

**ПОВЫШЕНИЕ БИОДОСТУПНОСТИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ И
ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОСФЕР ХИТОЗАНА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)**

Устинова Т. М., Венгерович Н. Г., Чалых С. Н., Гусак Т. И.

Федеральное Государственное бюджетное учреждение «Государственный
научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства
обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия, Санкт-Петербург,
Лесопарковая ул., д. 4, тел 8(812) 527-39-57
email:gniiivm_15@mil.ru

Резюме. Технология наноинкапсуляции непрерывно совершенствуется и выходит на передний план в качестве одного из эффективных подходов к доставке терапевтических белков/пептидов и вакцин. К достоинствам данного направления относят контролируемое высвобождение, защиту активных компонентов от ферментативной деградации и локализованное удержание. Также неотъемлемым преимуществом является то, что используемые методы получения легко масштабируются.

В обзоре представлены разработки в области наноинкапсуляции пептидов и вакцин с использованием хитозана за последние 5-7 лет, опубликованные в зарубежной литературе. Нано- и микрочастицы на основе хитозана рассматриваются как носители для доставки пептидов и вакцин путем приема внутрь ввиду следующих особенностей полимера: способность проникать через слизистые оболочки, низкая токсичность, мукоадгезия и регулируемые физические свойства. Представлены результаты исследований по улучшению пероральной биодоступности пептидных препаратов. Показано, что основным недостатком при пероральном введении подобных лекарственных средств следует считать их быстрое разрушение в желудочно-кишечном тракте. Установлено, что к не требующим существенных экономических затрат для приготовления нано- и микросфер на основе хитозана следует отнести методы электрораспыления или эмульсионного способа с использованием различных сшивающих агентов. За счет высокой эффективности инкапсуляции микрочастиц хитозаном, которая составляет от 80 %, полимер можно рассматривать как перспективное средство доставки способное увеличить биодоступность иммунобиологических и биотехнологических лекарственных препаратов. Частицы на основе хитозана позволяли защищать пептиды и вакцины от ферментативной деградации, усиливали проницаемость через слизистый слой. Исследуемые вакцины обеспечивали высокие антиген-специфические ответы и контролируемое высвобождение.

Ключевые слова: хитозан, вакцины, пероральное введение, доставка микрочастиц, наночастица, пептид, иммунобиологический препарат, биотехнологический препарат

**INCREASING THE BIOAVAILABILITY OF BIOTECHNOLOGY-DERIVED
PHARMACEUTICALS AND IMMUNOBIOLOGICALS USING CHITOSAN
MICROSPHERES (LITERATURE REVIEW)**

Ustinova T.M., Vengerovich N.G., Chalykh S.N., Gusak T.I.

State scientific-research test Institute of military medicine of Defense Ministry of the
Russian Federation

Abstract. Nanoencapsulation technology adoption moves to the forefront as one of the approaches to the therapeutic proteins/peptides' and vaccines' delivery. The advantages of this direction include controlled release, active pharmaceutical ingredients' protection from enzymatic degradation and their localized retention. In addition, an inherent advantage is that the derivatization techniques in operation are easily scalable.

The review presents developments in the field of peptides' and vaccines' nanoencapsulation over the past 5-7 years in the world literature. Chitosan-based nano- and microparticles are considered as carriers for the peptide and vaccine delivery by oral administration, due to the following polymer's distinctions: the ability to penetrate the mucous membranes, low toxicity, mucoadhesion, and tunable physical properties. Over the period, many studies have been conducted on improving the oral bioavailability of peptide drugs. The main disadvantage of oral administration of such drugs is supposed to be their rapid destruction in the gastrointestinal tract. One of the most common and avoiding significant economic costs for the chitosan nano- and microsphere preparation are electrospray or emulsion methods using various crosslinking agents. Due to the high efficiency of encapsulation in chitosan microparticles, being as from 80%, the polymer can be considered as a promising delivery agent capable of increasing the bioavailability of immunobiologicals and biotechnology-derived pharmaceuticals. The resulting particles allowed the peptides' and vaccines' protection from enzymatic degradation, and increased the mucous layer permeability. The studied vaccines provided high antigen-specific responses, and controlled release.

Keywords: chitosan, vaccines, oral administration, delivery microparticle, peptide, nanoparticles, Immunobiological drug, biotech drug

Введение.

С конца 1990-х годов в литературных источниках появляются описания хитозановых микросфер и наночастиц, которые подходят для доставки лекарственных препаратов. Природный полимер обладает химической универсальностью из-за способности образовывать поликатионные заряженные молекулы при физиологических значениях pH благодаря протонированию D-глюкозамина в полимерной структуре и изменяемой полимерной массе. По своей химической природе хитозан является продуктом хитина, а его химические и биологические свойства зависят от степени деацетилирования и ацетилирования наряду с другими факторами, такими как молекулярная масса и модификация поверхности нано- и микросфер [1, 2].

К основным свойствам хитозана относят его способность действовать как усилитель проницаемости. Полимер открывает плотные соединения эпителия, способствует переносу лекарственных препаратов как по парацеллюлярному, так и по трансцеллюлярному пути; взаимодействует со слизистым слоем с образованием комплекса посредством ионных и водородных связей [3]. Отмечают, что у получаемых частиц существует несколько механизмов, определяющих профиль высвобождения лекарственного препарата, таких как: набухание полимера, диффузия адсорбированного активного начала через полимерную матрицу с эрозией или деградацией частицы полимера [4, 5, 6, 7].

В настоящее время стремительно развиваются технологии рекомбинантного синтеза белков и пептидов в результате чего появляются новые фармацевтические препараты, которые используют и внедряют в различные схемы лечения. Пероральная доставка лекарственных препаратов представляет золотой стандарт и благодаря возможности самостоятельного введения, улучшенному соблюдению пациентом режима лечения и простоте распределения [8]. Несмотря на обширные исследования, встречающиеся в отечественной и зарубежной литературе, разработка технологий для пероральной доставки терапевтических пептидов или белков по-прежнему остается проблемой для фармацевтической промышленности [9]. Существует ряд ключевых факторов, влияющих на биодоступность пептидов при пероральном приеме: высокая протеолитическая активность и низкий pH желудочно-кишечного тракта. Из-за короткого периода полувыведения из кровотока, характерного для пептидов, их необходимо вводить часто, что приводит к росту стоимости лечения. Для увеличения биодоступности пептидов разрабатываются системы доставки, которые способны не только защитить белок/пептид от ферментативной деградации, но также помогают улучшить его абсорбцию, не изменяя биологическую активность. Нано- или микрочастицы на основе хитозана являются перспективными носителями для подобных соединений. Такая система способна повысить

стабильность пептидов *in vivo*, что приводит к увеличению циркуляции и времени полураспада в организме. На сегодняшний день на рынке существует лишь несколько пероральных пептидно-белковых составов (Genereх Oral-Lyn – 3 фаза клинических исследований; RaniPill – 1 фаза клинических исследований), но также продолжаются исследования в этой области по разработке целого ряда методов, которые могли бы привести к увеличению их биодоступности [10].

Другое развивающееся направление в фарминдустрии – разработка пероральных вакцин. Иммунизация представляет собой экономически эффективную стратегию, которая защищает не только вакцинированных лиц, но и может косвенно защитить окружающее сообщество за счет выработки коллективного иммунитета [11].

Большинство зарегистрированных вакцин вводятся либо подкожно, либо внутримышечно. Результирующий иммунный ответ обычно ограничивается системным гуморальным иммунитетом (например, выработкой антител) против патогена или токсина с ограниченным клеточным иммунитетом (например, опосредованным Т-клетками) и слабой защитой, генерируемой на поверхности слизистых оболочек [12]. Преимуществами пероральных вакцин по сравнению с инъекционными заключается в простоте обращения, сравнительно низкой стоимости производства и индукции мукозального иммунитета [13]. Кроме того, пероральный путь введения позволяет стимулировать гуморальные и клеточные иммунные реакции как в системных, так и в слизистых оболочках для обеспечения более широкой и длительной защиты [14].

Для эффективной доставки стабильных антигенов необходимо: разработать носители, которые защищают полезную нагрузку в целевых условиях среды [15], высвобождают вакцину в тонкой кишке к антигенпрезентирующим клеткам через эпителиальные слои и усиливают иммунный ответ с помощью адъювантных возможностей средств доставки [16]. Однако получаемые частицы хитозана ограничены своей высокой растворимостью в кислых условиях, что может разрушать целостность загруженной в частицы вакцины. Возможны следующие пути преодоления разрушения хитозана в кислой среде, такие как инкапсуляция частиц хитозана, нагруженных антигеном, в липосомы для защиты при прохождении через желудок [17], стабилизацию путем поперечного сшивания триполифосфатом и глутаровым альдегидом и электростатическое покрытие анионным полисахаридным альгинатом [18].

Цель исследования. Провести анализ применения микрочастиц хитозана в качестве компонентов пероральных систем доставки пептидов и вакцин.

Материалы и методы. В исследовании выполнен обзор публикаций, посвященных основным тенденциям и изложенных в литературных источниках по проблеме доставки

терапевтических пептидов и вакцин при пероральном введении с использованием природного биоразлагаемого полимера хитозана за последние 5-7 лет.

Результаты и их обсуждение.

Адресная доставка терапевтических пептидов.

Биодоступность макромолекул при пероральном введении крайне ограничена вследствие их низкой устойчивости в желудочно-кишечном тракте и слабой способности к прохождению через биологические мембраны и тканевые структуры кишечника. Известно, что большинство белков стабильны при нейтральном pH и склонны к денатурации при ее резких изменениях. Каждый сегмент желудочно-кишечного тракта отличается по величине pH. Так, под действием соляной кислоты, в желудке происходит гидролиз, что приводит к восстановлению дисульфидных связей пептида. Поджелудочная железа выделяет протеазы, которые секретируются в просвет двенадцатиперстной кишки. Протеаза катализирует протеолиз и расщепляет пептидные связи посредством гидролиза, а присутствие химотрипсина и пептидазы в тощей кишке препятствуют абсорбции пептидов эпителиальной тканью. Эта физиологическая функция снижает возможность достижения целевых концентраций пептидов в системном кровотоке [19]. Одним из направлений повышения эффективности доставки пептидов является изменение состава молекулы для обеспечения максимальной растворимости, предотвращения ферментативной деградации и повышения абсорбции через эпителиальные клетки кишечника.

Хитозан и его производные используются в качестве ингибитора ферментов, усилителя проницаемости и мукоадгезивного агента. Обладая определенным механизмом действия и способностью к модификации поверхности этот полимер способен инкапсулировать пептидные препараты в систему наночастиц, которые в свою очередь защищают их от агрессивной среды желудочно-кишечного тракта. В основном микрочастицы хитозан/пептид получают эмульсионным методом с использованием различных сшивающих агентов (триполифосфат, глутаровый альдегид, лимонная кислота) (таблица) и электрораспылением. Получение нано- и микросфер хитозана эмульсией вода/масло является простым и легко воспроизводимым методом. Такой способ получения позволяет формировать различный размер частиц с монодисперсным распределением, которые способны диспергироваться в водной среде. Частицы полученные эмульсионным способом являются плотными ковалентно или ионно сшитыми контейнерами пригодными для пептидных молекул. Такие частицы обладают избыточным набуханием в водной среде и способны сохранять целостность во всех диапазонах pH за счет их химической сшивки. Таблица – Характеристики нано- и микрочастиц хитозана с пептидными и белковыми активными действующими веществами, полученные с использованием метода эмульгирования

Действующее вещество	Метод получения	Полимерная композиция	Основные характеристики			Источник
			Размер частиц	Эффективность загрузки, %	Полученные свойства	
1	2	3	4	5	6	7
Инсулин	Двойная эмульсия	Полилакгид-со-гликолидные наночастицы покрытые гликольхитозаном, модифицированные 5-β-холановой кислотой	302,73±5,13 нм	51,99±5,27	Биодоступность, 30,43 %	[20]
Инсулин	Двойная эмульсия	Хитозан покрытый альгинатом	200-300 нм	55,2±7,0	Продление высвобождения инсулина после перорального приема	[21]
Пептид СРР	Эмульсия вода/масло	Хитозан сшитый с полиэтиленгликолем	<15 нм	нет данных	Частиц обладали избыточным набуханием в воде, с сохранением целостности во всех диапазонах рН, способствовали открытию плотных каналов	[22]
Ядро-белок наджанаджатра (αСТ) и ресвератрол (Res)	Усовершенствованный метод испарения растворителя двойной эмульсии	Двойная система доставки лекарственных препаратов Низкомолекулярный хитозан/альгинат/Полилакгид-со-гликолид	230 нм	нет данных	Способствует прохождению через эпителиальные клетки кишечника, эффективность клеточного поглощения через 4 часа – 10-15 %	[23]
Бычий сывороточный альбумин	Сшивающая эмульсия вода/масло	Хитозан сшивающий агент – лимонная кислота, ПАВ - полиглицеринполириценол	44-12 мкм	6,8-27,6	Сферическая форма, гладкая поверхность микрочастиц, исследовано влияние ПАВ в механизме высвобождения белка	[24]

продолжение таблицы

1	2	3	4	5	6	7
Антимикробный декапептид KSL-W	Электро-распыление и комбинированные методы сшивания-эмульсии	Полилакгид-со-гликолид /хитозан	60-80 мкм	3-7%	Профиль с замедленным и контролируемым высвобождением	[25]
Тимопентин (TP5)	Эмульсионная полимеризация	Частицы хитозана, покрытые поли (н – бутил-цианоакрилатом)	200-300 нм	нет данных	Повышение стабильности лекарственного препарата, улучшение биоадгезивных свойств	[26]

В ряде статей приводятся данные о микропорошках пептидных субстанций инкапсулированных хитозаном, полученных методом электрораспыления. У таких частиц отмечали высокую эффективность инкапсуляции 90–100 %, а также стабильность до шести месяцев. В опытах *in vitro* с помощью диффузионной ячейки показано, что микрочастицы усиливали проникновение пептида спироулины через кишечный барьер [27]. В другом исследовании частицы хитозана, содержащие овальбумин и адъювант, полученные схожим методом электрораспыления, имели положительный дзета потенциал и высвобождение овальбумина составило около 80 часов. Полученные образцы не проявляли высоких мукоадгезивных свойств и цитотоксичности [28].

К другому подходу по доставке терапевтических белковых наночастиц относят инкапсулирование в гастрозащитные микрочастицы. Такой подход исследовали Ling K. и соавт., в ходе которого белковые наночастицы инкапсулировали в сшитые комплексы альгинат/хитозан. Пероральное введение мышам таких частиц позволяло доставлять белок в эпителий кишечника и снижало клинические и гистологические показатели воспаления при моделировании колита, индуцированного декстрансульфатом натрия [29].

Хитозан и его модификации используют не только как мукоадгезивный агент, но и как ингибитор ферментов, а также в качестве усилителя проницаемости. При защите от ингибиторов ферментов хитозан используют как усилитель антипротеазной активности с целью минимизации разложения пептидных препаратов. Известно исследование, в котором конъюгат сериновой протеазы антипатаин, хемостатин и эластатинал ковалентно связывали с хитозаном. Такой полимер-конъюгат обладал хорошим набуханием с силой адгезии на 42 % ниже, чем до модификации, и показывал сильную ингибирующую активность по отношению ко всем тестируемым сериновым протеазам, исследованным в работе [30].

Благодаря дополнительной высокой аффинности связывания с ионами двухвалентных металлов он также позволял ингибировать Zn^{2+} зависимые экзопептидазы, карбоксипептидазы А, В, и аминопептидазы N. Конъюгат гликоль-хитозан и эбестатин защищал олигопептиды тимопоэтина (тимокартин, тимопентин и тимотринан) от ферментативной деградации, опосредованной аминопептидазой. Было показано, что формирование конъюгата со степенью замещения 7 % (моль бестатина на моль гликоля), значительно защищало все три пептида от разложения, опосредованного аминопептидазой. Отмечали, что уровень чувствительности этих трех пептидов к аминопептидазе зависел от энергии связывания с ферментом, в котором участвуют силы Ван-дер-Ваальса, что подтверждали и результатами моделирования молекулярной динамики [31].

Адресная доставка терапевтических вакцин.

Направленная доставка вакцин представляется довольно сложной задачей поскольку вакцинация необходима для обеспечения эффективного иммунного ответа слизистых оболочек организма от патогенов и токсинов. Вакцины при пероральной доставке должны преодолевать биологический барьер кишечных эпителиальных клеток. Гидрофильный антиген не способен пересекать фосфолипидный бислой и попадать в системный кровоток. Таким образом, захват антигена тканью слизистой оболочки ограничивается коротким временем воздействия. Поглощение антигена иммунными клетками зависит от размера частиц антигена. Патогены меньшего размера легко поглощаются дендритными клетками. Инкапсуляция патогенов в наночастицы – один из подходов для повышения эффективности вакцин в стимуляции иммунной системы [32]. Для проникновения через слой слизи необходим минимальный размер частиц. Частицы, размер которых больше размера слоя слизи (100-500 нм), характеризуются нарушением биодоступности антигена для антиген-презентирующей клетки.

В исследованиях показано, что пероральное введение вакцины против тифа домашней птицы, покрытой микрочастицами альгинат/хитозан, по сравнению с ее подкожным введением, обеспечивает защитную эффективность, предотвращая разрушение в желудочно-кишечном тракте. При этом авторы отмечали, что существенной разницы в иммунных ответах между пероральной вакциной и подкожным путем введения не было [33]. В ряде работ оценивали вакцины приготовленные на основе наночастиц хитозана с сальмонеллезной субъединицей. В ходе исследований было показано, что нацеливание таких наночастиц, покрытых поверхностным F-белком, на иммунные клетки локализовалось в пейеровых участках подвздошной кишки. У цыплят-несушек с пероральным вакцинированием отмечали значительно более высокую продукцию IgA слизистой оболочки, специфичную для белков внешней мембраны и реакцию

пролиферации лимфоцитов. Такая вакцина способствовала нацеливанию на иммунные клетки цыплят и индуцированию антиген-специфических В- и Т- клеточных ответов [34]. Схожие данные были получены в исследовании, в котором оценивали иммунный ответ у бройлеров, вакцинированных наночастицами хитозана с сальмонеллой. Исследуемая вакцина вызывала значительно более высокий антиген-специфический ответ IgA в биологических образцах. На фоне введения вакцины на основе наночастиц хитозана курам существенно увеличивалось количество антиген-специфичных IgG и IgA к сальмонеллам, инфицированных *S. Enteritidis* или *S. Heidelberg*, значительно снижалась колонизация слепой кишки, обеспечивая перекрестную защиту против обоих патогенов [35].

Актуальной является и пероральная доставка ДНК вакцин, но она осложняется деградацией вектора доставки ДНК. Для реализации такого подхода в одном из исследований проводили разработку и оптимизацию гибридно-двойной системы доставки частиц, состоящих из растительного белка зеина и хитозана. Частицы получали ионным гелеобразованием методом двойной эмульсии с использованием сшивающего агента триполифосфата. При сравнении профиля высвобождения выявлено, что полученные частицы обладали контролируемым высвобождением по сравнению с неинкапсулированной ДНК-вакциной. Отмечали сайт-специфическую деградацию внешней матрицы и высвобождение компетентных для трансфекции наночастиц хитозана/ДНК. Полученные частицы при пероральном введении через желудочный зонд *in vivo* индуцировали продукцию анти-GFP IgA-антител, демонстрируя трансфекцию и экспрессию [36]. В другом исследовании было показано, что для доставки вакцины против вируса, вызывающего некроз поджелудочной железы у рыб разных видов, использование наночастиц хитозана, сшитых триполифосфатом и покрытых альгинатом, обеспечивало высокую защиту после вакцинации. Такие частицы вызывали появление антител у выживших рыб на 45-й день после заражения [37].

Заключение.

Лекарственные составы на основе хитозана являются как носителями, так и усилителями пероральной доставки пептидов и вакцин. Инкапсулирование пептидов в систему наноносителя позволяет избежать фермоллиза и агрегации пептидов, приводит к увеличению абсорбции пептидных лекарственных средств в кишечном эпителии. Таким образом, хитозан в качестве носителя для пептидов и вакцин обладает оптимальными физико-химическими и биологическими свойствами. Многие исследования показали, что он может эффективно активировать антигепрезентирующие клетки и индуцировать цитокиновую стимуляцию, позволяющую вызывать эффективный иммунный ответ.

Хитозан является полимером, способным взаимодействовать с другими природными и синтетическими полианионными полимерными соединениями с и без сшивающего агента, позволяет переносить лекарственное средство через различные эпителиальные системы и высвобождать в устойчивом и контролируемом состоянии в целевой участок или орган-мишень. Основными направлениями при использовании хитозана в качестве полимера-носителя при пероральной доставке следует считать контролируемое пролонгированное высвобождение, увеличение пероральной биодоступности, защиту от ферментативной деградации. Несмотря на прогресс и развитие рекомбинантных технологий и вакцин в публикациях продолжается разработка систем для перорального введения, способствующая увеличению биодоступности, проницаемости через мембраны, защиты от ферментативного разложения пептидов и вакцин.

Литература.

1. Mohammed MA, Syeba JTM, Vasan EK. An Overview of Chitosan Nanoparticles and its application in non-Parental Drug delivery. *Pharmaceutical*. 2017; Nov 20; 9(4): 53. doi: 10.3390/pharmaceutics9440053;
2. Aibani N, Rai R, Patel P, Guddihi G, Wasan EK. Chitosan Nanoparticles at the biological interface: implications for drug delivery. *Pharmaceutics* 2021; 13: 1686. doi.org/10.3390/pharmaceutics 13101686;
3. Jhaveri J; Raichura Z, Khan T. Chitosan nanoparticles-insight into properties, functionalization and applications in drug delivery and theranostics. *Molecules*. 2021; 26: 272;
4. Yedi Herdiana, Nesrul Wathoni, Shaharum Shamsuddin, Muchtaridi Muchtaridi. Drug release study of the chitosan-based nanoparticles. *Helion*. 2022; 8 (1): e08674. doi.org/10.1016/j.helion.2021.e08674;
5. Lui S, Yang S, Ho P.C. Intranasal administration of carbamazepine-loaded carboxymethyl chitosan nanoparticles for drug delivery to the brain. *Asian J. Pharm. Sci*. 2018; 13(1): 72-81. doi: 10.1016/j.aips.2017.09.001;
6. Singh R, Lillard J.W Jr. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp. Mol. Pathol*. 2009; 86: 215-223;
7. Lucio D, Martinez-Oharriz M.C. Chitosan: strategies to increase and modulate drug release rate. In: *Biological activities and application of marine polysaccharides*. Intechopen; 2017. doi. Org/10.05772/65714;
8. Mohammed Shuaib Khan, Pranav J Shan, Priya B. Dubey, Jaimini K. Gandhi. Chapter: Intraoral and peroral drug delivery systems. In: *In-vitro and in-vivo tools in drug delivery research for optimum clinical outcomes edition 1st*. CRC press; 2018. 26 p;

9. Sonal Gupta, Arushi Jain, Mainak Chakraborty and et.al. Oral delivery of therapeutic proteins and peptides: a review on recent developments. *Drug Deliv.* 2013; 20 (6): 237–246. doi: 10.3109/10717544.2013.819611;
10. Alessandra T. Zizzari, Dimanthi Pliatsika, Flavio M. Gall. New perspective in oral peptide delivery. *Drug Discovery Today.* 2021; vol. 26, issue 4: 1097-1105. doi: org/10/1016/j.drudis. 2021.01.020;
11. Vela Ramirez JE, Sharpe LA, Peppas NA. Current state and challenges in developing oral vaccines. *Adv Drug Deliv Rev.* 2018; May 15; 114: 116-131;
12. Lycke N, Bemark M. Mucosal adjuvants and long-term memory development with special focus on CTA1-DD and other ADP-ribosylating toxins. *Mucosal Immunol.* 2010; 3: 556-566;
13. Renukuntla J.et al Approaches for enhancing oral bioavailability of peptides and proteins *Int J Pharm.* 2013; Apr 15; 447 (1-2): 75-93. doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.02.030;
14. Wang J, Thorson L, Stokes RW, and et.al. Single mucosal, but not parenteral, immunization with recombinant adenoviral-based vaccine provides potent protection from pulmonary tuberculosis. *J. Immunol.* 2004. 173 (10): 6357–6365. doi: 10.4049/j.immunol. 173/10/6357;
15. MeHung KJ, Guarecuco R, Langer R, Jaklenec A. Single-injection vaccines: progress, challenges, and oppurtunities. *J. Control. Release.* 2015; Dec10, 2019: 596-609. doi: 10.1016/j.jconrel. 2015.07.029;
16. Correia-Pinto JF, Csaba N, Alonso MJ. Vaccine delivery carries: insights and future perspectives. *INT.J.Pharm.* 2013; 440: 27-38. doi:10.1016/j.ijpharm.2012.04.047;
17. Jain S, Sharma RK, Vyas SP. Chitosan nanoparticles encapsulated vesicular systems for oral immunization: preparation, in-vitro and in-vivo characterization. *J. Pharm. Pharmacol.* 2006; 58: 303-310. doi:10.1211/jpp.58.3.0003;
18. Biswas S, Chattopadhyay M, Sen KK, Saha MK. Development and Characterisation of alginate coated low molecular weight chitosan nanoparticles as new carries for oral vaccine delivery in mice. *CarboHydr. Polym.* 2015;121:403-410. doi:10.1016/j.carbpol.2014.12.044;
19. Berrada M., Chitin and Chitosan – Phisicochemical properties and industrial application/ Intechopen. 2021. doi.org/10/5772/intechopen.91553;
20. Wang W, Yu C, Zhang B and et. al. improved oral delivery of insulin by PLGA nanoparticles coated with 5 β -cholanic conjugating glycol chitosan // *Biomed Mater.* 2021. 16 (6). doi:10/1088/1748-605X/ca2a8c;

21. Chen N, Li S, Zhy W and et. al. Self-assembly pH-sensitive chitosan/alginate coated polyelectrolite complexes for oral delivery of insulin// J. Microincapsul. 2019. 36(1). 96-107. doi:10.1080/02652048.2019.1604846;
22. Barbari GR, Dorkoosh FA, amini M and et. al. A novel nanoemulsion-based method to produce ultrasmall, water-dispersible nanoparticles from chitosan, surface modified with cell-penetrating peptide for oral delivery of proteins and peptides. // Int. J. Nanomedicine. 2017. 12. 3471-3483. doi:10.214/IJN.S116063;
23. Liu L, Yao W, Xie X, Gao J and et.al. pH-sensitive dual drug loaded Janus nanoparticles by oral delivery for multimodal analgesia/ J. Nanobiotechnology. 2021. 19(1). 235. doi:10.1186/s12951-021-00974-6;
24. Sedykina N, Kuskov A, Velonia K and et al. Modulation of Entrapment efficiency and in vitro release properties of BSA-loaded chitosan microparticles cross-linked with Citric acid as a potential protein-drug delivery system. // Materials (basel). 2020. 13(8). 1989. doi:10.3390/ma13081989;
25. Li Y, Wang X, Liu H and et.al. Fabrication of antimicrobial peptide-loaded PLGA/chitosan composite microspheres for long-acting bacterial resistance / Molecules. 2017. 22(10).1637. doi: 10.3390/molecules22101637;
26. Xu Y, Lu s, Liu Q and etal Preparation, intestinal segment stability, and mucoadhesion properties of novel thymopentin-loaded chitosan derivatives coated with poly(n-butyl)cyanoacrylate nanoparticles./ Int. J. nanomedicine. 2019. 14. 1659-1668. doi:10.2147/IJN.S194529;
27. Aquino RP, Auriemma G, Conte GM, and et al. Development of Chitosan/Mannitol Microparticles as Delivery System for the Oral Administration of a Spirulina Bioactive Peptide Extract. Molecules. 2020; Apr 29, 25(9): 2086. doi:10.3390/molecules25092086;
28. Moreno JAS, Panou DA, Stephansen K, and et al. Preparation and Characterization of an Oral Vaccine Formulation Using Electrosprayed Chitosan Microparticles. AAPS PharmSciTech. 2018; 19(8): 3770-3777. doi: 10.1208/s12249-018-1190-1;
29. Ling K, Wu H, Neish AS, Champion JA. Alginate/chitosan microparticles for gastric passage and intestinal release of therapeutic protein nanoparticles. J Control Release. 2019; Feb 10; 295: 174-186. doi:10.1016/j.jconrel.2018.123.017;
30. Bernkop-Schurch A. Scerbe-Saico. Synthesis and in vitro evaluation of chitosan-EDTA-protease-inhibitor conjugates with might be useful in oral delivery of peptides and proteins. Pharm. Res. 1998; 15(2): 263-269. doi:10.1023/a:1011970703087;

31. Hassan A, Ikram A, Raza A and et al. Therapeutical potential of novel mastoparan-chitosan nanoconstructs against clinical MDR *Acinetobacter baumannii*: in silico, in vitro and in vivo studies. *Int J Nanomedicine*. 2021; 16: 3755-3773. doi:10.2147/j.JN.5296717;
32. Zainuddin S.Z., Hamid K.A. Chitosan-Based oral drug delivery system for peptide, protein and vaccine delivery. [www.Intechopen.com](http://www.intechopen.com). chapter 74871. doi:10.5772/intechopen.95771;
33. Onuigbo E, Iseghohimhen J, Chah K, Gyang M, Attama A. Chitosan/alginate microparticles for the oral delivery of fowl typhoid vaccine: Innate and acquired immunity. *Vaccine*. 2018; Aug 9;36(33): 4973-4978. doi:10.1016/j.vaccine.2018.05.087;
34. Renu S., Markazi A.D., Dhakal S. and et.al. Oral deliveradle mucoadgesive chitosan-salmonella subunit nanovaccine for layer chicken. *Int J Nanomedicine*. 2020; 15: 761-777 doi: 10.2147/IJN.S238445;
35. Acevedo-Vilanova, K.Y., Lester B., Renu S. and et. al. Efficacy of chitosan-based nanoparticle vaccine administered to broiler birds challenged with *Salmonella*. *PloS One*. 2020; 15(2): 1-17. doi:10.1371/journal.pone.0231998;
36. Farris E, Brown DM, Ramer-Tait AE, Pannier AK. Chitosan-zein nano-in-microparticles capable of mediating in vivo transgene expression following oral delivery. *J Control Release*. 2017 Mar 10; 249: 150-161. doi:10.1016/j.jconrel.2017.01.035;
37. Ahmadvand S., Soltani M., Behdani M. and et al. Oral DNA vaccines based on CS-TPP nanoparticles and alginate microparticles confer high protection against infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) infection in trout. *Dev Comp Immunol*. 2017; 74:178-189. doi:10.1016/j.dci.2017.05.004.