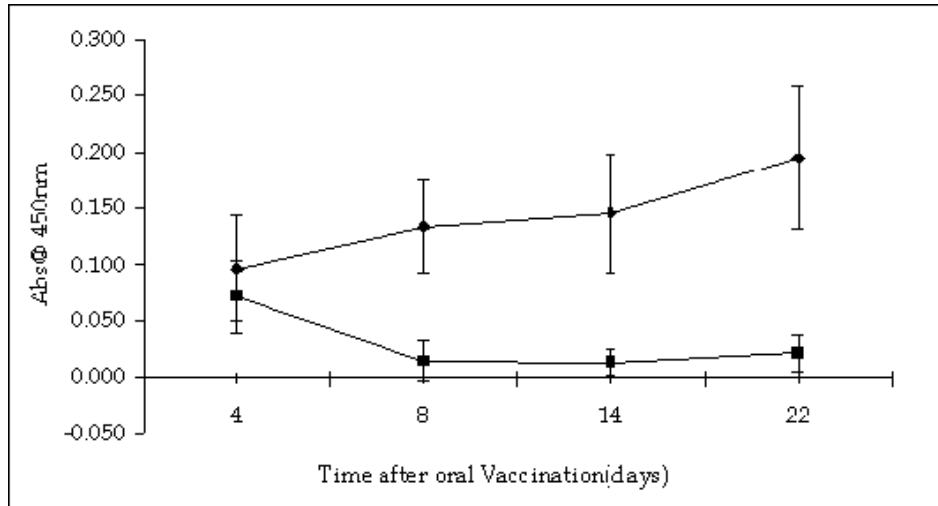
For the TT dose of 40Lf local immune response in the gastrointestinal tract started after 8 days and reached a maximum in about 22 days as shown by the IgA level in intestinal lavage (Figure 4). There was increase in IgA level after booster dose in the CS-TT but such trend was not observed for TT-PBS. The IgA levels were not significantly different on 4th day sample but were significantly higher on 8th, 14th and 22nd day sample in CS-TT ($p < 0.05$) compared to TT in PBS on respective days, when compared statistically using Student's 't' test.

FIGURA 4: Niveles de IgA específico de TT en lavado intestinal los días 4, 8, 14 y 22 tras la vacunación oral con 40 Lf TT encapsulado en CS (CS-TT 40 Lf) y 40 Lf TT en PBS (TT-PBS 40 Lf). Los niveles de IgA se expresan como absorbancia a 450 nm \pm S.E.M.

----◆---- CS-TT 40 Lf ---■--- TT-PBS 40 LF

FIGURE 4: TT specific IgA levels in intestinal lavage on 4th, 8th, 14th and 22nd day after oral vaccination with 40 Lf TT encapsulated in CS (CS-TT40Lf) and 40Lf TT in PBS (TT-PBS 40Lf). IgA levels are expressed as Absorbance at 450 nm \pm S.E.M.

----◆---- CS-TT 40 Lf ---■--- TT-PBS 40LF



Estudios sobre vacunación oral: Evaluación de la respuesta inmune local en materia fecal:

Oral vaccination studies: assessment of local immune response in fecal matter:

La Figura 5 muestra los niveles de IgA en las heces. La respuesta inmune local en el tracto gastrointestinal se inició transcurridos 4 días y alcanzó un valor máximo en aproximadamente 22 días. Se produjo un aumento en el nivel de IgA después de la dosis de refuerzo en el CS-TT, pero no se observó esa tendencia en TT-PBS. Los niveles de IgA no fueron significativamente diferentes el día 4, pero fueron significativamente superiores los días 8, 14 y 22 de la muestra en CS-TT en comparación con los de TT en PBS en los días respectivos.

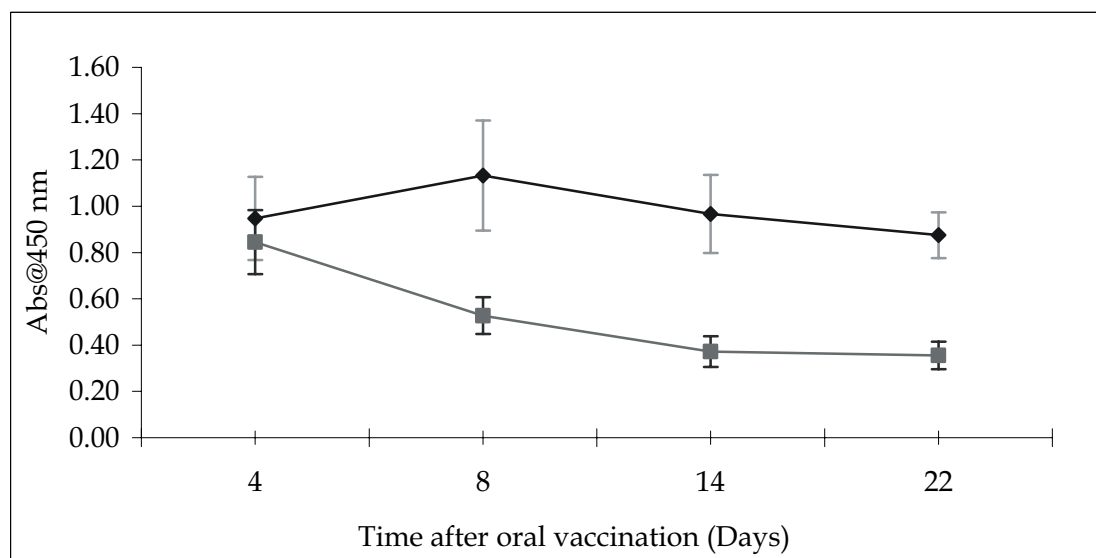
Figure 5 shows IgA levels in the faeces. The local immune response in the gastrointestinal tract started after 4 days and reached a maximum in about 22 days. There was increase in IgA level after booster dose in the CS-TT but such trend was not observed for TT-PBS. IgA levels were not significantly different on 4th day but were significantly higher on 8th, 14th and 22nd day sample in CS-TT as compared to TT in PBS on respective days.

FIGURA 5: Niveles de IgA en materia fecal los días 4, 8, 14 y 22 tras la vacunación oral con 40 Lf TT encapsulado en micropartículas de quitosano (CS-TT 40 Lf) y 40 Lf TT en solución salina de tampón fosfato (TT-PBS 40 Lf). Los niveles de IgA se expresan como Absorbancia a 450 nm \pm S.E.M.

----◆---- CS-TT 40 Lf ---■--- TT-PBS 40 LF

FIGURE 5: IgA levels in fecal matter on 4th, 8th, 14th and 22nd day after oral vaccination with 40 Lf TT encapsulated in chitosan microparticles (CS-TT40Lf) and 40Lf TT in phosphate buffered saline (TT-PBS 40Lf). IgA levels are expressed as Absorbance at 450 nm \pm S.E.M.

----◆---- CS-TT 40 Lf ---■--- TT-PBS 40LF



Se detectaron niveles significativamente superiores de IgA anti TT específico en el tracto gastrointestinal. Por tanto, estos estudios de inmunización oral demuestran claramente que las micropartículas de CS preparadas permiten mejorar las respuestas inmunes local y sistémica. La respuesta inmune sistémica tras la vacunación oral fue comparable a la de la vacuna administrada por vía parenteral. Además del mejor cumplimiento por parte del paciente y la reducción de costes, la inducción de células de memoria local es una característica importante de las micropartículas de CS como portadores de vacunas orales. Con la formación de IgG solamente, como en la inmunización parenteral, es necesario retirar los patógenos después de la infiltración en la circulación sistémica. Pero tras la vacunación oral, debido a la producción de IgA en las zonas mucólicas, los patógenos se pueden neutralizar durante la invasión a través de la mucosa.

CONCLUSIONES

El TT se encapsuló correctamente en polímero de CS biocompatible y biodegradable, reticulado

Significantly higher levels of specific anti-TT IgA in the gastrointestinal tract were detected. Thus, these oral immunization studies clearly demonstrate that the prepared CS microparticles are able to enhance the systemic as well as local immune response. The systemic immune response after oral vaccination was comparable with the parenterally delivered vaccine. Besides increased patient compliance and reduction of costs, the induction of local memory cells is an important feature of CS microparticles as oral vaccine carriers. With formation of only IgG, as in parenteral immunization, pathogens need to be removed after infiltration into the systemic circulation. But after oral vaccination because of the production of IgA at mucosal sites, pathogens can be neutralized during the invasion through the mucosa.

CONCLUSIONS

TT was successfully encapsulated in biocompatible and biodegradable CS polymer, cross-linked using STPP. Formulation was prepared and processed using antigen friendly conditions. Formulation was evaluated in terms of intra-

mediante STPP. La formulación se preparó y se procesó en condiciones favorables para los antígenos. Se evaluó la estabilidad en pH y la captura de la formulación. Demostró la estabilidad en condiciones gástricas e intestinales simuladas. El estudio demuestra la eficacia del sistema de suspensión de micropartículas de CS con una proteína de alto peso molecular (TT) para inducir IgA en el intestino e IgG en la circulación sistémica. La presente investigación auspicia el éxito del uso del sistema de micropartículas en la administración de vacunas de toxoide tetánico por vía oral.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento al Consejo de Investigaciones Científicas e Industriales (Council of Scientific and Industrial Research) de Nueva Delhi, India, por la beca de investigación otorgada a Vijay J. Ahire.

ment, pH stability. It was found be stable at simulated gastric and intestinal conditions. The study shows the efficacy of CS microparticle suspension system, containing a high molecular protein (TT), in inducing the IgA in intestine and IgG in systemic circulation. The present investigation envisages the successful use of microparticulate system in orally administered Tetanus Toxoid vaccine.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors would like to express their gratitude to Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi, India for Senior Research Fellowship to Vijay J. Ahire.

6. BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. O'Hagan DT. Microparticles and polymers for the mucosal delivery of vaccines. *Adv Drug Deliv Rev* 1998; 34: 305-320.
2. Van der Lubben IM, Kersten G, Fretz MM, Beuvery C, Verhoef JC, Junginger HE. Chitosan microparticles for Mucosal vaccination against diphtheria: oral and nasal efficacy studies in mice. *Vaccine* 2003; 21: 1400-1408.
3. Tabata Y, Inoue Y, Ikada Y. Size effect on systemic and mucosal immune responses induced by oral administration of biodegradable microspheres. *Vaccine* 1996; 14(17/18): 1677-1685.
4. Damge C, Aprahamian M, Humbert W, Pinget M. Ileal uptake of polyalkylcyanoacrylate nanocapsules in the rat. *J Pharm Pharmacol* 2000; 52: 1049-1056.
5. Eldridge JH, Hammond CJ, Meulbroek JA, Staas JK, Gilley RM, Tice TR. Controlled release in the gut associated lymphoid tissues. I. Orally administered biodegradable microspheres target the Peyer's patches. *J Contr Rel* 1990; 11: 205-214.
6. Ahire VJ, Sawant KK. Development of Rocket Electrophoresis Technique as an Analytical Tool in Preformulation Study of Tetanus Vaccine Formulation. *Drug Dev Ind Pharm* 2006; 32(7): 799-808.
7. Radi H, Mansoor A. Chitosan based gastrointestinal delivery systems. *J Contr Rel* 2003; 89: 151-165.
8. Singla AK, Chawla Chitosan M: Some pharmaceutical and biological aspects- An update. *J Pharm Pharmacol* 2001; 53:1047-1067.
9. Coppi G, Iannuccelli V, Leo E, Bernabei MT, Camerani R. Protein immobilization in crosslinked alginate microparticles. *J Microencap* 2002; 19(1): 37-44.
10. Wassilak SGF, Roper MH, Murphy TV, Orenstein WA. Tetanus toxoid. In *Vaccines*; Plotkin SA, Mortimer EA, Ed., Saunders: Philadelphia: 4th ed., 2002: 745-781.
11. Esparaza I, Kissel T. Parameters affecting the immunogenicity of microencapsulated tetanus toxoid. *Vaccine* 1992; 10(10): 714-720.
12. Chang AC, Gupta RK. Stabilization of Tetanus Toxoid in Poly(DL-lactic-co-glycolic acid) Microspheres for the Controlled Release of Antigen. *J Pharm Sci* 1996; 85(2):129-132.
13. Grewal HMS, Karlson TH, Vetvik H, Ahren C, Gjessing HK, Sommerfelt H, Haneberg B. Measurement of specific IgA in fecal Extracts and intestinal lavage fluid for monitoring of mucosal immune responses. *J Immun Methods* 2000; 239: 53-62.
14. Forrest BD. Effects of sample processing on the measurement of specific intestinal IgA immune response. *Vaccine* 1992; 10(11): 802-805.
15. Xing DKL, McLellan K, Corbel MJ, Sesardic D. Estimation of Antigenic Tetanus Toxoid Extracted from Biodegradable Microspheres. *Biologicals* 1996; 24: 57-65.

16. Xu Y, Du Y. Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *Int J Pharm* 2003; 250: 215-226.
17. Berger J, Resist M, Mayer JM, Felt O, Peppas NA, Gurny R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *Eur J Pharm Biopharm* 2004; 57: 19-34.
18. Liu WG, Kang DY. Chitosan and Its derivatives – a promising non viral vector for gene transfection. *J Contr Rel* 2002; 83:1-11.
19. Calvo P, Renuman-Lopez C, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J Appl Polym Sci* 1997; 63: 125-132.
20. Elgersma AV, Zsom RLJ, Norde W, Lyklema J. The adsorption of bovine serum albumin on positively and negatively charged polystyrene lattices. *J Colloid Int Sci* 1990; 138: 145-156.
21. Barichello JM, Moriko M, Takayama K, Nagai T. Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. *Drug Dev Ind Pharm* 1999; 25: 471-476.
22. Roberts GAF. *Chitin Chemistry*, MacMillan Press: London, 1992: 203-206.
23. Mi FL, Shyu SS, Wong TB, Jang SF, Lee ST, Lu KT. Chitosan polyelectrolyte complexation for the preparation of gel beads and controlled release of anti-cancer drug. II Effect of pH-dependent ionic crosslinking or interpolymer complex using tripolyphosphate or polyphosphate as reagent. *J Apl Polym Sci* 1999; 74:1093-1107.
24. Brange J, Langkjaer L. Chemical stability of insulin, 3. Influence of excipients, formulation and pH. *Act Pharm Nord* 1992; 4: 149-158.
25. Ma Z, Yeoh HH, Lim LY. Formulation pH modulates the interaction of Insulin with chitosan nanoparticles. *J Pharm Sci* 2002; 91(6): 1396-1404.