



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 30 227 T2 2004.04.01**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 804 283 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 30 227.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US95/04711**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 917 018.4**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 95/028227**

(86) PCT-Anmeldetag: **17.04.1995**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **26.10.1995**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **05.11.1997**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **02.04.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **01.04.2004**

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: **B01J 13/02**

**A61K 39/00, A61K 9/14, A61K 9/50,  
B28B 1/54, B01J 13/06, A61K 39/12**

(30) Unionspriorität:

<b>228481</b>	<b>15.04.1994</b>	<b>US</b>
<b>229283</b>	<b>18.04.1994</b>	<b>US</b>
<b>229520</b>	<b>18.04.1994</b>	<b>US</b>

(73) Patentinhaber:

**Temple University, Philadelphia, Pa., US; The  
Children's Hospital of Philadelphia, Philadelphia,  
Pa., US**

(74) Vertreter:

**Dr. Weber, Dipl.-Phys. Seiffert, Dr. Lieke, 65183  
Wiesbaden**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU,  
MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**CLARK, H., Fred, Philadelphia, US; OFFIT, A., Paul,  
Philadelphia, US; SPEAKER, J., Tully,  
Philadelphia, US**

(54) Bezeichnung: **METHODE ZUM EINKAPSELN MITTELS EINES WÄSSRIGEN LÖSUNGSMITTELS UND MIKRO-KAPSELN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

[0001] Diese Erfindung wurde mit Unterstützung der US-Regierung unter A-100889 und A-126251, welche vom National Institute of Health zuerkannt wurden, gemacht. Die US-Regierung besitzt bestimmte Rechte an der Erfindung.

**QUERVERWEIS AUF VERWANDTE ANMELDUNGEN**

[0002] Diese Anmeldung ist eine Continuation-in-Part der folgenden parallel anhängigen Patentanmeldungen: US-Patentanmeldung Seriennr. 08/228,481, eingereicht am 15. April 1994, US-Patentanmeldung Seriennr. 08/229,283, eingereicht am 18. April 1994, und US-Patentanmeldung Seriennr. 08/229,520, eingereicht am 18. April 1994.

**GEBIET DER ERFINDUNG**

[0003] Die vorliegende Erfindung betrifft neue Mikrokapseln mit einer anisotropen Salzmembran, die einen wäßrigen oder im wesentlichen wäßrigen Kern einkapselt, welcher verschiedene aktive Mittel enthalten kann. Die Mikrokapseln werden durch die Grenzflächenreaktion in wäßrigem Medium von Lewis-Säure und -Base wandbildender Reaktanten hergestellt.

**HINTERGRUND DER ERFINDUNG**

[0004] Mikroverkapselung ist ein Verfahren, durch welches ein relativ dünner Überzug auf Dispersionen von kleinen Partikeln oder Feststoffen oder Tröpfchen von Flüssigkeiten aufgebracht werden kann, so daß ein Mittel zur Umwandlung von Flüssigkeiten in Feststoffe bereitgestellt wird, wodurch kolloidale und Oberflächeneigenschaften verändert werden, Schutz vor der Umgebung bereitgestellt wird und die Freisetzungseigenschaften oder die Verfügbarkeit von überzogenen Materialien gesteuert werden. Mehrere dieser Eigenschaften können durch Makroverpackungstechniken erreicht werden; jedoch ist die Einzigartigkeit von Mikroverkapselung die geringe Größe der überzogenen Partikel und deren anschließende Verwendung und Anpassung an eine breite Vielfalt von Dosierungsformen und Produktanwendungen. Früher umfaßten bekannte brauchbare Methoden zur Herstellung von Mikrokapseln in einem industriellen Maßstab häufig die Verwendung organischer Lösungsmittel. Jedoch kann die Verwendung organischer Lösungsmittel Umwelt- und Sicherheitsprobleme darstellen. Darüber hinaus ist es häufig schwierig, das gesamte organische Lösungsmittel aus den Mikrokapseln zu entfernen, wodurch organische Kontaminationen zurückbleiben.

[0005] Es wurde vorgeschlagen, Mikrokapseln als Mittel zur Verabreichung von Impfstoff zu verwenden. Zwei breite Typen von Antigenauslieferungssystemen wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit, die Immunität zu erhöhen, untersucht: feste (oder poröse) Mikrokapseln und Mikrokapseln mit einem Kernbereich, der von einer physikalisch ausgeprägten Wand umgeben ist. Feste Mikrokapseln können nach einer Vielzahl von Verfahren hergestellt werden, einschließlich Koazervation von Kolloiden (Kwok, K. K., et al., 1991, Pharm. Res., 8: 341–344), Präzipitation von Proteinen durch physikalische Mittel (z. B. Phasentrennung) oder chemische Mittel (z. B. Säurechloride) (Levy, M. C. et al., 1991, J. Pharm. Sci., 80: 578–585) oder Lösungsmittelverdampfungstechniken, die wäßrige Dispersionen mit Polyesterfilmen umgeben (Singh, M. et al., 1991, Pharm. Res., 8: 958–961). Wand/Kernsysteme, von denen gezeigt wurde, daß sie für die Antigenauslieferung geeignet sind, umfassen Liposome (Gerlier, D. et al., 1983, J. Immunol., 131: 490), ISCOMS (Claasen, I. und Osterhaus, A., 1992, Res. Immunol., 143: 531–541) und Proteosome (Gould-Fogerite, S. und Mannino, R., 1992, Liposome Technology, Band III, Gregoriadis, G. (ed.), CRC Press, Boca Ration, FL; Miller, M. D. et al., 1992, J. Exp. Med., 176: 1739–1744).

[0006] Vielleicht die am besten untersuchten der Antigenauslieferungssysteme sind diejenigen, die von den linearen polymeren Estern von Milchsäure und Glycolsäure erhalten wurden (d. h. Poly-(DL-lactid-coglycolid)) (PLCG) (Edelman, R. et al., 1993, Vaccine, 11: 155–158; Eldridge, J. H. et al., 1989, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 146: 59–66; Eldridge, J. H. et al., 1990, J. Controlled Release, 11: 205–214; Eldridge, J. H. et al., 1989, Adv. Exp. Med. Biol., 251: 191–202; Eldridge, J. H. et al., 1991, Mol. Immunol., 28: 287–294; Eldridge, J. H. et al., 1991, Infect. Immun., 59: 2978–2986; Marx, P. A. et al., 1993, Science, 260: 1323–1327; Moldoveanu, Z. et al., 1993, J. Infect. Dis., 167: 84–90; O'Hagan, D. T. et al., Vaccine, 11: 149–154; O'Hagan, D. T. et al., 1991, Immunology, 73: 239–242; Ray, R. et al., 1993, J. Infect. Dis., 167: 752–755; Reid, R. et al., 1993, J. Immunol., 150: 323A; Reid, R. H. et al., 1993, Vaccine, 11: 159–167). Verkapselung von mutmaßlichen Antigenen in PLCG-Mikrokapseln bietet eine Anzahl von Vorteilen. Erstens, Mikrokapseln werden leicht durch Hydrolyse unter Bildung von Milchsäure und Glycolsäure abgebaut. Zweitens, PLCG-Mikrokapseln mit einer Größe von weniger als 5 µm durchdringen einfach Peyers-Haufen, Mesenteriallymphknoten und die Milz nach oraler Inokulierung von Mäusen. Drittens, orale, intraperitoneale, intranasale oder subkutane Inokulierung von Mäusen mit

PLCG-mikroverkapselten Antigenen, einschließlich Influenzavirus, Parainfluenzavirus, Simian-Immunschwächevirus, Staph. aureus Enterotoxin B-Toxoid und Ovalbumin induziert eine stärkere Immunantwort als diejenige, die in Tieren induziert wird, die mit der gleichen Dosis von freiem Virus oder Protein inokuliert werden. Darüber hinaus induziert orale Inokulierung von Mäusen mit inaktivierten Viren eine verstärkte antigenspezifische IgA-Antwort an Schleimhautoberflächen. Schließlich wurden PLCG-Mikrokapseln an erwachsene Freiwillige ohne nachteilige Wirkungen oral verabreicht.

[0007] Der Hauptnachteil von PLCG-Mikrokapseln ist die erforderliche Verwendung organischer Lösungsmittel. Kontakt mit organischen Lösungsmitteln führt häufig dazu, daß die Infektivität viraler und bakterieller Pathogene inaktiviert wird, und kann darüber hinaus die Immunogenizität von Oberflächenproteinen, welche für die Induktion von humoralen oder zellulären Immunantworten kritisch sind, verändern. Tatsächlich waren große Mengen viraler Proteine erforderlich, um eine antigenspezifische Immunantwort mit PLCG-Mikrokapseln zu induzieren.

[0008] Das US-Patent Nr. 3,137,631 betrifft die Verkapselung wasserunlöslicher organischer Flüssigkeiten durch Vernetzung synthetischer Harze durch die Anwendung von Wärme oder Katalysatoren oder beidem. Es ist beschrieben, daß die Kapselhüllen aus kovalent verbundenen nichtionischen Materialien oder aus durch Hitze denaturierbaren Proteinen gebildet werden. Die resultierenden Kapseln profitieren von einer sekundären Behandlung mit vernetzenden Mitteln, um der Kapsel erhöhte Stabilität zu verleihen.

[0009] Das US-Patent Nr. 4,205,060 offenbart Mikrokapseln mit einem Kern, der ein wasserlösliches Salz enthält, ausgebildet durch Reaktion zwischen polymerem ionischem Harz und einem Arzneimittel, das entweder durch Umsetzung eines sauren Polymers mit einem basischen Arzneimittel oder umgekehrt eines basischen Polymers mit einem sauren Wirkstoff gebildet wird. Die Wände der Mikrokapseln werden aus wasserunlöslichen, filmbildenden Polymeren gebildet. Die wasserunlöslichen, filmbildenden Polymere, die als geeignete hüllbildende Mittel identifiziert wurden, sind alle neutrale, nichtionisierte Polymere. Die Kapseln dieser Erfindung werden durch Bereitstellen einer wäßrigen Lösung eines Salzes, das durch Umsetzen eines Arzneimittels und eines Kernpolymers hergestellt ist, Bereitstellen einer Lösung eines wasserunlöslichen, hüllbildenden Polymers in einer ersten mit Wasser nicht mischbaren organischen Flüssigkeit, Dispergieren der wäßrigen Lösung in der organischen Lösung und Hinzufügen einer zweiten mit Wasser nicht mischbaren Flüssigkeit, welche für das hüllbildende Polymer kein Lösungsmittel ist, zu der Dispersion unter Präzipitieren des Films um die Tropfen der dispergierten wäßrigen Phase herum hergestellt.

[0010] Das US-Patent Nr. 4,606,940 offenbart die Herstellung von Mikrokapseln durch Koazervation unter Präzipitierung des verkapselten Materials. Ein einzelnes Kolloid wird in Wasser dispergiert, und das Wasser der Solvatisierung wird um das Kolloid herum durch Zugabe von chemischen Verbindungen, welche eine höhere Affinität für Wasser haben als das Kolloid, entfernt. Dies bewirkt, daß die Kolloidketten näher zusammenkommen und das Koazervat bilden. Temperaturveränderungen sind notwendig, um die Verkapselung durch Koazervation zu erleichtern.

[0011] Das US-Patent Nr. 3,959,457 offenbart Mikrokapseln, welche das Reaktionsprodukt umfassen, das in einer fein dispergierten Emulsion einer mit Wasser nicht mischbaren Lösung aus (a) einer organischen polyfunktionalen Lewis-Base in einem (b) polaren, organischen Lösungsmittel mit niedrigem Siedepunkt und einer wäßrigen Lösung einer (c) teilweise hydrophilen, teilweise lipophilen, polyfunktionalen Lewis-Säure hergestellt wird. Die Kapseln dieser Erfindung haben lipophile Kerne.

[0012] Das US-Patent Nr. 5,132,117 offenbart Mikrokapseln, die aus wäßrigen oder im wesentlichen wäßrigen Kernen bestehen, welche von kapselartigen anisotropen Lewis-Salz-Membranen umgeben sind. Diese Mikrokapseln mit wäßrigem Kern werden hergestellt, indem man eine wäßrige Lösung eines geeigneten Lewis-sauren, wandbildenden Reaktanten und eines Kernmaterials in einem geeigneten nicht wäßrigen Lösungsmittel dispergiert, eine zusätzliche Menge an nicht wäßrigem Lösungsmittel hinzufügt, welches einen geeigneten Lewis-basischen, wandbildenden Reaktanten enthält, und die durch die Grenzflächenreaktion gebildeten Mikrokapseln erntet. Alternativ können die Mikrokapseln mit wäßrigem Kern dieses Patents durch Dispergieren einer wäßrigen Lösung eines geeigneten Lewis-sauren, wandbildenden Reaktanten und eines Kernmaterials in einem geeigneten nicht wäßrigen Lösungsmittel, das einen geeigneten Lewis-basischen, wandbildenden Reaktanten enthält, dispergiert und die durch die Grenzflächenreaktion gebildeten Mikrokapseln erntet.

[0013] F. Lim beschreibt in dem belgischen Patent Nr. 882 476 (1980) ein Verfahren, bei dem zuerst Calciumalginat-Mikrokugeln gebildet, anschließend, um sie in Poly-Lysin- oder Poly-Ethylenimin-Alginatkoazervate umzuwandeln, oberflächenbehandelt und schließlich durch Behandlung mit einem Calcium-Chelat-Bildner im Kern verflüssigt werden.

[0014] Rha und Rodriques-Sanchez vereinfachen in dem US-Patent Nr. 4,744,933 (1988) das Verfahren von Lim durch direktes Sprühen eines geladenen Polymers in ein entgegengesetzt geladenes Polymer unter Herstellung eines komplexen Koazervates, ähnlich demjenigen von Lim.

[0015] Dautzenberg et al. beschreiben in der UK-Patentanmeldung 2 135 954 A (1984) in ähnlicher Weise die Bildung komplexer Koazervatmikrokapseln, indem Tröpfchen von 2–3 mm aus Lösungen von anionischem Po-

lymer gezwungen werden, mehrere 10 cm in Lösungen von entgegengesetzt geladenen poly-quaternären Ammoniumsalzen zu fallen. Bei allen dieser anderen Methoden ist es klar, daß Polymerlösungen mit hoher Viskosität erforderlich sind, um Mikrokapseln effektiv herzustellen, und alle verwenden zwei entgegengesetzt geladene Polymere zur Bildung komplexer Koazervate.

[0016] Ito et al., Science, 263: 66–68 (1994) haben Zeitraster-Konfokallaser-Mikrophotographien verwendet, um die Tendenz von kolloidalen Lösungen anionischer Polymere, wie Natriumpolyacrylat, in Richtung einer Inhomogenität mit der Entwicklung einiger Mikrobereiche von relativ hohen Polymerkonzentrationen und anderen Bereichen ohne Polymer zu demonstrieren.

[0017] Die vorliegende Erfindung stellt Mikroverkapselungstechnologie bereit, analog zu derjenigen, die oben unter Bezugnahme auf die US-Patente Nr. 3,959,457 und 5,132,117 beschrieben ist, unterscheidet sich jedoch dahingehend, daß sie ein vollständig wäßriges System verwendet. Die Mikrokapseln dieser Erfindung basieren auf der Bildung schlecht löslicher (Amin-)Salze von polyanionischen Makromolekülen. Dieses Verfahren ist in der Lage, unter sehr sanften Bedingungen Partikel gleichmäßiger Größe herzustellen.

[0018] Im Gegensatz dazu basieren viele der zuvor bekannten vollständig wäßrigen Systeme auf der Bildung von Koazervaten, entweder einfachen oder komplexen, und liefern Mikroperlen mit Teilchengrößen in einem breiten Bereich. B. R. Mathews und J. R. Nixon, Surface characteristics of gelatin microcapsules by scanning electron microscopy, J. Pharm. Pharmacol., 26: 383–384 (1974). Einige einfache Koazervate haben den Nachteil, daß sie zur Präzipitierung proteinhaltiger Koazervate stark saure Medien (z. B. pH 3–4) erfordern. Komplexe Koazervate, die aus wäßriger Lösung präzipitiert werden, erfordern wenigstens zwei entgegengesetzt geladene Polymere. Vollständig wäßrige Systeme zur Herstellung von Hydrogelen auf der Grundlage von Hydroxyethylacrylat umfassen Polymerisation von freien Radikalen, katalysiert durch Peroxidspezies oder ionisierender Strahlung. J. D. Andrade, D. Gough, B. Kolff, W. J. Kunitomo und R. V. Wagenon, Coated adsorbents for direct blood transfusion: HEMA/activated carbon, Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organs, 17: 222–228 (1971). Solche Katalysatoren sind häufig schädlich für empfindliche Proteinmoleküle oder intakte Organismen. Es ist bekannt, daß Hydrogele, die aus wäßriger Alginsäure und Calciumionen hergestellt sind, in einem Verfahren hergestellt werden können, das sanft genug ist, um Leben für eine spätere Freisetzung sowohl von Mikroben als auch multizellulären Organismen (z. B. Nematoden) einzubetten und zu erhalten. F. Lim und A. M. Sun, Science, 210: 908–910 (1980). Darüber hinaus scheint das Calcium-Alginat-System auf dieses einzelne Alginatsalz beschränkt zu sein, und es würde nicht die Aminsalze der vorliegenden Erfindung liefern.

[0019] Eine Anzahl jüngerer Veröffentlichungen beschreibt andere Mittel zur Verkapselung immunogenen Materialien, sie beruhen jedoch auf nicht wäßrigen Systemen. J. H. Eldridge et al. (1991), Molecular Immunology SUPRA., R. Edeluran et al. (1993) Vaccine SUPRA. und R. Reddy, S. Nair, K. Byrnestad und B. T. Rouse, Liposomes as antigen delivery systems in viral immunity. Sem. Immunol. 4: 91–96 (1992). Impfstoffbestandteile mit immunogenen Untereinheiten wurden in Polyacrylat- und Polyglycolid/Lactid-Perlen oder liposomähnlichen Vesikeln durch Verfahren eingeschlossen, welche flüchtige organische Lösungsmittel, wie Dichlormethan oder Chloroform, verwenden. Die Lösungsmittel werden dazu verwendet, Emulsionen von Polymerlösung oder getrocknete Lipidfilme zu bilden. Polyacrylat- und Polyglycolid/Lactid-Verfahren liefern typischerweise Mikroperlen mit äußerst niedriger (etwa 0,01%) Immunogen- oder Antigen-Einfangeffizienz, verglichen mit der im Verhältnis höheren (etwa 5%) Effizienz, die man bei dem vorliegenden, noch nicht optimierten Verfahren beobachtet.

[0020] Es bleibt daher ein Bedarf nach effektiven Systemen zur Mikroverkapselung von aktiven Mitteln und insbesondere von immunogenem Stoff.

## ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0021] Die vorliegende Erfindung betrifft das Verfahren zur Herstellung von Mikrokapseln gemäß dem Wortlaut der Patentansprüche 1–41. Die vorliegende Erfindung liefert stabile Mikrokapseln, die einen wäßrigen Kern haben und im wesentlichen frei von nicht wäßrigen Kontaminationen sind. Die Mikrokapseln können vorteilhafterweise ein aktives Mittel umfassen. Die Erfindung liefert weiterhin ein hocheffizientes Verfahren zur Herstellung solcher Mikrokapseln.

[0022] Die Erfindung liefert auch Mittel zum Verkapseln von Materialien unter Verwendung eines vollständig wäßrigen Systems von Reagenzien bei oder unterhalb von Raumtemperatur und ohne hohe Drücke zu benötigen. Als solche findet sie Anwendung auf viele Substanzen oder Gebilde, die gegenüber den organischen Lösungsmitteln, erhöhten Temperaturen und/oder hohen Drücken, die zuvor in den meisten Verkapselungssystemen verwendet wurden, instabil sind. Am meisten erwähnenswert unter diesen Substanzen und Gebilden sind natürlich vorkommende oder biotechnologisch erhaltene Enzyme, Proteine und Peptide, wie Glucose-6-Phosphat-dehydrogenase, Calcitonin, Entropoietin, Hämoglobin, Insulin, Interleukin oder Somatotropin, natürlich vorkommende, nicht proteinhaltige Makromoleküle, wie Heparin, Impfstoffe und Impfstoffbestandteile, erhalten aus intakten oder immunogenen Untereinheiten, einschließlich "nackter" Desoxyribonukleinsäure (DNA) und Desoxyribonukleinsäure-Konstrukten, und/oder erhalten aus intakten oder abgeschwächten Orga-

nismen oder deren immunogenen Untereinheiten, einschließlich Actinomyces, Bazillen, Kokken, Pilzen, Eingeweidewürmern, Larven, Prionen, Protozoen, Rickettsia, Spirocheten, Viren, multizellulären Parasiten und Hefen, toleranten Antigenen, die zur Immunisierung gegen oder zur Abschwächung von allergischen Reaktionen auf Stäube, Schuppen, Pollen, Sporen und ähnliches verwendet werden, und Zellen, wie Pankreas-Inselzellen, Hepatozyten, Interleukin oder andere Immunmodulatoren segregierende Zellen, abgeleitet aus dem Menschen oder anderen Spezies, wenn sie implantiert werden, um als Ersatz für beschädigte, gestörte oder fehlende Gewebe und/oder Organe zu dienen, welche, wenn sie nicht verkapselt sind, vom Empfängerorganismus als fremd erkannt werden und unerwünschtem immunologischem Angriff ausgesetzt sein könnten.

[0023] Diese Erfindung liefert weiterhin Mittel zur Verkapselung und späteren Freisetzung hochgradig reizender Wirkstoffe, wie Fluorouracil, in einer Rate, die langsam genug ist, die Toxizität solcher Mittel zu vermindern, sowie zur Verkapselung, langsamen Freisetzung und Aufrechterhaltung gleichmäßiger therapeutischer Konzentrationen vieler Wirkstoffe (typisiert durch antiinflammatorische Mittel, wie Prednisolon und Indomethacin, Antikörper, wie Tetracyclin, oder antispasmodische Wirkstoffe, wie Theophyllin). Wenn es zur Verkapselung pigmentierter oder opaker Materialien, wie Dextran-Blau oder Holzkohle, verwendet wird, kann das System dazu verwendet werden, bioaktive Mittel, wie Ivermectin (ein Ektoparasitizid) und Bt-Proteine (Bacillus thuringiensis larvizides Protein), welche im Licht instabil sind, vor Licht zu schützen und diese Mittel entweder allmählich oder in ausgelösten Stößen freizusetzen. Fluoreszent markierte Mikrokapseln können hergestellt und zur Farbcodierung, Identifizierung oder zur Unterstützung der Feststellung und Lokalisierung verkapselter Formulierungen verwendet werden.

[0024] Gemäß einem weiteren Gesichtspunkt liefert die vorliegende Erfindung verkapselte Rotavirus-Partikel und andere solche Mittel, welche typischerweise instabil sind und/oder durch organische Lösungsmittel, erhöhte Temperaturen und/oder hohe Drücke, die früher in den meisten Verkapselungssystemen verwendet wurden, denaturiert werden. Das Rotavirus, welches gemäß der vorliegenden Erfindung verkapselt wird, umfaßt neu zusammengesetzte Stämme von Rotavirus, welche als Impfstoffe zum Schutz gegen Rotavirusinfektion besonders geeignet sind.

[0025] Wie es aus der nachfolgenden Beschreibung deutlich wird, ermöglicht die vorliegende Erfindung eine Impfstoffverabreichung auf eine Weise, welche eine Penetration von Antigen in Schleimhautlymphozytenpopulationen (z. B. Peyers-Haufen) nach oraler Inokulierung sowie ein Verbleiben von Antigen in Geweben nach oraler oder parenteraler Inokulierung erlaubt.

#### KURZE BESCHREIBUNG DER FIGUR

[0026] Die anhängende **Fig. 1** ist eine schematische Seitenansicht einer Vorrichtung, die in dem bevorzugten Verfahren zur Herstellung des Mikrokapselmaterials der vorliegenden Erfindung eingesetzt wird.

#### AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0027] Die mit einer Lewis-Salz-Wand und einem wäßrigen Kern versehenen Mikrokapseln dieser Erfindung werden hergestellt, wie es nachfolgend beschrieben wird. Das Verkapselungssystem nutzt die im wesentlichen unmittelbar einsetzende Reaktion zwischen Tröpfchen wäßriger Lösungen von anionischen Polymeren oder deren wasserlöslichen Salzen und wäßrigen Lösungen von kationischen Amin-Reaktanten mit niedrigem Molekulargewicht oder deren wasserlöslichen Salzen zur Bildung wasserunlöslicher Filme um die Tröpfchen und deren Inhalte herum. Die kapselartige Membran der resultierenden Mikrokapseln ist eine ionisch stabilisierte, anisotrope Lewis-Salz-Membran.

[0028] Eine wäßrige Lösung oder Suspension von aktivem Mittel (z. B. Wirkstoff, Impfstoff oder Pestizid) und, falls erwünscht, Hilfsstoff (Lichtschutzmittel, Farbstoff) wird in einer wäßrigen Lösung von (z. B. dem Natriumsalz von) einem geeigneten polyanionischen Makromolekül (d. h. Polymer) gelöst oder suspendiert. Anschließend wird die resultierende Lösung/Suspension als Tröpfchen in einer wäßrigen Lösung von (z. B. dem Hydrochloridsalz von) einem geeigneten wasserlöslichen Amin dispergiert. An der auftretenden Grenzfläche der Polymertröpfchen und der Aminlösung findet eine Salzaustauschreaktion statt, die zu der Bildung eines sehr schlecht löslichen Salzes führt (gebildet zwischen dem Amin und dem Polymer), welches unter Bildung mehr oder weniger kugelförmiger Perlen oder Kapseln präzipitiert, in welchen aktiver Bestandteil eingeschlossen ist. Die resultierende Suspension von Mikrokapseln, welche eingeschlossenen aktiven Bestandteil enthält, wird gesammelt.

[0029] Obwohl verschiedene aktive Mittel gemäß dieser Erfindung mikroverkapselt werden können, wird die Erfindung nachfolgend in erster Linie unter Bezugnahme auf die Mikroverkapselung von immunogenen Mitteln und insbesondere Rotavirus beschrieben werden. Somit ermöglicht die vorliegende Erfindung gemäß einer Ausführungsform die Auslieferung von immunogenen Mitteln, die als prophylaktische Immunisierungsmittel geeignet sind, d. h. Impfstoffe und/oder Immuntherapeutika.

[0030] Wie er hierin verwendet wird, umfaßt der Begriff "immunogene Zusammensetzung" immunogene Pep-

tide und Proteine, einschließlich Gemische, die immunogene Peptide und/oder Proteine enthalten, intakte inaktive, abgeschwächte und infektiöse virale Partikel, intakte getötete, abgeschwächte und infektiöse Prokaryonten, intakte getötete, abgeschwächte und infektiöse Protozoen, einschließlich jeder Lebenszyklusstufe davon, und intakte getötete, abgeschwächte und infektiöse multizelluläre Pathogene. In einigen Ausführungsformen können Stämme von Viren, welche durch die mit Hülle oder die nicht mit Hülle versehenen Viren repräsentiert werden, zur Bereitstellung mikroverkapselter Impfstoffe verwendet werden.

[0031] Immunogene Peptide und Proteine umfassen Peptide und Proteine, welche wenigstens ein Epitop enthalten, das mit einem auf einem Antigen, gegen welches eine Immunantwort gewünscht wird, präsentierten Epitop identisch oder im wesentlichen ähnlich ist. In einigen bevorzugten Ausführungsformen sind immunogene Peptide oder Proteine zu natürlich vorkommenden Peptiden und Proteinen von Pathogenen oder Zellen, gegen welche eine Immunantwort gewünscht wird, identisch. Die Proteine können von Pathogenen, wie Viren, Prokaryonten, Protozoenpathogenen und multizellulären Parasiten, abgeleitet sein. Darüber hinaus können auch andere Immunziele bereitgestellt werden, wie Proteine, die mit Tumoren und Autoimmunerkrankungen einhergehen. Proteine werden aus natürlichen Quellen gereinigt oder unter Verwendung rekombinanter DNA-Techniken hergestellt. In bevorzugten Ausführungsformen sind die immunogenen Peptide und Proteine pathogene Proteine, wie virale Hüllproteine, prokaryontische Membranaußenseitenproteine oder andere antigene Proteine, gegen welche eine ein Pathogen neutralisierende Immunantwort hervorgerufen werden kann. Diese mikroverkapselten Peptide und Proteine sind mikroverkapselte Untereinheitenimpfstoffe.

[0032] Wie er hierin verwendet wird, bezeichnet der Begriff "im wesentlichen ähnliches Epitop" ein Epitop, das eine Struktur aufweist, die nicht identisch zu einem Epitop eines Proteins ist, aber trotzdem eine zelluläre oder humorale Immunantwort hervorruft, die mit dem Protein kreuzreagiert.

[0033] Immunogene Peptide und Proteine umfassen Gemische, welche diese Bestandteile zusätzlich zu anderen immunogenen Peptiden und Proteinen und/oder nicht immunogenen Bestandteilen enthalten. Gemische können durch teilweise Reinigung immunogenen Peptide und Proteine von Ausgangsmaterialien, welche andere Bestandteile umfassen, erhalten werden.

[0034] Virale Impfstoffe sind gut bekannt und umfassen: inaktive oder "getötete" Viruspartikel; abgeschwächte virale Partikel, deren infektiöse Fähigkeiten z. B. durch rekombinante Insertionen, Deletionen oder Insertionen oder durch selektive Passagiertchniken eingeschränkt sind; infektiöses Virus, das gegen andere Spezies oder als rekombinante Vektoren zur Auslieferung und Expression von Genen, die immunogene Proteine codieren, verwendet wird. In einigen Ausführungsformen können Stämme von Viren, die durch die mit Hülle und die nicht mit Hülle versehenen Viren repräsentiert werden, dazu verwendet werden, mikroverkapselte Impfstoffe bereitzustellen.

[0035] In ähnlicher Weise sind prokaryontische Impfstoffe gut bekannt und umfassen: getötete Organismen; abgeschwächte Organismen, deren infektiöse Fähigkeiten eingeschränkt sind; infektiöse Organismen, einschließlich rekombinante Vektoren, zur Auslieferung und Expression von Genen, die immunogene Proteine codieren.

[0036] Im Falle von rekombinanten Vektoren sind die Proteine, die von den in den Vektor eingesetzten Genen codiert werden, Immunziele. Beispiele für Immunziele umfassen, sind aber nicht beschränkt auf pathogene Proteine, wie Proteine von Viren, Prokaryonten, Protozoenpathogene und multizelluläre Parasiten oder Proteine, die mit Tumoren und Autoimmunerkrankungen einhergehen.

[0037] Impfstoffe gegen Protozoenpathogene, die intakte getötete oder abgeschwächte Protozoenorganismen verwenden, benutzen im allgemeinen den Organismus in einem Lebensstadium, bei welchem der geimpfte Organismus normalerweise ein Wirt ist, um sicherzustellen, daß die richtigen Immunziele präsentiert werden.

[0038] Es wird auch in Erwägung gezogen, daß zusätzlich zur Auslieferung von Vektoren für die Herstellung von immunogenen Proteinen, auch mikroverkapselte Vektoren in Gentherapieanwendungen bereitgestellt werden können, in denen der Vektor ein therapeutisches Gen trägt, welches ein nicht immunogenes Protein codiert. Solche Vektoren umfassen, sind aber nicht beschränkt auf virale Vektoren, wie rekombinante Retroviren und rekombinante Adenoviren.

[0039] Gemäß einer weiteren Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung mikroverkapseltes Rotavirus bereit, das zur Auslieferung als prophylaktische immunisierende Mittel geeignet ist, d. h. Rotavirus-Impfstoffe.

[0040] Rotavirus-Impfstoffe sind gut bekannt und umfassen: bovines WC3 (ATCC-Hinterlegungsnr. VR-2102); HCR3a (ATCC-Hinterlegungsnr. VR-2325, hinterlegt am 1. Mai 1991); bovines WC3, modifiziert mit humanem vp4 W 179; bovines WC3, modifiziert mit humanem W178-8; bovines WC3, modifiziert mit humanem W179-9 (ATCC-Hinterlegungsnr. VR-2194 und VR-2196, hinterlegt am 25. November 1987) oder SC2-9 (Hinterlegungsnr. VR-2417, hinterlegt am B. Juli 1993); bovines WC3, modifiziert mit humanem W179-9 (ATCC-Hinterlegungsnr. VR-2415, hinterlegt am B. Juli 1993) und W179-4 (ATCC-Hinterlegungsnr. VR-2377, hinterlegt am 19. Juni 1992); bovines WC3, modifiziert mit humanem vp4 DS1 (ATCC-Hinterlegungsnr. VR-2416, hinterlegt am B. Juli 1993); bovines WC3, modifiziert mit humanem Bricout B-9; bovines WC3, modifiziert mit humanem vp4 Bricout A; HCR3a, modifiziert mit humanem W179-9 (ATCC-Hinterlegungsnr.

VR-2324, hinterlegt am 1. Mai 1991); Rhesus-Rotavirus RRV; RRV, modifiziert mit humanem Wa-9; RRV, modifiziert mit humanem DS1—9; RRV, modifiziert mit humanem P-9; und RRV, modifiziert mit humanem ST3-9.

[0041] Rotavirus-Stämme, die gemäß der vorliegenden Erfindung geeignet sind, umfassen diejenigen, beschrieben in: US-Patent Nr. 4,636,385, veröffentlicht am 13. Januar 1987; US-Patentanmeldung Seriennr. 07/126,477, eingereicht am 30. November 1987; US-Patentanmeldung Seriennr. 07/588,884, eingereicht am 26. Juli 1990; US-Patentanmeldung Seriennr. 07/694,968, eingereicht am 1. Mai 1991; US-Patentanmeldung Seriennr. 07/902,321, eingereicht am 22. Juni 1992, die alle durch Bezugnahme hierin aufgenommen sind.

[0042] Eine wäßrige Lösung oder Suspension von immunogenen Zusammensetzungen wird in einer wäßrigen Lösung von (z. B. dem Natriumsalz von) einem geeigneten polyanionischen Makromolekül (d. h. Polymer) gelöst oder suspendiert. Anschließend wird die resultierende Lösung/Suspension als Tröpfchen in einer wäßrigen Lösung von (z. B. dem Hydrochloridsalz von) einem geeigneten wasserlöslichen Amin dispergiert. An der auftretenden Grenzfläche der Polymertröpfchen und der Aminlösung findet eine Salzaustauschreaktion statt, die zur Bildung eines sehr schlecht löslichen Salzes (gebildet zwischen dem Amin und dem Polymer) führt, welches unter Bildung mehr oder weniger kugelförmiger Perlen oder Kapseln präzipitiert, in welchen immunogene Zusammensetzung eingeschlossen ist. Die resultierende Suspension von Mikrokapseln, welche eingeschlossene immunogene Zusammensetzung enthält, wird gesammelt.

[0043] Das anionische Polymer und das Reaktantenamin sind aus Gruppen ausgewählt, die bei Reaktion miteinander schnell ein schlecht lösliches Präzipitat bilden und so die Tröpfchen einschließen, bevor das Polymer in den Tröpfchen ausreichend diffundiert, um die Form des Tropfens merklich zu verzerren oder die Konzentration an Polymerreaktanten unter diejenige, die zur Ausbildung eines Films erforderlich ist, zu erniedrigen. Daher ist es nicht notwendig, Polymerlösungen mit hoher Viskosität zu verwenden, aber es ist notwendig, daß das Amin zu einer schnellen Diffusion zu und Reaktion an der Pseudophasengrenze, die von dem Polymertröpfchen definiert wird, in der Lage ist. Die Viskosität der Polymerlösung kann bis zu 2,5–10 Centipoise niedrig sein.

[0044] Ein geeignetes Mittel zum Dispergieren der Polymerlösungströpfchen (die eine Lösung oder Suspension von immunogener Zusammensetzung in der Polymerlösung enthalten) in der Aminlösung besteht darin, ein Aerosol der Polymerlösung auf/in die Aminlösung fallenzulassen, während sie gerührt wird. Die Verwendung eines Zerstäubers vom Bernoulli-Typ zur Erzeugung des Aerosols liefert Mikrokapseln mit einer relativ breiten (Gauß'schen) Verteilung von Partikelgrößen um den Mittelwert herum (mit Variationskoeffizienten in der Nähe von 10–20%). Wenn engere Größenverteilungen erwünscht sind, kann ein akustisch gepulster Tröpfchenerzeuger, wie er hierin beschrieben wird, verwendet werden, um hochgradig gleichmäßige Mikrokapseln zu liefern (mit Durchmesservariabilitätskoeffizienten in der Nähe von 5%).

[0045] In einigen Fällen, wie wenn säurelabile immunogene Zusammensetzungen oral verabreicht werden sollen, kann es erwünscht sein, die Mikrokapseln mit einem Darmmaterial zu überziehen, um sie vor Magensäure zu schützen. Geeignete Darmüberzugsmaterialien umfassen Zelluloseacetatphthalat und mit Polyoxyethylen vernetzte Polymethacrylsäure. Die Technologie zur Bereitstellung von Darmüberzügen für kleine Partikel, Tabletten und Kapseln ist in der pharmazeutischen Industrie gut bekannt.

[0046] Die zur Herstellung der Mikrokapseln aus vollständig wäßrigen Lösungen verwendeten Reaktanten sind von einer Anzahl kommerzieller Lieferanten erhältlich, aber alle wurden von Fisher Scientific Company, F. M. C. Corporation, Ruger Chemical Company, Sigma Chemical Company und/oder The Upjohn Company bezogen.

[0047] Schnelle Freisetzung von verkapselten Materialien wird durch Zugabe eines wasserlöslichen Salzes, entweder als Feststoff oder als eine Lösung dieses Salzes, zu einer wäßrigen Suspension der Mikrokapseln erreicht. In jedem Fall muß das verwendete Salz in der Lage sein, mit dem unlöslichen Film unter Erhalt eines wasserlöslichen ionischen Produkts in einer zu der Umkehrung der filmbildenden Reaktion analogen Art und Weise zu reagieren. Es ist klar, daß die filmbildende Reaktion eine reversible Reaktion ist. Langsame Freisetzung von löslichen kleinen Molekülen wird durch deren allmähliche Diffusion durch die Mikrokapselwände realisiert. Diffusionsraten hängen von der Größe und Löslichkeit der diffundierenden Spezies und von der Dicke und Dichte der Kapselwand ab. Somit kann zusätzlich zur Bereitstellung einer schnellen Freisetzung, wenn es erwünscht ist, das Verkapselungsverfahren dazu verwendet werden, eine kontrollierte langsame Freisetzung von löslichen verkapselten Materialien zu liefern.

[0048] Anionische Polymere oder Makromoleküle, von denen gezeigt wurde, daß sie als verkapselnde Reagenzien geeignet sind, stammen aus der Gruppe wasserlöslicher Polymere mit reaktiven Carboxylat- oder Sulfatgruppen, bestehend aus Alginsäuren, Alginsäuren, die mit Fluorophoren verknüpft sind, wie Fluorescein-Isothiocyanat oder Rhodamin-Isothiocyanat, Arabinsäure, Zellulosesulfat, Carboxymethylzellulose, Carra-geenanen, Chondroitinsulfat, Heparin, Polyacrylsäure, polyoxyethylenvernetzte Polyacrylsäure (z. B. Eudragit L-100®, hergestellt von Rohm Pharma) und Polyvinylcarbonsäure (z. B. Carbopol 934®). In einigen bevorzugten Ausführungsformen ist das anionische Polymer aus der Gruppe ausgewählt, bestehend aus Alginsäure (Fisher Scientific Co., Fairlawn, NJ), Polyacrylsäure (Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO), Zellulosesulfat (Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO), Carbomer USP (Carbopol 934®, B. F. Goodrich, Cleveland, OH), Carboxy-

methylzellulose USP (mittlere Viskosität, Ruger Chemical Co., Inc., Irvington, NJ), Heparin USP (The Upjohn Co., Kalamazoo, MI), und Arabinsäure (isoliert nach dem im US-Patent Nr. 2,666,759, welches durch Bezugnahme hierin aufgenommen wird, beschriebenen Verfahren), von denen jedes als ein Natriumsalz bereitgestellt wird. In einigen bevorzugten Ausführungsformen ist das anionische Polymer Alginsäure, die als Natriumalginat bereitgestellt wird.

[0049] Kationische Reaktanten, die zur Herstellung von Mikrokapseln gemäß dieser Erfindung geeignet sind, entstammen der Gruppe von Mono-, Di-, Tri- und Tetra-Aminoverbindungen, welche folgendes umfaßt: Arginin, Decylamin, Dodecylamin, Ethylendiamin, Piperazin, Methylenblau, Octadecylamin, Triethylamin, Triethyltetramin und Spermin. Es wird im allgemeinen bevorzugt, daß die anionischen Polymere als ihre neutralen Salze mit einem Alkalimetallion (z. B. Natrium) verwendet werden und die basischen Reaktanten in der Form ihrer Chlorid- oder Acetatsalze verwendet werden. In einigen bevorzugten Ausführungsformen wird das Amin als ein Hydrochloridsalz bereitgestellt. In einigen bevorzugten Ausführungsformen ist das Amin aus der Gruppe ausgewählt, bestehend aus Arginin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), Piperazin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), Ethylendiamin (Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO), Triethylamin (Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO), Triethyltetramin (Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO), Methylen-Blau (Fisher Scientific Co., Fairlawn, NJ) und Spermin, von denen jedes als ein Hydrochloridsalz bereitgestellt wird, und Octadecylamin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), welches als ein Acetat bereitgestellt wird. In einigen bevorzugten Ausführungsformen ist das Amin Spermin, das als Spermin-Hydrochlorid bereitgestellt wird.

[0050] Basierend auf heutigen Tests befinden sich unter den Materialien, die gemäß dieser Erfindung verkapselt werden können, die folgenden: Dextranblau, Kohle, Fluorouracil, Indomethacin, Nikotinamid, Phenolrot, Prednisolon, Tetracyclin, Theophyllin, larvizide Proteine von *Bacillus thuringiensis* (Bt.) Subsp. *Israelensis* und Stämme von Viren, repräsentiert durch die mit Hülle und nicht mit Hülle versehenen Viren Vaccinia bzw. Rotavirus.

[0051] Vor der Bildung von Mikrokapseln mit eingeschlossenen immunogenen Zusammensetzungen werden die anionischen Polymere und die Amine einzeln getestet, um deren Wirkung auf die Immunogenizität der immunogenen Zusammensetzung zu bestimmen.

[0052] Um die Wirkung von anionischen Polymeren und Aminen auf Infektiösität und Immunogenizität zu bestimmen, kann der Fachmann auf dem Gebiet Routinetests unter Verwendung bereits verfügbarer Ausgangsmaterialien durchführen. Zum Beispiel kann die Fähigkeit eines ausgewählten immunogenen Peptids oder Proteins, eine Immunantwort in der Gegenwart oder Abwesenheit verschiedener Konzentrationen der einzustufenden Komponente hervorzurufen, bestimmt werden, um die Wirkung zu bestimmen, welche die Komponente auf die Immunogenizität des Moleküls hat. In gleicher Weise kann die Fähigkeit eines ausgewählten infektiösen Mittels, Zellen oder ein Tier zu infizieren, in der Gegenwart oder der Abwesenheit verschiedener Konzentrationen der zu bestimmenden Komponente getestet werden, um die Wirkung festzustellen, welche die Komponente auf die Infektiösität hat. Im Falle von Rotavirus kann ein Rotavirusvorrat mit dem wäßrigen Natriumsalz eines anionischen Polymers oder dem wäßrigen Salz des Amins oder einer Kontrolle, wie Kochsalzlösung, kombiniert werden. Die Wirkung der Komponente auf die Rotavirus-Infektiösität wird durch den Standard-Plaque-Test bestimmt.

[0053] Da es in einigen Ausführungsformen bevorzugt ist, daß der mikroverkapselte Impfstoff wirksam ist, wenn er oral verabreicht wird, werden die anionischen Polymere und die Amine, welche die immunogene Zusammensetzung nicht inaktivieren, in Kombination getestet, um deren Fähigkeit zur Ausbildung von Mikrokapseln, die einem Abbau in simulierter Magensäure widerstehen, zu bestimmen.

[0054] Das wäßrige Natriumsalz von anionischem Polymer, vorzugsweise 1 ml, wird tropfenweise zu wäßrigem Aminhydrochlorid (oder -acetat), vorzugsweise 1 ml, hinzugegeben, um die Fähigkeit zur Ausbildung eines Grenzflächenpräzipitats zu bestimmen. Kombinationen, welche ein festes Material erzeugen, werden zur Herstellung von Mikrokapseln verwendet. Mikrokapseln werden durch Dispersion des Natriumsalzes von anionischem Polymer als Tröpfchen mit einer Größe von etwa 5 µm in einer wäßrigen Lösung des Aminsalzes in analoger Art und Weise zu derjenigen, die in dem US-Patent Nr. 4,744,933 zur Herstellung von Calciumalginat-Mikrokapseln beschrieben ist, ausgebildet. Kurzzeitstabilität von Mikrokapseln wird durch Beobachtung bei Raumtemperatur für 5 Tage in wäßrigen Lösung getestet. Mikrokapseln, die bei Raumtemperatur stabil sind, werden mit simulierter Magensäure (pH 1,2) bei 37°C für 2 Stunden behandelt.

[0055] Die Kombinationen von anionischen Polymeren und Aminen, welche die immunogenen Zusammensetzungen nicht inaktivieren und welche stabile Mikrokapseln liefern, werden dann zur Herstellung von mikroverkapselten Impfstoffen verwendet. Die immunogene Zusammensetzung wird zuerst mit dem anionischen Polymer kombiniert. Das Polymer/Virus-Gemisch wird dann als Tröpfchen in Amin dispergiert.

[0056] Weitere Beispiele für menschliche und tiermedizinische Impfstoffe und Stämme von Rotavirus, die gemäß der vorliegenden Erfindung verkapselt werden können, sind nachfolgend aufgelistet.



1. Humane Impfstoffe

[0057] Diphtherie-Toxoid  
Pertussis-Toxoid  
Tetanus-Toxoid  
Hepatitis B-Oberflächenantigen  
Atemwegs-Synzytium-Virus  
Adenovirus  
Parainfluenza-Virus  
Kanarienvogelpockenrekombinante  
Hepatitis A-Virus  
Influenzavirus, lebend oder inaktiviert  
Gelbfieberevirus  
lebendes, abgeschwächtes Poliovirus  
Rabies-Virus  
Inaktiviertes Poliovirus  
Cholera  
Haemophilus Influenza Typ B  
Yersinia pestis (Pest)  
Neisseria meningitidis  
Salmonella typhi (Typhoid)  
Masern  
BCG  
Mumps  
Streptococcus pneumoniae  
Rubella  
Varicella  
Rotavirus  
humaner Immunschwächevirus  
Herpes simplex-Virus  
Cytomegalovirus

2. Tiermedizinische Impfstoffe

Rind

[0058] Infektiöse bovine Rhinotracheitis  
Parainfluenza Typ 3  
Bovines Diarrhö-Virus  
Rinderatemwegs-Synzytium-Virus  
Rotavirus  
Coronavirus  
Rabies  
Haemophilus/Pasteurella-Spezies  
Leptospira  
Clostridien-Spezies  
Tetanus-Toxoid

Hunde

[0059] Hundestaupe/-masern  
Hundehepatitis  
Parvovirus  
Coronavirus  
Rabies  
Borrelia burgdorferi  
Leptospira

Katzen

[0060] Katzen-Rhinotracheitis-Virus  
Katzen-Calicivirus  
Panleukopenia-Virus  
Katzenleukämievirus  
Infektiöses Katzen-Peritonitis-Virus  
Rabies

Schwein

[0061] Transmissible Gastroenteritis  
Rotavirus  
Parvovirus  
Pseudorabies  
Pasteurella  
Erysipelas  
Leptospira sp.  
Haemophilus sp.  
Bordetella  
Tetanus-Toxoid

Pferde

[0062] Pferde-Enzephalomyelitis  
Pferde-Influenza  
Pferde-Rhinopneumonitis  
Tetanus-Toxoid  
Rabies

3. Rotavirus-Stämme

[0063] Bovines WC3  
HCR3a  
Bovines WC3, modifiziert mit humanem vp4 W 179  
Bovines WC3, modifiziert mit humanem W178-8  
Bovines WC3, modifiziert mit humanem W179-9 oder SC2-9  
Bovines WC3, modifiziert mit humanem W179-9 und -4  
Bovines WC3, modifiziert mit humanem vp4 DS1  
Bovines WC3, modifiziert mit humanem Bricout B-9  
Bovines WC3, modifiziert mit humanem vp4 Bricout A  
HCR3a, modifiziert mit humanem W179-9  
Rhesus-Rotavirus RRV  
RRV, modifiziert mit humanem Wa-9  
RRV, modifiziert mit humanem DS1-9  
RRV, modifiziert mit humanem P-9  
RRV, modifiziert mit humanem ST3-9

[0064] Zwei Virustypen, ein Stamm von Vacciniavirus, identifiziert als VVUKvp7, und zwei Stämme von Rotavirus, identifiziert als WC3 und RRV, wurden erfolgreich eingeschlossen, erhalten und später aus den Mikrokapseln der vorliegenden Erfindung freigesetzt. Diese zwei Virustypen repräsentieren die zwei Hauptkategorien von Viren, nämlich mit Hülle und nicht mit Hülle versehene. Nicht mit Hülle versehene Viren, wie Rotavirus, Poliovirus und Adenovirus, sind viel weniger empfänglich für Trocknungsmittel, Detergenzien und Oberflächenreinigungsmittel als mit Hülle versehene Viren. Infolgedessen überleben die nicht mit Hülle versehenen, aber nicht die mit Hülle versehenen Viren, gut in Abwasser und auf Umgebungsoberflächen. Mit Hülle versehene Viren sind aufgrund ihrer Oberflächenlipiddoppelschicht nicht so munter wie nicht mit Hülle versehene Viren und sind empfänglich für Abbau durch Kontakt mit den oben aufgeführten Mitteln. Vacciniavirus wurde wegen seiner Verwendung als ein rekombinanter Vektor, in welchen DNA, die immunogene Peptide und Proteine codiert, relativ einfach eingesetzt werden kann, als ein Kandidat für Verkapselung gewählt. Stämme von Rotavirus wurden zur Untersuchung ausgewählt, weil Rotavirus dafür bekannt ist, schwere und manchmal tödliche Diarrhö in menschlichen und anderen Kindern zu verursachen.

[00665] Mikrokapseln gemäß der vorliegenden Erfindung können mit der hierin beschriebenen Vorrichtung hergestellt werden, welche die Herstellung von Mikrokapseln mit äußerst enger Größenverteilung bei auswählbaren mittleren Größen erlaubt. Dies ist wichtig für die Herstellung von Mikrokapseln, die für die Injektion oder für die Aufnahme durch die mit dem Darm verbundenen lymphatischen Gewebe (eine Untergruppe davon wird häufig als Peyers-Haufen bezeichnet) oder das mit den Bronchien verbundene lymphatische Gewebe des respiratorischen Systems vorgesehen sind. Mikrokapseln, die für die intravenöse Injektion vorgesehen sind, müssen notwendigerweise einen Durchmesser von weniger als etwa 5 µm haben, klein genug, um durch Kapillaren hindurchzutreten. Für die Verabreichung durch Inhalation müssen Teilchen in dem respirierbaren Größenbereich von weniger als etwa 5 µm liegen, und um tiefe alveolare Stellen zu erreichen, ist es bevorzugt, daß Teilchen im Größenbereich unterhalb von 2 µm liegen. Die Gewebe von Peyers-Haufen unterscheiden hochgradig bezüglich der Größe von Teilchen, welche sie aufnehmen, und wählen nur Teilchen mit einer Größe von weniger als 10 und vorzugsweise etwa 5 µm aus. Diese Vorrichtung kann Populationen von Mikrokapseln mit verschiedenen Größen herstellen mit einer Standardabweichung vom Mittelwert von weniger als 0,25 µm im Bereich nahe dem mittleren Volumendurchmesser von 5 µm.

[00666] Die Impfstoffe der Erfindung können über eine Vielzahl von Wegen verabreicht werden, einschließlich z. B. intraokular, intranasal, bukkal, oral, durch Inhalation, rektal, subkutan, intramuskulär, intraarteriell, intravenös und intraperitoneal. Die Impfstoffe der Erfindung können parenteral ausgeliefert werden. Von Beispielen solcher Impfstoffe wurde gezeigt, daß sie die Immunogenizität in Labormäusen um das Hundert- bis Tausendfache gegenüber nicht verkapseltem Virus erhöhen. Das System arbeitet gut sowohl mit gereinigtem Virus als auch viralen Gewebekultursuspensionen, so daß arbeitsaufwendige und teure Trennung viraler Partikel nicht erforderlich ist.

#### Mikrokapselbildende Reaktionen:

[00667] Gemäß der vorliegenden Erfindung kann einer von zwei Reaktionstypen zur Ausbildung der Mikrokapseln in wäßrigen Medien eingesetzt werden. Diese sind Säure-Base-Reaktionen und Salzaustauschreaktionen.

#### Säure-Base-Reaktion:

[00668] Mehrere wasserlösliche saure Polymere reagieren in wäßriger Lösung mit wasserlöslichen Mono- oder Oligo-Aminen mit niedrigem Molekulargewicht unter Ausbildung schlecht wasserlöslicher Salze, welche präzipitieren können. Die Gruppe wasserlöslicher saurer Polymere, welche an dieser Reaktion teilnehmen, umfaßt Arabinsäure, Zelloulosesulfat, Chondroitinsulfat, Heparin und fluoreszierende Derivate der oben genannten sauren Polymere. Die Gruppe von Aminen, welche in dieser Reaktion schlecht wasserlösliche Salze liefern, umfaßt Decylamin, Dodecylamin, Ethylendiamin, Hexadecylamin, Methylenblau, Octadecylamin, Piperazin, Spermin, Tetradecylamin, Triethylamin und Triethylentetramin.

#### Salzaustauschreaktion:

[00669] Eine ähnliche Reaktion findet unter Ausbildung von schlecht wasserlöslichen Salzen statt, wenn die oben beschriebenen sauren Polymere oder bestimmte relativ schlecht wasserlösliche saure Polymere als Lösungen ihrer entsprechenden neutralen Salze (z. B. mit Natrium- oder Ammonium-Ion) eingesetzt und die oben beschriebenen Amine als ihre wasserlöslichen Salze (z. B. Hydrochlorid, Acetat) gelöst werden. Die ähnliche Reaktion kann als Salzaustauschreaktion angesehen werden, bei der eines der Produkte (z. B. Natriumchlorid oder Natriumacetat) löslich und das Amin-Polymer-Salz schlecht löslich ist. Die Gruppe saurer Polymere, die als ihre wasserlöslichen Salze in der Salzaustauschreaktion geeignet sind, umfaßt diejenigen Polymere, die oben genannt sind, und auch die nachfolgenden sauren Polymere in der Form ihrer Natrium- oder anderen wasserlöslichen Salze: Alginsäure und fluoreszierende Derivate, z. B. Fluorescein-Isothiocyanat und Rhodamin-Isothiocyanat, Derivate von Algin- oder anderen Säuren, Carboxymethylzelloulose, Eudragit L-100® (mit Polyoxyethylen vernetzte Polyacrylsäure), Polyacrylsäure, Polyvinylacrylsäure und fluoreszierende Derivate dieser Polymere. Aus dieser größeren Gruppe saurer Polymere reagieren alle als ihr Natrium- oder anderes wasserlösliches Salz mit wenigstens einem Mitglied der Gruppe von Aminen in der Form von deren Hydrochlorid- oder Acetatsalzen unter Bildung schlecht wasserlöslicher Amin-Polymer-Salze in der Salzaustauschreaktion. Jedoch bilden nicht alle Kombinationen, die schlecht lösliche Salze ausbilden, Mikrokapseln gemäß dieser Erfindung. Siehe den nachfolgend beschriebenen Test und vgl. Tabellen 1 und 2 unten.

[0070] Wie sie hierin verwendet werden, sollen die Begriffe "anionisches Polymer", "Polymerstrang" und "anionische Polymerlösung" Polymere bezeichnen, die an der Bildung des Amin-Polymer-Salzes teilnehmen. Hinweisen auf gleichzeitig gebildete wasserlösliche Produkte der Austauschreaktion (z. B. Natriumchlorid oder Natriumacetat) werden hierin nicht ausdrücklich erwähnt, es sei denn, es besteht eine spezielle Notwendigkeit,

auf diese wasserlöslichen Produkte hinzuweisen.

[0071] Somit besteht die Gruppe von anionischen Polymeren, die gemäß dieser Erfindung als mikrokapselbildende Mittel verwendet werden können, aus polymeren Substanzen mit saurer funktionaler Carboxylatgruppe (Alginsäure, Arabinsäure, Carboxymethylzellulose, Eudragit L-100, Polyacrylsäure und Polyvinylcarbonsäure), sauren Sulfatgruppen (Carrageenane, Zellulosesulfat, Chondroitinsulfat, Heparin), linearen oder verzweigten Polyalkylenhauptketten (Polyacrylsäure, Polyvinylcarbonsäure), linearen Kohlenwasserstoffhauptketten (Alginsäure, Zellulosesulfat, Chondroitinsulfat, Heparin) und verzweigten Kohlenwasserstoffhauptketten (Arabinsäure).

[0072] In den Mikrokapseln der vorliegenden Erfindung stellt das anionische Polymer den Hauptstrukturbestandteil der Mikrokapselwände dar. Typischerweise wird das Polymer so ausgewählt, daß es einen gewünschten Bereich der Beabstandung zwischen am nächsten benachbarten anionischen Gruppen liefert. Somit nähern sich die interanionischen Abstände in ihren erweiterten Formen oberhalb der Theta-Temperaturen der Polymere dem Äquivalent von 2 Methylengruppen in Polyacrylsäure, 6 in Alginsäure, Zellulosesulfat, Chondroitinsulfat und Heparin, 10 in Carboxymethylzellulose und zwischen 20 und 30 in hochverzweigter Arabinsäure. Dies ermöglicht es einem, selektiv Kapselwände mit verschiedenen Porositäten herzustellen. Siehe T. J. Speaker und L. Lesko, US-Patent Nr. 3,959,457, Microparticulate material and method of making such material, 25. Mai 1976, Spalte 5, Zeilen 6–20.

[0073] Weil all die in der vorliegenden Erfindung verwendeten anionischen Polymere durchschnittliche Molekulargewichte weit oberhalb von 10 kDa haben, sind sie multivalent und können mit den Aminen in einem breiten Bereich von Stöchiometrien reagieren. In der Praxis wurde gefunden, daß der bevorzugte Stöchiometriebereich von Amin zur Wiederholungseinheit des anionischen Polymers etwa 0,2 bis etwa 0,6 beträgt. Mit anderen Worten, es stehen etwa 2 bis 6 Aminmoleküle für eine Kombination mit jeweils 10 anionischen Gruppen des Polymers zur Ausbildung von Salzen des Polymers zur Verfügung. Darüber hinaus können, weil mehrere der Amine auch multivalent sind, die reagierenden Spezies theoretisch komplexe Netzwerke ausbilden, in welchen die Amine zur Vernetzung anionischen Polymerstränge dienen. Die Präzipitate, welche sich im wesentlichen unmittelbar ausbilden, wenn Lösungen von anionischen Polymeren und Aminen miteinander verrührt werden, sind häufig amorph, kohäsiv, adhäsiv und oft filamentös. Jedoch liefern nicht alle Kombinationen von anionischem Polymer und Amin schlecht lösliches Amin-Polymer-Salz. Nachfolgende Tabelle 1 listet zwei Gruppen von reaktiven Spezies auf, die bis heute getestet wurden, und zeigt die Kombinationen, mit welchen die Anmeldungen bei der Ausbildung von Präzipitaten erfolgreich waren, wenn diese Kombinationen reagieren gelassen wurden. Die anionischen Polymere und Amine sind in der Reihenfolge aufsteigender ungefährender Äquivalentgewichte (angegeben in Klammern) der Amine und der Polymerwiederholungseinheiten aufgeführt.

Tabelle 1  
Amin-/Polymer-Kombinationen, welche unlösliche Salze ausbilden

		<u>Anionische Polymere</u>									
		p-Acrylsäure (74)									
		p-Vinylcarbonsäure (86)									
		Alginsäure (176)									
		Eudragit L-100 (185)									
		Zellulosesulfat (260)									
		Carboxymethylzellulose (295)									
		Heparin (480)									
		Chondroitinsulfat (480)									
		Zelluloseacetatphthalat (563)									
		Arabinsäure (1000)									
<u>Amine</u>											
Ethylendiamin	(30)	+	+	0	0	+	0	0	0	+	0
Triethylentetramin	(37)	+	+	+	0	+	0	+	0	+	0
Piperazin	(43)	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0
Spermin	(51)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
Arginin	(87)	0	+	0	0	0	0	0	0	+	0
Triethylamin	(95)	0	+	0	0	0	0	0	0	+	0
Decylamin	(156)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dodecylamin	(170)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tetradecylamin	(184)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Methylenblau	(187)	0	+	+	0	+	0	0	0	+	0
Hexadecylamin	(198)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Octadecylamin	(212)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Ein Pluszeichen (+) bedeutet  
Bildung eines Präzipitats, wenn  
die Reaktanten kombiniert wer-  
den, eine Null (0) bedeutet, daß  
sich kein Präzipitat bildet.

[0074] Obwohl der Großteil der Kombinationen von anionischem Polymer und Amin unter Bildung eines schlecht wasserlöslichen Amin-Polymer-Salzes reagieren wird, scheint nur eine kleinere Untergruppe davon in der Lage zu sein, Mikrokapseln auszubilden, wenigstens unter den bislang getesteten Bedingungen. Daher liefert die einfache Fähigkeit zur Ausbildung eines wasserunlöslichen Amin-Polymer-Salzes selbst noch keine definitive Identifizierung von mikrokapselwandbildenden Bestandteilen, wenigstens unter den bislang getesteten Bedingungen.

[0075] Zur Bestimmung, ob ein ausgewähltes Amin-/Polymer-Paar Kapseln und Mikrokapseln ausbilden wird, ist das folgende Verfahren geeignet. Man stelle getrennte wäßrige Lösungen von dem Amin und dem Polymer, welche etwa 1% w/v der Säureform des Polymers und eine näherungsweise stöchiometrisch äquivalente Menge an Amin enthalten, in gleichen Volumina Wasser her. Alternativ, wenn das Polymer oder das Amin nicht in solch einem Ausmaß löslich sind, stelle man Lösungen von wasserlöslichen Salzen des Amins (z. B. Hydrochlorid oder Acetat) und des Polymers (z. B.

[0076] Natrium oder Ammonium) her. Zu einem Volumen von näherungsweise 5 ml der Aminlösung füge man sukzessive Volumina von 20–25 µl der Polymerlösung hinzu, wobei man die Polymerlösung tropfenweise aus einer Höhe von etwa 1 cm zuführt. Man beobachtet visuell die zwei Lösungen, während die eine zu der anderen hinzugefügt wird. Man beachte, ob sich die Tröpfchen der Polymerlösung mit der Aminlösung vereinigen und das System homogen wird oder ob sich um die Polymerlösungströpfchen herum ein Häutchen bildet und sie als physikalisch verschiedene und mechanisch getrennte Einheiten hält.

[0077] Wenn die zugefügten Tröpfchen solch ein Häutchen ausbilden und sich nicht mit der Aminlösung unter Herstellung einer homogenen Lösung mischen, ist es wahrscheinlich, daß das Reaktantenpaar zur Herstellung von Mikrokapseln verwendet werden kann. Um diese Wahrscheinlichkeit näher zu untersuchen, ist es notwendig, das Experiment unter Verwendung von Polymertröpfchen und Aminlösungen, die über einen Bereich von

Konzentrationen hergestellt wurden, zu wiederholen, um optimale Reaktantenkonzentrationen zu ermitteln.

[0078] Wenn entweder das Amin oder die Säureform des Polymers zur Durchführung des Tests, wie er oben beschrieben ist, ungenügend löslich sind, können an deren Stelle die Salzformen des Reaktantenpaares gemeinsam verwendet werden.

[0079] Tabelle 2 zeigt, welche Amin-Polymer-Salze unter den bislang getesteten Bedingungen wirksam stabile Mikrokapseln gebildet haben.

Tabelle 2  
Amin-/Polymer-Kombinationen, welche stabile Mikrokapseln bilden

		<u>Anionische Polymere</u>									
		<p>p-Acrylsäure (74)</p> <p>p-Vinylcarbonsäure (86)</p> <p>Alginsäure (176)</p> <p>Eudragit L-100 (185)</p> <p>Zellulosesulfat (260)</p> <p>Carboxymethylzellulose (295)</p> <p>Heparin (480)</p> <p>Chondroitinsulfat (480)</p> <p>Zelluloseacetatphthalat (563)</p> <p>Arabinsäure (1000)</p>									
<u>Amine</u>											
Ethylendiamin	(30)	+	+	0	0	+	0	0	0	0	0
Triethyltetramin	(37)	+	+	+	0	+	0	0	0	0	0
Piperazin	(43)	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0
Spermin	(51)	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
Arginin	(87)	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0
Ein Pluszeichen (+) bedeutet											
Bildung eines Präzipitats, wenn											
die Reaktanten kombiniert wer-											
den, eine Null (0) bedeutet, daß											
Triethylamin	(95)	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0
Decylamin	(156)	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+
Dodecylamin	(170)	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+
Tetradecylamin	(184)	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+
Methylenblau	(187)	0	+	+	0	+	0	0	0	0	0
Hexadecylamin	(198)	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+
Octadecylamin	(212)	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+
sich kein Präzipitat bildet.											

[0080] Die Fähigkeit einer Kombination von wäßrigen Lösungen von Amin und Polymer zur Bildung einer stabilen Mikrokapselkonfiguration erfordert zuerst, daß die Reaktanten wasserlöslich und entgegengesetzt geladen sind, damit sie unter Bildung eines schlecht löslichen Salzes kombiniert werden können. Es ist wichtig, daß die anionischen Polymerstränge in Lösung nicht schnell diffundieren dürfen, verglichen mit der Fähigkeit der Aminmoleküle (Ionen) zu diffundieren. Weiterhin ist es bevorzugt, wenn die Tröpfchen der anionischen Polymerlösung in solch einer Art und Weise in die Aminlösung eingebracht werden, daß die Polymertröpfchen nicht übermäßig gestört oder sehr schnell mit der Hauptmasse der Aminlösung gemischt werden. Diese verschiedenen Erfordernisse sind relativ leicht zu erfüllen. Die Grundlagen für diese Erfordernisse können anhand der Stufen in dem nachfolgend ausführlicher beschriebenen Verfahren verstanden werden.

[0081] Am Anfang des Mikrokapselherstellungsverfahrens sind die wäßrigen Lösungen von anionischem Polymer und dem Amin mechanisch (d. h. physikalisch) getrennte Phasen. Bei Raumtemperatur erwartet man, daß die Wassermoleküle der anionischen Polymerlösung hohe (0,9+) thermodynamische Aktivitätskoeffizienten (ausschließlich des Beitrags von Wasser) haben und viel schneller diffundieren als die Polymermoleküle. Die Polymerstränge (Molekulargewichte über 10 kDa, 100.000 amu) haben kolloidale Größe, und man kann

erwarten, daß sie sich wie andere kolloidale Partikel verhalten. Insbesondere erwartet man, daß eine kolloidale Lösung von anionischem Polymer zu struktureller Inhomogenität mit Entwicklung von Mikrobereichen von relativ hoher Konzentration von kolloidalem Polymer und anderem ohne Polymer neigen wird. Dieses Verhalten von kolloidalen Polymeren wurde kürzlich von Ito et al. (1994) Science, 263: 66–68 mittels Zeitraster-Konfokallaser-Mikrophotographie gezeigt. Die Mikrophotographien zeigen diese Tendenz in Richtung einer Struktur von Inhomogenität und leeren Stellen. Ito et al. diskutieren dieses Verhalten in Bezug auf ionische Polymere, wie solche, die in dieser Erfindung verwendet werden (z. B. Natriumpolyacrylat). Im Gegensatz dazu sind Aminreaktanten (Molekulargewichte unter 400) thermodynamisch viel aktiver als die anionischen Polymerstränge, diffundieren viel schneller als die Polymerstränge (aber langsamer als Wassermoleküle) und werden als in ihren Lösungen homogen verteilt verstanden.

[0082] Wenn ein Tröpfchen von anionischer Polymerlösung in ein großes Volumen Aminlösung eingebracht wird, erwartet man, daß sich die zuvor getrennten wäßrigen Phasen im wesentlichen sofort unter Ausbildung einer einzelnen zusammenhängenden wäßrigen Phase ohne erkennbare Phasengrenze für die zuvor getrennten wäßrigen Komponenten verbinden werden. Andererseits begrenzen die niedrigen Diffusionskoeffizienten der anionischen Polymere (typischerweise kleiner als  $7 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sek}$  für kolloidale Polymere im Massenbereich nahe 10 kDa) die Bewegung von Polymermolekülen aus ihren anfänglichen Positionen relativ zu dem restlichen Polymerlösungstropfen und geben einer Vielzahl von Aminmolekülen (Ionen), die sich nahezu so schnell wie Wassermoleküle bewegen, Zeit, in die Nähe der Polymere zu kommen, elektrostatisch zu diesen hingezogen zu werden und Salze mit anionischen Gruppen der Polymere auszubilden. Somit erlaubt die relative Immobilität der Polymermoleküle während der Reaktion mit einer Vielzahl von Amineinheiten eine Präzipitation einer Schale, die den ungefähren anfänglichen Positionen der Polymerstränge entspricht und die Form des Tröpfchens behält.

[0083] Die Entwicklung dieser Schale um ein Tröpfchen kann durch vorsichtige Zugabe eines etwa kugelförmigen Tröpfchens von etwa 20 µl aus wäßriger 1% w/v Natriumcarboxymethylzelluloselösung zu einer etwa 1% w/v wäßrigen Lösung von Decylaminhydrochlorid einfach makroskopisch beobachtet werden. In einem geringen Bruchteil einer Sekunde bildet sich ein kaum sichtbares kugelförmiges Häutchen um das zugegebene Tröpfchen, und während einiger weiterer Sekunden wird das Häutchen zunehmend dicker und mehr opaleszent. Die erhaltene Mikrokapsel kann mit einer Pasteur-Pipette abgenommen oder auf einem feinen Geflecht gesammelt werden. Es sollte bemerkt werden, daß, wenn solch ein Polymertröpfchen aus einer Höhe von mehreren Zentimetern der Aminlösung zugeführt wird, es sehr wahrscheinlich ist, daß das Tröpfchen unter Ausbildung eines abgeflachten Sphäroids oder einer bikonkaven scheibenähnlichen Struktur verzerrt wird, welche in ähnlicher Weise stufenweise dicker wird und eine zunehmend opaleszente Schale erhält. Wenn die Aminlösung gerührt wird oder schnell strömt, neigen zugegebene Tröpfchen zur Ausbildung länglicher Sphäroide oder filamentöser Partikel, welche in ähnlicher Weise dicker werden. Wenn die Tröpfchen von Polymerlösung kleiner sind, können sie aus größeren Höhen auf oder in die Aminlösung oder auf/in strömende Aminlösung mit geringerer Verzerrung dispergiert werden. In der Praxis können Tröpfchen mit einem Durchmesser von etwa 5–7 µm aus einer Höhe von 5 cm auf die Oberfläche einer Aminlösung, die mit linearer Geschwindigkeit von etwa 1 cm/sek strömt, aufgebracht werden und erzeugen noch immer im wesentlichen kugelförmige Mikrokapseln.

[0084] Obwohl es vielleicht zu einfach ist, den Prozeß, durch welchen sich Häutchen, die Polymertröpfchen umgeben, ausbilden und verdicken, zur Herstellung von Mikrokapseln nur im Hinblick auf Diffusionsprozesse zu beschreiben, vermittelt solch eine Beschreibung ein ziemlich genaues Verständnis davon, was stattfindet. Ein ausführlicheres Verständnis kann man durch die Beschreibung des Mechanismus und der Dynamik von Ionentransport durch eine Flüssig-Flüssig-Grenzfläche erhalten. I. Benjamin (Science 261: 1558–1560, 1993) hat gezeigt, daß, obwohl die Wasser-Dichlorethan-Grenzfläche im Zeitmittel über kurze Zeitintervalle "molekular scharf" ist, thermische Fluktuationen die Bildung von kapillaren Verzahnungen jeder flüssigen Phase mit der anderen induzieren. Diese kapillaren "Finger" erlauben einen Ionentransfer von einer Phase zu einer anderen, obwohl die Hauptmassephasen deutlich getrennt sind. Es ist zu erwarten, daß ähnliche kapillare Intrusionen eines aminhaltigen Teils der wäßrigen Phase in eine polymerhaltige wäßrige Phase in ähnlicher Weise einen Mechanismus liefern könnten, durch welchen die Ionen des Amin-Polymer-Salzes unter Entwicklung eines Films oder Häutchens in Wechselwirkung kommen könnten, ohne die Integrität des Polymertröpfchens in hohem Maße zu stören.

[0085] In der Wirkung hängt dann die Fähigkeit der Reaktantenlösungen zur Bildung diskreter Mikrokapseln wenigstens zum Teil von der relativen Immobilität der Polymerstränge in wäßrigen Medien und der im Verhältnis dazu viel größeren Mobilität der Aminmoleküle (Ionen) und vielleicht auch teilweise von der kurzen thermisch induzierten Fluktuation der auftretenden Grenzfläche zwischen Amin- und Polymerlösungen ab. Es erfordert keine hochviskosen Lösungen, sondern vielmehr eine Spezies eines langsam diffundierenden Reaktanten. Diese Interpretation des Mechanismus der Mikrokapselbildung steht ziemlich im Widerspruch zu den Beschränkungen der Mikrokapselbildung in anderen vollständig wäßrigen Verkapselungssystemen.

[0086] Die Reaktion, die zur Bildung von Amin-Polymer-Salz-Präzipitaten führt, kann als ein einfacher Sal-

zaustausch betrachtet werden und besitzt als solcher die Charakteristiken einer reversiblen Reaktion. Daß dies so ist, läßt sich durch Zugabe eines Überschusses des löslichen Salzes, das in der Reaktion gebildet wird, oder einer konzentrierten Lösung von diesem (z. B. Natriumchlorid oder Natriumacetat) zu einer Suspension von Mikrokapseln demonstrieren. Erhöhung der Konzentration an Natriumchlorid in dem wäßrigen Medium, welches eine Population von Mikrokapseln umgibt, auf etwa 4% w/v führt im allgemeinen zu deren schnellen Auflösung. Jedoch kann eine Behandlung mit Natriumchlorid oder einem anderen Elektrolyten, der in der Lage ist, lösliches Polymer und Aminsalze zu liefern (z. B. Natriumphosphat zur Herstellung einer 4% w/v Lösung), Mikrokapseln, die mit sehr schlecht löslichen Aminen (z. B. Hexadecylamin, Octadecylamin) hergestellt sind, nicht vollständig zerstören, und zur Zerstörung solcher Mikrokapseln, z. B. zu analytischen Zwecken, ist es geeignet, ein Lösungsmittel zuzufügen, das in der Lage ist, die wäßrige Konzentration von Amin zu vermindern (z. B. Cyclohexan).

[0087] Ein derzeit bevorzugtes Verfahren zur Ausbildung der Mikrokapseln der Erfindung besteht darin, eine akustische tröpfchenbildende Vorrichtung zu verwenden, die für diesen Zweck entwickelt wurde.

[0088] Diese Vorrichtung produziert einen Strom gleichmäßiger feiner Tröpfchen aus anionischer Polymerlösung und richtet sie auf und durch eine konstant erneuerte Oberfläche der kationischen Reaktantenlösung, so daß neu ankommende Tröpfchen nicht auf früher ausgelieferte Tröpfchen auftreffen. Die Vorrichtung (1) reduziert dabei die Neigung zur Bildung von Mikrokapselagglomeraten und (2) stellt ein Mittel zur Herstellung großer Populationen von Mikrokapseln mit sehr engem Größenverteilungsbereich bereit. Die Maschine arbeitet durch Schallpulsieren eines abwärts fließenden vertikalen Stroms von Polymerlösung unmittelbar bevor er aus einer engen Öffnung austritt, so daß die Schallwelle, die sich im Flüssigkeitsstrom ausbreitet, eine Reihe von Einschnürungen in dem Strom auslöst, was dann unter dem Einfluß der Oberflächenspannung der Flüssigkeit bewirkt, daß der Strom zu einer Spur gleichmäßiger Tröpfchen unterbrochen wird. Die Tröpfchenspur wird koaxial in ein enges zylindrisches Röhrchen gelenkt, welchem durch eine Seitenöffnung (oder deren topologische Entsprechung) ein kontinuierlicher Fluß des kationischen Reaktanten zugeführt wird. Somit trifft jedes neu ankommende Polymertröpfchen eine frische Oberfläche von kationischem Reaktanten und hat eine minimale Chance, ein anderes Polymertröpfchen zu treffen und sich damit zu verbinden, bevor es beginnt, seine eigene Kapselwand auszubilden, und das untere Ende des Röhrchens verläßt.

[0089] Die Hauptbestandteile der akustischen Vorrichtung zur Herstellung von Mikrokapseln können möglicherweise am besten unter Bezugnahme auf ihre funktionale Abfolge, mit der sie zwei Flüssigkeitsströme unter Ausbildung von Mikrokapseln zusammenbringen, beschrieben werden. In dieser Vorrichtung werden wäßrige Lösungen von anionischem Polymer und Amin in getrennten Reservoirs gelagert und durch getrennte Überführungsleitungen gepumpt. Die Aminlösung wird dem Schaft eines modifizierten T-Röhrchens, welches als das primäre Reaktionsgefäß dient, zugeführt und tritt in dieses ein. Das T-Röhrchen ist so montiert, daß die zylindrische Achse des Balkens des T vertikal ausgerichtet ist. Aminlösung, welche in den Schaft des T-Röhrchens eintritt, fließt für wenige Millimeter horizontal, bevor sie mittels Schwerkraft aus der unteren Hälfte des T-Röhrchenbalkens ausfließt. (In der Praxis war es geeignet, nicht ein einfaches T-Röhrchen zu verwenden, sondern vielmehr eines von der Art, die man in klinisch-chemischen Laboratorien häufig als ein "Kaktus-Röhrchen" bezeichnet. Ein Kaktus-Röhrchen hat die allgemeine Form des Kleinbuchstabens h, und in dieser Anwendung wird das Röhrchen so positioniert, daß die h-Form auf dem Kopf steht. Der gerade Teil des Kaktus-Röhrchens ist etwa 2 cm lang und hat einen inneren Durchmesser von etwa 2 mm.) Aminlösung, die aus dem T-Röhrchen fließt, kann in das Reservoir zurückgeführt und rezirkuliert werden.

[0090] Die Polymerlösung wird durch einen Membranfilter (mit einer Zurückhaltung von 8 µm oder feiner) und dann durch eine Glaskapillare, deren distales Ende auf einen nominalen Durchmesser von 20–25 µm verengt ist, gepumpt und tritt in der Form eines feinen kontinuierlichen Flüssigkeitsstrahls aus. (Die verengte Kapillare wird einfach aus einem Kapillarröhrchen mit einem Volumen von 25, 50 oder 100 µl von einem Typ, der allgemein von Laborausrüstungshäusern erhältlich ist, z. B. A. H. Thomas Co., gefertigt. Die Verengung ist vorzugsweise so, daß der Strahl von Polymerlösung mit einer Geschwindigkeit im Bereich zwischen 4 und 5 m/sek austritt, wenn die Polymerlösung mit 1–2 ml/min gepumpt wird, aber es können natürlich auch Fließraten und Geschwindigkeit außerhalb dieser Bereiche verwendet werden.)

[0091] Die Kapillare wird in einer flachen, V-förmigen Furche in einem Metallblock angeordnet und mittels Kompressionsfedern fest an dem axial vibrierenden Ende eines akustischen Überträgers gehalten (z. B. einer Laborultraschallsonde, die mit einem nominalen Energieausstoß von 40 W betrieben wird), so daß akustische Energie durch die Wand der Kapillare zu der fließenden Polymerlösung übertragen wird, was bewirkt, daß der Strahl von Polymerlösung in eine Spur von Tröpfchen mit gleichmäßiger Größe unterbrochen wird.

[0092] Der Aufbau aus Überträger, Kapillare und Kompressionsblock wird so positioniert, daß die austretende Spur von Polymerlösungströpfchen für etwa 3 cm durch Luft hindurchtritt und axial in das obere Ende des T-Röhrchenbalkens gelenkt wird, so daß sie auf die Aminlösung auftrifft, die von der Seite (dem Schaft) des T-Röhrchens eintritt. Die Polymerlösungströpfchen reagieren mit der Aminlösung unter Bildung von Mikrokapseln, die mit der Aminlösung aus dem unteren Ende des T-Röhrchenbalkens herausfließen.

[0093] Auch in der Abwesenheit von Schallstimulation würde der Strahl von Polymerlösung, welcher aus der



Kapillarverengung austritt, wie es oben beschrieben ist, normalerweise spontan in eine Spur von Tröpfchen mit variierender Größe als ein Ergebnis variierender natürlicher Instabilitäten des Flüssigkeitsstroms und der Atmosphäre, in welche der Strahl austritt, der sogenannten Rayleigh-Unterbrechung eines Flüssigkeitsstrahls, zerbrechen. Es ist jedoch erwünscht, daß Tröpfchen mit gleichmäßiger Größe produziert werden, um Mikrokapseln mit gleichmäßiger Größe herzustellen. Dies hat den Grund, daß gemäß der bevorzugten Ausführungsform dieser Erfindung Tröpfchen mit gleichmäßiger Größe durch periodische Schallunterbrechung des Flüssigkeitsstroms zur Initiierung einer Spur von ausreichend starken Kompressions-(Schall-)Wellen entlang der Achse des Strahls produziert werden. Die Spur von Schallwellen bewegt sich viel schneller als die Flüssigkeit selbst durch das flüssige Medium und weg von der Öffnung. (Der Strahl tritt mit einer Geschwindigkeit von 4–5 m/sek aus.) Die Ausdehnung der Wellenspur entlang der Länge des Strahls bildet ein Interferenzmuster mit zunehmend konstruktiver Amplitude an aufeinanderfolgenden Knoten entlang des Weges des Strahls. In einem gewissen Abstand von der Öffnung wird die Amplitude der Oberflächenwelle größer als die Oberflächenspannung der Flüssigkeit, und es bilden sich Tröpfchen von Polymerlösung bei der Sonikatorfrequenz. Die Erzeugung einer Spur von Tröpfchen mit gleichmäßiger Größe auf diese Art und Weise wird in gewisser Ausführlichkeit von P. J. Galley und G. M. Hieftje, *Applied Spectroscopy* 45: 1460–1463 (1992) beschrieben.

[0094] Zur Erläuterung des vorgenannten Verfahrens und der Vorrichtung wird auf die anhängende **Fig. 1** Bezug genommen, in welcher ein "h"-förmiges, rohrförmiges Teil **10** gezeigt ist, welches einen Seitenarmeintrittsabschnitt **14** und einen vertikalen kreuzenden Abschnitt **12** aufweist, durch welches die Aminlösung **16** an dem unteren Ende des Röhrchenabschnitts **14** nach unten gepumpt wird, so daß sie in den aufrechten Abschnitt **12** eintritt und an der Kreuzung des Abschnitts **14** und des Abschnitts **12** in einen abwärts fließenden Anteil umgelenkt wird, aus welchem sie am unteren Ende des röhrenförmigen Abschnitts **12** austritt. Über der Kreuzung der Abschnitte **14** und **12** wird die Polymerlösung **22** durch ein Kapillarteil **18** eingebracht, dessen Ende in einem vorherbestimmten Abstand (etwa 3 cm in der beispielhaften Beschreibung oben) über der Kreuzung der Abschnitte **14** und **12**, bei welcher der Fluß der Aminlösung nach unten umgeleitet wird, beabstandet, so daß tropfenweise aufgebrachte Anteile von Polymerlösung **22** an diesem Punkt mit der abwärts fließenden Aminlösung zusammengeführt werden.

[0095] Wie es oben beschrieben ist, wird das Kapillarröhrchen **18** zur Verstärkung der Gleichmäßigkeit der tropfenweise abwärts fließenden Anteile **22** von Polymerlösung in einem Metallblock **24** mit einem als V-Furche ausgebildeten Halteschlitz (in der Figur nicht gezeigt) fest gehalten und intermittierend akustisch stimuliert. Zu diesem Zweck ist eine akustische Sonde **20** in Kontakt mit dem Kapillarröhrchen **18** nahe dem unteren Ende davon.

[0096] Man kann die Anzahl einzelner Tröpfchen, die pro Zeiteinheit produziert werden, aus der Frequenz des Sonikators abschätzen. In den meisten Fällen wurde ein Sonikator mit einer Frequenz von 20 kHz verwendet. Die Schätzung der Anzahl abgebildeter Tröpfchen kann aufgrund von Umständen, in welchen aufeinanderfolgende Tröpfchen aufeinander auftreffen und sich vereinigen oder aneinander unter Ausbildung aggregierter Mikrokapseln haften, leicht fehlerhaft sein. In der Praxis treten viel weniger als 1% der Tröpfchen in fusionierten oder vereinigten Formen auf. Nimmt man an, daß alle Tröpfchen getrennt ausgebildet werden, kann man die Größe einzelner Tröpfchen aus einer Kenntnis der Polymerflußrate berechnen. Bei einer nominalen Flußrate von anionischem Polymer von 1 ml/min beträgt das Volumen einzelner Tröpfchen 0,05 µl (Kubikmillimeter), was einem Durchmesser eines kugelförmigen Tröpfchens von 4,57 µm entspricht. Der Durchmesser von Mikrokapseln, die bei Flußraten nahe 1 ml/min und akustischen Frequenzen von 20 kHz gebildet werden, beträgt etwa 5 µm, geschätzt anhand von Volumen-Durchmesser-Größenabschätzung (Coulter-Prinzip).

[0097] Alternativ können Tröpfchen der Polymerlösung von im wesentlichen jeder Größe in die kationische Reaktantenlösung (z. B. durch Sprühen oder durch tropfenweise Abgabe aus einer Pipette) zur Ausbildung von Mikrokapseln eingebracht werden. In vielen Anwendungen ist es wünschenswert, daß die gebildeten Mikrokapseln hochgradig gleichmäßige Größe besitzen, und daher ist ein Mittel zur Einbringung dieser Gleichmäßigkeit, wie das oben beschriebene akustische Verfahren, bevorzugt. Solche Anwendungen umfassen die Auslieferung an die lymphatischen Gewebe des Darms, häufig bezeichnet als Peyers-Haufen. Die M-Zellen von Peyers-Haufen weisen präferentiell Partikel größer als etwa 10 µm zurück, nehmen aber Partikel im Größenbereich unter etwa 10 µm auf und überführen sie zu anderen lymphatischen Zellen.

[0098] Im allgemeinen können die Mikrokapseln der vorliegenden Erfindung eine Größe im Bereich von 0,1–2.000 µm haben. Ein bevorzugter Größenbereich, der zur allgemeinen oralen Verabreichung geeignet ist, beträgt von 500–1.000 µm. In einigen Ausführungsformen beträgt der Bereich von 100–200 µm. In anderen Ausführungsformen, wie bei der Verabreichung von Substanzen, die für eine Auslieferung an Peyers-Haufen im lymphatischen Gewebe des Darms vorgesehen sind, beträgt ein besonders bevorzugter Größenbereich von 1–10 µm.

[0099] Abhängig zum Teil vom Ausmaß, mit dem Herstellungsflüssigkeit entfernt wird, und zum Teil von der im Kern gelösten Substanz, können die Mikrokapseln mit wäßrigem Kern als eine frei fließende Suspension, ein zähflüssig fließendes Konzentrat, ein Brei, eine bröckelige Flocke oder, bei weiterer Behandlung, als ein trockener Kuchen gesammelt werden. Lyophilisierung ist besonders erwünscht zur Bereitstellung stabiler Mi-

krokapseln mit hoch wasserlöslichen Kernmaterialien.

[0100] Wenn sie einmal verkapselt sind, sind Kernmaterialien, wie Rotavirus, vor der Umgebung geschützt, aber sie können aus den Mikrokapseln durch Suspendieren der Kapseln in einem wäßrigen Medium, in welches die Kernmaterialien durch die semipermeablen Mikrokapselwände aktiv diffundieren können, langsam freigesetzt werden. Wenn die Art der wandbildenden Reaktanten konstant gehalten wird, beobachtet man im allgemeinen, daß hoch wasserlösliche Kernmaterialien schneller freigesetzt werden als schlecht wasserlösliche Kernmaterialien, und im allgemeinen werden Stoffe mit niedrigerem Molekulargewicht schneller freigesetzt als solche mit höherem Molekulargewicht. In einigen Ausführungsformen ist eine Umwandlung der Mikrokapsel in Trockenkuchen und Resuspendierung in wäßrigen Medien bevorzugt.

[0101] Impfstoffe gemäß der Erfindung umfassen wenigstens eine mikroverkapselte immunogene Zusammensetzung, z. B. Rotavirus, und einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder ein Verdünnungsmittel. Optional kann der Impfstoff zusätzlich Komponenten umfassen, einschließlich mikroverkapselter und nicht mikroverkapselter immunogener Zusammensetzungen und/oder Hilfsstoffe.

[0102] Impfstoffe der vorliegenden Erfindung können nach anerkannter Konvention unter Verwendung von Puffern, Stabilisierungsmitteln, Konservierungsmitteln, Lösungsverbesserern und Zusammensetzungen, die zur Erleichterung einer andauernden Freisetzung verwendet werden, formuliert werden. Allgemein können Zusätze für die Isotonizität Natriumchlorid, Dextrose, Mannitol, Sorbitol und Lactose umfassen. Stabilisierungsmittel umfassen Gelatine und Albumin. Hilfsstoffe können verwendet werden. Beispiele für Hilfsstoffe umfassen RIBI (Ribi Inc.), Alum, Freund's Complete, Freund's Incomplete, Block-Copolymer (CytRx, Atlanta, GA), QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge, MA) und SAF-M (Chiron, Emeryville, CA). Impfstoffe können in Lösung gehalten werden oder in einigen Fällen, insbesondere rekombinante Impfstoffe, lyophilisiert sein. Lyophilisierter Impfstoff kann bequem gelagert und vor einer Verabreichung mit steriler Lösung vereinigt werden.

[0103] Die Menge an verabreichter immunogener Zusammensetzung hängt von solchen Faktoren ab, wie der Art der immunogenen Zusammensetzung, der Spezies, dem Alter, dem Gewicht und allgemeinen physischen Charakteristiken des zu immunisierenden Tieres und von der Zusammensetzung des Impfstoffs. Eine Bestimmung der optimalen Dosierung für jeden Parameter kann nach Routinemethoden durchgeführt werden. Gemäß einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung enthalten Impfstoffe im allgemeinen zwischen 0,05–1.500 µg immunogene Zusammensetzung pro ml steriler Lösung, vorzugsweise 10–1.000 µg. Es werden etwa 0,5–2 ml proteinhaltige Lösung verabreicht. Die Menge an verabreichtem infektiösem Mittel hängt von solchen Faktoren ab, wie dem Ausmaß an erwünschter Infektivität, der Spezies, dem Alter, dem Gewicht und allgemeinen physischen Charakteristiken des Tieres, das immunisiert wird, und von der Zusammensetzung des Impfstoffs. Eine Bestimmung der optimalen Dosis für jeden Parameter kann nach Routinemethoden durchgeführt werden.

[0104] Impfstoffe gemäß der Erfindung können auf einem geeigneten Weg verabreicht werden, wie z. B. durch orale, intranasale, intramuskuläre, intraperitoneale oder subkutane Verabreichung. In einigen Ausführungsformen ist eine orale Verabreichung bevorzugt. Nach einer anfänglichen Immunisierung kann die Impfung beim Säuger durch erneute Immunisierung verstärkt werden.

[0105] Die Eignung der Mikrokapseln der Erfindung zur Auslieferung verschiedener aktiver Mittel wird in den folgenden Beispielen demonstriert.

### Beispiel 1

#### Placebo-Mikrokapseln

[0106] Stufe 1: Der Einfachheit halber wurden anionische Polymere anfänglich als 1%-ige w/v Lösungen in Wasser hergestellt und, falls notwendig, mit verdünntem Natriumhydroxid oder Natriumbicarbonat auf pH-Werte von 7,0 +/- 0,1 eingestellt. Schlecht wasserlösliche anionische Polymere, wie Acrylsäure und Zelluloseacetatphthalat, wurden als deren Natriumsalze in Lösung gebracht. Frische Polymerlösungen ließ man vor der Verwendung über Nacht hydratisieren, sie wurden bei Kühlschranktemperatur gelagert und vor dem Testen oder der Verwendung auf Raumtemperatur äquilibrieren gelassen.

[0107] Stufe 2: Aminlösungen wurden als 1 %-ige w/v Lösungen in Wasser hergestellt und mit Hilfe von verdünnter Salzsäure (oder im Falle einiger langkettiger aliphatischer primärer Amine mit Essigsäure) auf pH-Werte von 7,0 +/- 0,1 eingestellt. Schlecht lösliche Amine, wie Octadecylamin, wurden, falls notwendig, erwärmt und als deren Salze in Lösung gebracht.

[0108] Stufe 3: Die Fähigkeit von Amin- und Polymer-Kombinationen zur Bildung unlöslicher Präzipitate und geeigneter Mikrokapseln wurde durch Zugabe von Tröpfchen von anionischer Polymerlösung von etwa 50 µl zu Aminlösung von etwa 5 ml Volumen in kleinen Reagenzgläsern untersucht. Wenn die hinzugefügten anionischen Polymerlösungen keine unlöslichen Präzipitate lieferten, wurde das Reaktantenpaar als ungeeignet für weitere Berücksichtigung angesehen. Kombinationen von Reaktanten, welche unlösliche Präzipitate lieferten, wurden der nachfolgenden Stufe 4 zugeführt.

[0109] Stufe 4: Für jedes in der oben genannten Stufe 3 für weitere Untersuchung ausgewählte Reaktantenpaar wurde ein Volumen von 5 ml anionische Polymerlösung mit einem gleichen Volumen Wasser verdünnt und auf 25 ml einer magnetisch gerührten Aminlösung, die in einer 10 cm Petrischale (ohne Abdeckung) enthalten war, aus einer Höhe von 10 cm zerstäubt. Die Zerstäubung wurde durch Pumpen der anionischen Polymerlösung mit einer Rate von 1 ml/min durch eine 18 Gauge Injektionsnadel und Entlangleiten von Luft mit 4 l/min aus einer 12 Gauge Injektionsnadel entlang der Spitze der Polymerauslieferungsnadel durchgeführt.

[0110] Zur Bereitstellung eines reproduzierbaren, engen Kegels der Zerstäubung der Polymerlösung wurde die Spitze der 18 Gauge Nadel zu einem 75 Grad Winkel gefeilt und diejenige der 12 Gauge Nadel zu 90 Grad. Die 18 Gauge Nadel wurde horizontal mit der ovalen Öffnung nach oben in Richtung der 12 Gauge Nadel, welche vertikal positioniert war, ausgerichtet montiert. Die Spitze der Luftstrom-(12 Gauge)Nadel wurde in einer Position 2 mm über der Spitze der Polymerauslieferungsnadel durch Punktschweißen der Zylinder der Nadeln an Edelstahlversteifungen fixiert, so daß der Luftstrom über den Polymerstrom blies, während dieser aus der modifizierten 18 Gauge Nadel austrat. Eine Reihe von Versuchsexperimenten war erforderlich, um den Zerstäuber zu optimieren (z. B. den Winkel der Polymerauslieferungsnadelspitze). Für diese Versuche wurde anstelle von Wasser zur Verdünnung der Polymerlösung wäßrige Farbstofflösung verwendet, und das gefärbte Polymer wurde auf 12 cm große Kreise von Filterpapier gesprüht.

[0111] Die Eignung einer Amin-Polymer-Kombination bei der Ausbildung von Mikrokapseln wurde durch Untersuchen des Reaktionsgemisches während und nach dem Zerstäuben untersucht, um zu bestimmen, ob das Gemisch aus dispersen Partikeln bestand, die in der Lage waren, einen Tyndal-Effekt zu zeigen, an der Glasoberfläche der Petrischale hafteten und/oder als nahezu kugelförmige Partikel erschienen, wenn sie mikroskopisch bei einer 100-fachen Vergrößerung betrachtet wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Diejenigen Reaktantenkombinationen, die erkennbare kugelförmige Partikel lieferten, wurden weiter hinsichtlich Stabilität und Eignung als Verkapselungsmittel für eine Vielzahl aktiver Kernmaterialien untersucht, wie es hierin beschrieben ist.

[0112] Alternativ wurde zur Untersuchung von Reaktantenpaaren mit der luftbetriebenen Zerstäubungsvorrichtung eine begrenzte Anzahl von Amin-Polymer-Kombinationen unter Verwendung der oben beschriebenen akustischen Vorrichtung hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Bildung von Mikrokapseln untersucht.

#### Beispiel 2

[0113] Ein Volumen von 10 ml einer 0,5%-igen Lösung von Natriumalginat in Wasser wurde in der Form von Tröpfchen mit etwa 5 µm Durchmesser auf der sanft gerührten Oberfläche von 20 ml Volumen einer Lösung von Spermin (als das Hydrochlorid) über einen Intervall von etwa 10 Minuten verteilt. Das Gemisch wurde zentrifugiert (2.000 Schwerkraftminuten), und der Überstand wurde von dem erhaltenen Mikrokapselpellet dekantiert. Wenn man einen kleinen Anteil des Pellets bei einer 100-fachen Vergrößerung untersuchte, sah man, daß es aus vielen kleinen kugelförmigen Partikeln bestand.

#### Beispiel 3

[0114] Um die Stabilität der Placebo-Mikrokapseln, wie denjenigen, die in den Beispielen 1 und 2 beschrieben sind, die für mehrere Tage in Wasser gelagert wurden, gegenüber künstlicher Magenflüssigkeit und gegenüber hoher Elektrolytkonzentration zu untersuchen, wurde eine Suspension von Spermin-Alginat-Mikrokapseln, die hergestellt worden waren, wie es in Beispiel 2 beschrieben ist, in 20 ml Wasser resuspendiert und in vier gleiche Anteile aufgeteilt.

[0115] Ein Anteil wurde als eine Kontrolle zurückbehalten.

[0116] Ein zweiter aliquoter Teil von wenigen Mikrolitern der frischen Suspension wurde abgenommen und der Rest bei Raumtemperatur verschlossen zur Seite gestellt. An jedem der nachfolgenden vier Tage wurde der Rest dieses Anteils durch Vortexen resuspendiert und wenige Mikroliter abgenommen. Die Mikroliter-Proben wurden unmittelbar auf einen Mikroskopobjektträger gegeben, untersucht und bei 100-fachen Vergrößerung fotografiert. Die entwickelten Mikrophotographien wurden verglichen, um zu sehen, ob sich die einzelnen Partikel im Erscheinungsbild veränderten oder beim Stehen zusammenlagerten.

[0117] Ein dritter aliquoter Teil wurde mit einem gleichen Volumen künstlicher Magenflüssigkeit gemischt und sofort und erneut nach zwei Stunden Inkubation bei 37°C untersucht, um zu bestimmen, ob die Mikrokapseln lysieren, wenn sie einer sauren Umgebung, wie derjenigen des Magens, ausgesetzt werden.

[0118] Ein Anteil von 180 mg festes Natriumchlorid wurde zu einem vierten aliquoten Teil hinzugefügt, und das Gemisch wurde gevortext, bis sich das Natriumchlorid löste. Der Anteil, zu welchem Natriumchlorid hinzugefügt worden war, wurde visuell und bei 100-fachen Vergrößerung untersucht, um zu bestimmen, ob das zugegebene Salz die Stabilität der Mikrokapseln beeinflusste.

## Ergebnisse:

[0119] Die Untersuchung des für 5 Tage gelagerten Anteils zeigte keine nennenswerte Veränderung, wenn er visuell untersucht wurde oder wenn die Mikrophotographien verglichen wurden. Der mit Säure behandelte Anteil löste sich weder sofort noch nach Inkubation für zwei Stunden auf, aber der mit etwa 4× normalem, osmolarem Natriumchlorid behandelte Anteil verschwand, bevor sich das gesamte Salz gelöst hatte. Es wurden keine Mikrokapseln gesehen, wenn der mit Salz behandelte Anteil mikroskopisch untersucht wurde. Spermin-Alginat-Mikrokapseln wurden als instabil gegenüber Elektrolytkonzentrationen, die mehrfach höher waren als die normale Osmolarität von menschlichem Gewebe, beurteilt.

## Beispiel 4

[0120] Es war von Interesse, den Einfluß der Stöchiometrie verschiedener Kombinationen von Amin und anionischem Polymer hinsichtlich der Ausbeute an gebildeten Mikrokapseln zu untersuchen. An dieser Stelle wurde eine Reihe von Proben von Mikrokapseln, die mit der hierin unter Bezugnahme auf **Fig. 1** beschriebenen akustischen Vorrichtung erzeugt worden waren, durch Reaktion von Reihenverdünnungen von anionischem Polymer mit einer konstanten Aminkonzentration wie folgt hergestellt.

[0121] Stufe 1: Eine Lösung von 1 % w/v Natriumalginat in Wasser wurde hergestellt und nach Hydratisierung für wenigstens 24 Stunden durch einen Filter von 8 µm gefiltert.

[0122] Stufe 2: Ein Volumen von 260 ml von 0,05% w/v Spermin (als das Hydrochlorid) wurde hergestellt.

[0123] Stufe 3: Ein Volumen von 10 ml Natriumalginatlösung wurde mit einem gleichen Volumen Wasser verdünnt, und nach dem Mischen wurden 10 ml der Verdünnung mit Volumina von 42 ml Sperminlösung zur Herstellung von Mikrokapseln mit der oben beschriebenen akustischen Vorrichtung verwendet. Die verbleibende Natriumalginatverdünnung wurde für eine Verwendung in Stufe 4 zurückbehalten.

[0124] Stufe 4: Die Natriumalginatverdünnung aus Stufe 3 wurde mit weiteren 10 ml Wasser verdünnt, und nach dem Mischen wurden 10 ml der neuen Verdünnung mit 42 ml Sperminlösung zur Herstellung von Mikrokapseln mit der oben beschriebenen akustischen Vorrichtung verwendet. Die verbleibende Natriumalginatlösung wurde für eine Verwendung in Stufe 5 zurückbehalten.

[0125] Stufe 5: Das in Stufe 4 oben beschriebene Verfahren wurde nacheinander wiederholt, um eine Reihe von Spermin-Alginat-Mikrokapseln aus Lösungen von aufeinanderfolgend niedrigeren Konzentrationen von Natriumalginat herzustellen.

[0126] Stufe 6: Die aufeinanderfolgenden Ansätze von Spermin-Alginat-Mikrokapseln, hergestellt in den Stufen 4 und 5, wurden gevortext, um sie sorgfältig zu mischen, und die auftretende Absorption jeder Suspension wurde sofort bei 550 nm gemessen, einem Spektralbereich, in welchem zuvor festgestellt worden war, daß die Reaktanten selbst keine meßbare Absorption aufwiesen. Aliquote Teile von wenigen Mikrolitern jeder Suspension wurden auf ein Mikroskopobjektträgerglas gegeben und bei 100-fachen Vergrößerung fotografiert. Die restlichen Proben wurden verschlossen, bei Raumtemperatur gelagert und nach 50 Stunden erneut untersucht und fotografiert.

## Ergebnisse:

Alginatkonzentration [% w/v]	Millimol		Reaktanten- verhältnis*	auftretende Absorption bei 550 nm
	Alginat*	Spermin		
0,50	0,028	0,056	1:2	0,14
0,25	0,014	0,056	1:4	0,19
0,125	0,007	0,056	1:8	0,26
0,063	0,0035	0,056	1:16	0,31
0,032	0,0018	0,056	1:32	0,20
0,016	0,009	0,056	1:64	0,06

\* Millimol Alginat, berechnet anhand von Alginat-Wiederholungseinheiten.

[0127] Die Absorptionsmessungen zeigen, daß die größte Dichte an Spermin-Alginat-Mikrokapseln aus der Verwendung der Reaktanten in dem Konzentrationsverhältnis von 1 mol Alginat-Wiederholungseinheiten zu 16 mol Spermin resultiert.

## Beispiel 5

[0128] Es ist gut bekannt, daß das Verhältnis von Reaktanten in dem Reaktionsgemisch nicht notwendigerweise das Verhältnis von Reaktanten, die in dem Produkt einer chemischen Reaktion kombiniert werden, verdoppelt. In einigen Fällen ist ein Überschuß eines Reaktanten erforderlich oder erwünscht, um die Reaktion in Richtung verbesserter Ausbeuten des gewünschten Produkts zu fördern. In diesem Beispiel wurden bevorzugte Stöchiometrieverhältnisse von Reaktanten wie folgt bestimmt.

[0129] Ein Ansatz von Spermin-Alginat-Mikrokapseln wurde unter Verwendung der Konzentration an Reaktanten, welche die höchste Dichte an Mikrokapselausbeute lieferte, wie es in Beispiel 4, Stufe 6 oben beschrieben ist, hergestellt, und das Produkt wurde wiederholt durch Zentrifugation und Resuspendierung in frischem Wasser gesammelt. Die gewaschene Probe wurde luftgetrocknet und von einer externen Firma, die sich auf solche Arbeiten spezialisiert hat, einer Verbrennungsanalyse unterzogen. Die Firma wurde angewiesen, die Proben bei Temperaturen unterhalb von 50°C bis zu konstantem Gewicht zu trocknen (zur Vermeidung der Bildung von Anhydro-Derivaten des von Kohlenwasserstoff abgeleiteten Polymers).

[0130] Die Verbrennungsanalyse zeigte, daß das Produkt das Äquivalent von etwa 25% Spermin (oder etwa 1 Sperminmolekül auf jeweils 4 Alginat-Wiederholungseinheiten) enthält. Somit ist die Reaktion zur Bildung von Mikrokapseln bei einem hohen Amin-zu-Anion-Reaktantenverhältnis optimiert, aber nicht das gesamte zur Verfügung stehende Amin kann möglicherweise unter Bildung des Amin-Polymer-Salzes reagieren. Es scheint, daß jede der Aminogruppen in diesem polyfunktionalen Amin mit einer sauren Alginat-Wiederholungseinheit reagiert.

## Beispiel 6

[0131] Eine gewünschte Eigenschaft von Mikrokapseln, die hergestellt werden, wie es hierin beschrieben ist, besteht darin, daß die Mikrokapseln als stabile, individuelle Partikel verbleiben und wenig oder keine Neigung zur Zusammenlagerung im Laufe der Zeit zeigen. Zur Untersuchung dieser Qualität wurde eine Reihe von Mikrokapselformulierungen unterschiedlicher Stöchiometrien in aufeinanderfolgenden Intervallen nach der Herstellung untersucht.

[0132] Die in Beispiel 4 oben hergestellten Formulierungen wurden in mit Teflon ausgekleideten Schraubdeckelröhrchen im Temperaturbereich zwischen 21 und 25°C gelagert. In Intervallen von etwa 2 Monaten über einen Zeitraum von 6 Monaten wurden die Proben dreimal für etwa 30 Sekunden gevortext, und aliquote Teile weniger Mikroliter wurden bei 100-fachen Vergrößerung untersucht. Aus 0,50% und 0,25% Alginat hergestellte Formulierungen wurden am Ende des ersten Intervalls von 2 Monaten und zu allen späteren Zeitpunkten ausgiebig verklumpt. Die mit 0,125% Alginat hergestellte Probe war nach 2 Monaten monodispers, aber nach 4 und 6 Monaten leicht verklumpt (Zusammenlagerungen von jeweils 10–20 Partikeln). Die bei den niedrigsten untersuchten Konzentrationen hergestellten Formulierungen, 0,06% und 0,03%, blieben nach 6 Monaten monodispers.

## Beispiel 7

[0133] Zur Bestimmung einer gewissen Abschätzung des Bereiches an Kernmaterialien, die in dem gesamten wäßrigen Verkapselungssystem wirksam eingesetzt werden können, wurden Reihen von Verkapselungen unter Verwendung zweier wasserlöslicher Wirkstoffe, zweier wasserlöslicher Hilfsmaterialien, zweier wasserunlöslicher Feststoffe, zweier Typen von Viren und Sperminalginate, Sperminchondroitinsulfat, Ethylendiamin-Zellulosesulfat oder Octadecylamin-Carboxymethylzellulose als die wandbildenden Materialien durchgeführt.

## Beispiel 7a

[0134] Stufe 1: Eine Probe von 15 mg Tetracyclinbase (Sigma Chemical Co.) wurde in 10 ml 0,06%-iger wäßriger Natriumalginatlösung gelöst, und diese Lösung wurde unter Verwendung der oben beschriebenen akustischen Vorrichtung mit 20 ml einer 0,05%-igen wäßrigen Lösung von Sperminhydrochlorid unter Bildung von Tetracyclin enthaltenden Mikrokapseln vereinigt.

[0135] Stufe 2: Die Mikrokapselsuspension wurde zentrifugiert (5.000 Schwerkraftminuten) und die pelletierten Mikrokapseln wurden nach Dekantieren des Überstandes 5-mal durch Resuspendieren in ausreichend Wasser unter Erhalt von 5 ml, erneutem Pelletieren (durch Zentrifugieren) und Dekantieren gewaschen, wobei in jedem Fall die dekantierten Flüssigkeiten behalten wurden. Das letzte Pellet wurde in ausreichend Wasser unter Erhalt von 10 ml resuspendiert, und 500 mg festes Natriumchlorid wurden zu diesem hinzugefügt. Das Gemisch wurde kurz gevortext, um die Auflösung der Mikrokapseln und des zugegebenen Salzes zu unterstützen. Volumina von etwa 1 µl Salzsäure wurden zu den gelösten Mikrokapseln und zu jeder der zurückgehalte-

nen dekantierten Flüssigkeiten hinzugegeben und die Absorption jeder Lösung bei 268 nm gemessen.

[0136] Die nach 3 Waschschritten erhaltenen flüssigen Überstände zeigten keine signifikante Absorptionscharakteristik von Tetracyclin, aber die Absorption der Lösung von gelösten Mikrokapseln bei 268 nm zeigte, daß mehr als die Hälfte der anfänglichen Menge an Tetracyclin während des wiederholten Waschens in den Mikrokapseln zurückgehalten wurde.

#### Beispiel 7b

[0137] Stufe 1: Fluorouracil (Sigma Chemical Co.) wurde gegen Tetracyclinbase ausgetauscht und verkapselt, wie es in Stufe 1 von Beispiel 7a oben beschrieben ist.

[0138] Stufe 2: Die in Stufe 1 oben erhaltene Mikrokapselsuspension wurde behandelt, wie es in Stufe 2 von Beispiel 7a oben beschrieben ist, ausgenommen, daß Absorptionsmessungen bei 265 nm durchgeführt wurden.

[0139] Die nach 3 Waschschritten erhaltenen flüssigen Überstände zeigten keine signifikante Fluorouracil-Absorption, aber die Absorption bei 265 nm der Lösung gelöster Mikrokapseln zeigte, daß mehr als die Hälfte der anfänglichen Menge an Fluorouracil während des wiederholten Waschens in den Mikrokapseln zurückgehalten wurde.

#### Beispiel 7c

[0140] Stufe 1: Eine Probe von 100 mg Dextranblau (Sigma Chemical Co.) (durchschnittliches Molekulargewicht: 2.000.000) wurde gegen Tetracyclinbase ersetzt und verkapselt, wie es in Stufe 1 von Beispiel 7a oben beschrieben ist.

[0141] Stufe 2: Die in Stufe 1 oben erhaltene Mikrokapselsuspension wurde behandelt, wie es in Stufe 2 von Beispiel 7a oben beschrieben ist, ausgenommen, daß Absorptionsmessungen bei 620 nm durchgeführt wurden.

[0142] Die nach 3 Waschschritten erhaltenen flüssigen Überstände zeigten keine signifikante Absorptionscharakteristik von Dextranblau, aber die Absorption bei 620 nm nach Lösen der Mikrokapseln zeigte, daß mehr als die Hälfte der anfänglichen Menge an Dextranblau während der wiederholten Waschschrritte in den Mikrokapseln zurückbehalten wurde.

#### Beispiel 7d

[0143] Stufe 1: Eine Probe von 100 mg Bromphenolblau (Fisher Scientific Co.) wurde in 25 ml einer 0,1%-igen Lösung von Natriumcarboxymethylzellulose (mittlere Viskosität, Ruger Chemical Co.) gelöst, und die erhaltene Lösung wurde langsam durch eine zu einer feinen Spitze (0,1 mm o. d.) gezogenen Kapillare gepumpt (etwa 1 ml/min). Die austretenden Tröpfchen wurden über eine Distanz von etwa 1 cm in eine langsam gerührte 0,1%-ige wäßrige Lösung von Octadecylamin (Aldrich Chemical Co.), welches als das Acetat bei einem pH-Wert von 7,0 gelöst war, fallen gelassen.

[0144] Stufe 2: Die resultierenden Mikrokapseln mit einem Durchmesser von etwa 1,5 mm wurden für eine weitere Stunde gerührt und mit Hilfe von feinem Gewebe abgetrennt. Die Mikrokapseln wurden mit 2 Volumen Wasser von 100 ml gewaschen. Etwa die Hälfte der Mikrokapseln wurde feucht gelagert und bis zur Verwendung gekühlt. Die andere Hälfte der Mikrokapseln wurde lyophilisiert und bis zur Verwendung trocken gelagert.

[0145] Stufe 3: Einige Dutzend der lyophilisierten Mikrokapseln wurden in wenigen Millilitern Wasser für 1 Stunde rehydratisiert und parallel zu den feucht gelagerten Mikrokapseln zum Testen ihrer Empfindlichkeit bezüglich des pH-Wertes verwendet. Es wurden Verdünnungen von Salzsäure zur Bereitstellung von Lösungen mit pH-Werten von 2, 3 und 4 hergestellt. Zu diesen Salzsäurelösungen wurden ein paar rehydratisierte und ein paar feucht gelagerte Mikrokapseln eine nach der anderen hinzugefügt. Die Mikrokapseln wurden beobachtet, um festzustellen, ob sie auf die umgebenden Medien durch Farbveränderung in einer Art und Weise reagierten, die mit der erwarteten Veränderung von verkapseltem Bromphenolblau-Indikator von Blau bei pH 4 nach Gelb bei pH 3 übereinstimmt.

[0146] Die anfänglich schrumpelig lyophilisierten Mikrokapseln nahmen, wenn sie zu Wasser hinzugefügt wurden, in einem Intervall von etwa 20 Minuten eine kugelförmige Form an. Sowohl die rehydratisierten als auch die feucht gelagerten Mikrokapseln blieben blau, wenn sie zu Medium mit einem pH-Wert von 4 hinzugegeben wurden, wechselten aber nach Gelb innerhalb weniger Minuten bei Zugabe zu der Lösung mit einem pH-Wert von 3. Das verkapselte Bromphenolblau diente als ein Indikator für den pH-Wert des Inneren der Mikrokapsel und diffundierte nicht aus dieser heraus.

## Beispiel 7e

[0147] Stufe 1: Eine Probe von 200 mg fein gemahlener Kohle wurde in 25 ml einer 0,1%-igen Lösung von Natriumcarboxymethylzellulose suspendiert und verkapselt, wie es in Stufe 1 von Beispiel 7d oben beschrieben ist.

[0148] Stufe 2: Die resultierenden Mikrokapseln mit einem Durchmesser von etwa 1,5 mm wurden für eine weitere Stunde gerührt und mit Hilfe von feinem Gewebe abgetrennt. Die Mikrokapseln wurden mit 2 Volumen Wasser von 100 ml gewaschen und für 2 Monate bei Raumtemperatur feucht gelagert. Die Kohle enthaltenden Mikrokapseln wurden alle 2 Wochen untersucht, um festzustellen, ob die Mikrokapseln intakt blieben oder etwas von dem verkapselten Feststoff verloren.

[0149] Die Kohle enthaltenden Mikrokapseln blieben über den Beobachtungszeitraum intakt, und es gab kein Anzeichen für ein Austreten des festen Kernmaterials aus den Mikrokapseln während dieses Zeitraums.

## Beispiel 7f

[0150] Stufe 1: Eine Probe von 10 mg kristallinem Toxin, isoliert aus einem Stamm von *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Ecogen, Inc.) wurde in 25 ml einer 1%-igen Lösung von Natriumzellulosephosphat (Aldrich Chemical Co.) suspendiert und tropfenweise, wie es in Stufe 1 von Beispiel 7e oben beschrieben ist, 50 ml einer 1%-igen wäßrigen Lösung von Ethylendiamin, gelöst als das Hydrochlorid bei einem pH-Wert von 7, zugeführt.

[0151] Stufe 2: Die kristallines Toxin enthaltenden resultierenden Mikrokapseln wurden für eine weitere Stunde gerührt und mit Hilfe von feinem Gewebe abgetrennt. Die Mikrokapseln wurden mit 2 Volumen Wasser von 100 ml gewaschen, trocken laufen gelassen und lyophilisiert. Restliche Ethylendiaminlösung und beide Waschflüssigkeiten wurden zurückbehalten.

[0152] Stufe 3: 50 der lyophilisierten Mikrokapseln wurden in wenigen Millilitern Wasser für 1 Stunde rehydratisiert, und die Rehydratisierungsflüssigkeit wurde ablaufen gelassen und zurückbehalten.

[0153] Stufe 4: Die rehydratisierten Mikrokapseln wurden lysiert und das kristalline Toxin durch Zugabe von 10 ml 1-molarem Trinatriumphosphat zu diesem gelöst, und das Gemisch wurde auf 100 ml verdünnt.

[0154] Stufe 5: Die Proteingehalte der zurückbehaltenen Reaktionsflüssigkeit beider Waschschritte, der Rehydratisierungsflüssigkeit und der gelösten Mikrokapseln wurden durch Messung der Absorption des Protein-Kupfer(I)-Komplexes mit 4,4'-Dicarboxy-2,2'-bichinolin bei 562 nm bestimmt.

[0155] Weit über 90% der anfänglichen Menge an kristallinem Toxinprotein wurden in den Mikrokapseln zurückbehalten, wobei nur ein kleiner Anteil während der Mikrokapselbildungsreaktion verloren wurde.

## Beispiel 7g

[0156] Um die Eignung dieser Erfindung zur Verkapselung von Virus zu demonstrieren, wurden drei Typen von Experimenten mit mehreren Sätzen von Reagenzien, häufig mit verschiedenen Viruschargen, durchgeführt, aber die Absicht und Methode jedes Versuchs innerhalb eines Typs von Experimenten waren die gleichen. Diese drei Typen von Experimenten waren: 1) Herstellung von Placebo und Virus enthaltenden Mikrokapseln, 2) Freisetzung von Virus aus Mikrokapseln und 3) Titration von Placebo- und Virus-Mikroperlen.

[0157] Zwei Virustypen wurden verkapselt: Rotavirusstamm WC-3 mit einem Titer von  $5,4 \times 10^6$  pfu/ml (plaquebildende Einheiten pro Milliliter) und ein Vacciniavirusstamm WUKvp7 mit einem Titer von  $8,5 \times 10^6$  pfu/ml.

[0158] Stufe 1: Eine Probe von 5 ml einer 1%-igen w/v neutralen wäßrigen Lösung von anionischem Polymer (z. B. Natriumalginat) wird mit 5 ml Wasser verdünnt und durch Vortexen gemischt. Die verdünnte Probe wird in einen Zerstäuber überführt, und Mikrokapseln werden, wie es in Stufe 4 von Beispiel 1 oben beschrieben ist, durch Zerstäuben der Lösung auf eine Oberfläche von etwa 40 cm<sup>2</sup> eines Volumens von 25 ml einer magnetisch gerührten neutralen 0,2 mM wäßrigen Lösung von Aminhydrochlorid (z. B. Sperminhydrochlorid) hergestellt.

[0159] Stufe 2: Der Zerstäuber wird mit 1 ml Wasser gespült, und die Spülung wird in gleicher Weise auf Aminlösung zerstäubt, wie in Stufe 1 oben.

[0160] Stufe 3: Die resultierende Mikrokapselsuspension wird in ein kalibriertes Zentrifugenröhrchen überführt, die Mikrokapseln werden durch Zentrifugation getrennt, und die Volumen der gesamten Flüssigkeit und der abgesetzten Mikrokapseln werden gemessen.

[0161] Stufe 4: Die Mikrokapseln werden bis zur Verwendung gekühlt gelagert und anschließend durch Vortexen redispergiert.

[0162] Stufe 5: Die obigen Stufen 1–4 werden wiederholt, wobei die 5 ml Virensuspension (z. B. Rotavirus WC-3) gegen 5 ml Wasser in Stufe 1 oben ausgetauscht werden.

[0163] Stufe 6a: Die Mikrokapseln werden durch Pelletieren bei 1.500 g × m (Schwerkraft × Minuten), Dekan-

tieren und Resuspendieren in einem Volumen destillierten Wassers, das einem Fünftel (1/5) des ursprünglichen Volumens entspricht, gewaschen. Nur für Placebo-Kapseln wird eine Charge Virussuspension, von der geschätzt wurde, daß sie dem verkapselten Virus entspricht, zu den resuspendierten Kapseln hinzugefügt, wie es ausführlich in Stufe 13 angegeben ist. Um Placebo- oder Virus-Mikrokapseln, die aus langkettigen Alkylaminen (z. B. Octadecylamin als Acetat) hergestellt wurden, schnell zu zerstören, werden gleiche Volumen von Mikrokapselsuspension mit wäßrigem, 300 mOsmol (Milliosmolar) Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,0 oder frischem wäßrigem 0,5 M Natriumbicarbonat gemischt und mit einem gleichen Volumen Cyclohexan überschichtet. Das Gemisch wird für 5 Minuten jede Minute kurz gevortext. Anschließend wird die Cyclohexanschicht abgezogen. Das Virus, wenn welches vorhanden ist, befindet sich in der wäßrigen Phase.

[0164] Stufe 6b: Um Placebo- oder Virus-Mikrokapseln, die aus polyfunktionalen Aminen (z. B. Spermin als Hydrochlorid) hergestellt wurden, schnell zu zerstören, werden gleiche Volumen von 1.200 mOsmol Natriumchlorid und Mikrokapselsuspension gemischt oder ausreichend festes Natriumchlorid wird zu der Mikrokapselsuspension hinzugegeben, so daß die resultierende Lösung 4% Natriumchlorid enthält.

[0165] Stufe 7: Monoschicht-Kulturen von Nierenzellen der grünen Meerkatze werden in Multi-Well-Gewebe-kulturplatten (2,5 cm) hergestellt, wobei 72 Stunden vor dem Zerstören der Mikrokapseln begonnen wird.

[0166] Stufe 8: Sechs 10-fach-Verdünnungen in Reihe von einer Stammlösung von viraler Suspension, welche etwa  $10^7$  plaquebildende Einheiten pro Milliliter (pfu/ml) enthält, und separat von den Überständen aus den Mikrokapselwaschschritten und der zerstörten Mikrokapselsuspension (aus Stufe 6a) werden in AVN-Medium hergestellt.

[0167] AVN-Medium ist ein Gemisch, das folgendes enthält:

1. Handelsüblich erhältliches Stokers-Medium, welches folgendes enthält:

- Natriumchlorid,
- Kaliumchlorid,
- Natriumdihydrogenphosphat,
- Dextrose,
- Eisennitrat,
- Calciumchlorid,
- Magnesiumsulfat,
- Vitamine,
- Aminosäuren,
- Natriumbicarbonat,
- Phenolrot-Indikator,
- alle gelöst in destilliertem Wasser,
- 2. Tryptosephosphat-Medium,
- 3. Glutamin, und
- 4. ein Gemisch von Penicillin und Streptomycin.

[0168] Stufe 9: Die Zellen werden zweimal mit Kochsalzlösung gewaschen, wobei die Waschlösungen verworfen werden.

[0169] Stufe 10: Aufeinanderfolgend benachbarte Wells werden mit aliquoten Teilen von 200 µl aufeinanderfolgender Virenverdünnungen inokuliert und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

[0170] Stufe 11: Die Zellen werden mit 2,5 ml/Well eines 1 : 1-Gemisches von Minimalsalzen und Agarose/Trypsin überschichtet. Die überschichteten Zellen werden für 72 Stunden bei 37°C inkubiert.

[0171] Stufe 12: Die Zellen werden mit 1,5 ml/Well eines 1 : 1-Gemisches aus Agarose und 2× ausgeglichener Earls-Lösung, die Neutralrot enthielt, gefärbt. Die Zellen werden bei 37°C für 24 Stunden inkubiert, und Plaques, falls welche vorhanden sind, werden pro Well gezählt. Die Zellen werden für weitere 24 Stunden bei 37°C inkubiert, und neue Plaques, falls welche vorhanden sind, werden pro Well gezählt und die Anzahl von pfu in der ursprünglichen Virensuspension berechnet.

[0172] Stufe 13: Für die Placebo-Mikrokapseltitration wird die obige Stufe 7 wiederholt. Dann wird ein bekanntes Volumen an Stammlösung von Virensuspension, ausreichend, um eine Virenkonzentration von etwa  $10^5$  pfu/ml bereitzustellen, zu einem Volumen von etwa 25 ml Placebo-Mikrokapselsuspension hinzugefügt, und die Suspension wird durch Vortexen gemischt.

[0173] Stufe 14: Die Suspension wird zentrifugiert und die wäßrige Phase so vollständig wie es praktikabel ist abgezogen. Sowohl die Mikrokapseln als auch die abgezogene Phase werden aufbewahrt.

[0174] Stufe 15: Die Mikrokapseln werden in 10 Volumen Wasser resuspendiert, erneut zentrifugiert und die wäßrige Phase abgezogen. Sowohl die Mikrokapseln als auch die abgezogene Phase werden aufbewahrt.

[0175] Stufe 16: Stufe 15 wird wiederholt.

[0176] Stufe 17: Die Mikrokapselprobe wird in zwei gleiche Anteile aufgeteilt und zerstört, wie es in Stufe 6a oder 6b oben beschrieben ist.

[0177] Stufe 18: Die obigen Stufen 7 und 9–12 werden wiederholt, wobei in Stufe 12 die aufeinanderfolgenden



abgezogenen Phasen, die verbleibende Mikrokapselsuspension und die Präparation zerstörter Mikrokapseln für die Reihenverdünnungen von viraler Suspension ausgetauscht werden.

[0178] Stufe 19: Zum Titrieren von Virus enthaltenden Mikrokapseln werden die Stufen 13–19 wiederholt, wobei die Viren-Mikrokapselsuspension gegen die Placebo-Mikrokapselsuspension ausgetauscht wird.

[0179] Die vorgenannte Abfolge von Stufen zur Kontrolle von Viren-Mikrokapsel- und Placebo(Leerreagens-) Mikrokapsel-Titrationsen kann wie folgt zusammengefaßt werden. In der Virologie ist eine Titration ein Zählen von Virenplaques in einer Zellkultur.

Beschreibung der Stufe	Nummer der Stufe		
	Kontrollkultur	Placebo-Mikrokapseln	Virus-Mikrokapseln
<u>Herstellen von Mikrokapseln</u>			
Mischen von Polymer, Herstellen von Mikrokapseln	-	1	5
Spülen des Systems	-	2	2
Zentrifugieren	-	3	3
Lagern von Mikrokapseln	-	4	4
Zerstören von Mikrokapseln	-	6	6
<u>Zählen von Virenplaques in Zellkulturen</u>			
Züchten von Affenzellkulturen	7	7	7
Herstellen von Verdünnungen von Viruskulturstammlösung	8	-	-
Waschen von Affenzellkulturen	9	-	-
Zugabe von Viruskulturstammlösung zu Affenzellen	10	-	-
Waschen und Inkubieren der Zellen	11	-	-
Zählen von Virenplaques in Zellkulturen	12	-	-
<u>Verwenden von Placebo-Mikrokapseln als Kontrollreagens</u>			
Zugeben von Verdünnungen von Virusstammlösung zu Placebo	-	13	-
Zentrifugieren, Trennen von Phasen	-	14	-
Waschen der Mikrokapseln durch Resuspendieren, Zentrifugieren	-	15	-
erneutes Waschen der Mikrokapseln	-	16	-
Zerstören der Placebo-Mikrokapseln wie in Stufe 6	-	17	-

Stufe 18 umfaßt die folgenden Verfahren

Waschen der Affenzellkulturen	-	9	-
Zugeben der zerstörten Mikrokapseln, der Waschschrirte von Affenzellen	-	10	-
Waschen und Inkubieren der Zellen	-	11	-
Zählen von Virenplaques in Zellkultu- ren	-	12	-

Abschätzen des Virengehalts von Vi-  
ren-Mikrokapseln

Zentrifugieren, Trennen von Phasen	-	-	14
Waschen von Mikrokapseln durch Resuspendieren, Zentrifugieren	-	-	15
erneutes Waschen der Mikrokapseln	-	-	16
Zerstören von Viren-Mikrokapseln wie in Stufe 6	-	-	17

Stufe 18 umfaßt die folgenden Verfahren

Waschen der Affenzellkulturen	-	-	9
Zugabe zerstörter Mikrokapseln und der Waschschrirte von Affenzellen	-	-	10
Waschen und Inkubieren der Zellen	-	-	11
Zählen von Virenplaques in Zellkultu- ren	-	-	12

[0180] Die Ergebnisse von Placebo-(Spermin-Alginat-Mikrokapseln), Virus-(WC-3, verkapselt in Spermin-Alginat-Mikrokapseln) und Kontroll-(unverkapseltes WC-3) Titrationen sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

Datum und Typ der Mikroperle	Anfängliche Sus- pension	Titrationsdaten als pfu/ml			Mikrokapseln	
		Überstand (Waschschrirte)			Intakt	Zerstört
		1	2	3		
03.12.92						
Spermin-Alginat						
Kontrolle	5.400.000					
Virus	150.000	10.000	680	650	220	140.000
Placebo	N.A.	30.000	8.700	660	450	180

Vorläufige Tests unter Verwendung von Kontrolle, Viren-Mikrokapseln und Placebo-Mikrokapseln zeigten, daß Infektiösität und Immunogenizität des Virus nach der Verkapselung erhalten blieben und daß ein erheblicher Anteil der Virencharge nach wiederholten Waschschrirten in den Mikrokapseln zurückbehalten wurde. Die Effizienz des Einschließens von Vacciniavirus überstieg diejenige von Rotavirus. Beide behielten die Infektiösität bei.

- [0181] Mäuse: 8–12 Wochen alte C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>-Haplotyp) Mäuse und CD2 (F1) Säuglingsmäuse (bezogen von Taconic Breeding Laboratories (Germantown, NY)) wurden in getrennten Isolierungseinheiten gehalten. Seren von Erwachsenen und Jungtieren wurden mittels ELISA hinsichtlich des Vorhandenseins von für Rotavirus spezifischen Antikörpern getestet, und in diesen Experimenten wurden nur seronegative Tiere verwendet.
- [0182] Zellen: Fötale Nierenzellen der grünen Meerkatze (MA-104) wurden gezüchtet, wie es in Offit, P. A. et al. 1983, Infect. Immun. 42: 293–300 beschrieben ist.
- [0183] Virus: Der bovine Rotavirusstamm WC3 wurde in unserem Labor isoliert, wie es in Clark, N. F. et al. 1986, Am. J. Dis. Child. 140: 350–356 beschrieben ist. Der Affenstamm RRV (MMU 18006) wurde von Nathalie Schmidt (Viral and Rickettsial Disease Laboratory, Berkeley, CA) erhalten. Plaquegereinigte Stämme von Rotavirus für die Verwendung in diesen Untersuchungen wurden in MA-104-Zellen hergestellt. Rotaviren wurden gezüchtet, gereinigt, mittels Spektrophotometrie quantifiziert und hinsichtlich Infektiosität mittels Plaque-test titriert, wie es in Offit, P. A. et al. 1983 Infect. Immun. 42: 293–300 und Offit, P. A. et al., 1983 J. Virol. Methods 7: 29–40 beschrieben ist.
- [0184] Auswahl anionischer Polymere und Amine zur Bildung von Mikrokapseln: Die als ihre Natriumsalze getesteten anionischen Polymere waren Alginsäure (Fisher Scientific Co., Fairlawn, NJ), Polyacrylsäure und Zellulosesulfat (Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO), Zelluloseacetatphthalat (Eastman Organic Chemicals, Rochester, NY), Carbomer USP (Carbopol 934<sup>®</sup>, B. F. Goodrich, Cleveland, OH), Carboxymethylzellulose USP (mittlere Viskosität, Ruger Chemical Co., Inc., Irvington, NJ), Heparin USP (The Upjohn Co., Kalamazoo, MI) und gemäß dem Verfahren des US-Patents Nr. 2,666,759 isolierte Arabinsäure. Die anionischen Polymere, welche den Hauptstrukturbestandteil der Mikrokapselwände darstellen, wurden so ausgewählt, daß sie einen Bereich von Abständen zwischen nächsten benachbarten Carboxylatgruppen liefern. Somit entsprachen in den erweiterten Theta-Formen von Polymeren die interanionischen Abstände den Äquivalenten von 2 Methylengruppen in Polyacrylsäure, 6 in Alginsäure und Zellulosesulfat, 10 in Carboxymethylzellulose und 20–30 in hochverzweigter Arabinsäure.
- [0185] Mit der Ausnahme von Octadecylamin, das als das Acetat verwendet wurde (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), wurden die folgenden Amine in Form ihrer Hydrochloridsalze getestet: Arginin, Dodecylamin und Piperazin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), Ethylendiamin, Triethylamin und Triethylentetramin (Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO) und Methylenblau (Fisher Scientific Co., Fairlawn, NJ). Die Basen wurden so ausgewählt, daß sie von 1–4 reaktive primäre, sekundäre oder tertiäre Aminogruppen pro Molekül bereitstellen und somit in den Fällen polyfunktionaler Amine die Ausbildung mehrerer Salzbrücken zwischen und innerhalb von sauren Polymerketten erlauben.
- [0186] Wirkung verschiedener anionischer Polymere und Amine auf die Infektiosität von Rotavirus: Ein Zellkulturstamm von bovinem Rotavirusstamm WC3 ( $5,0 \times 10^8$  pfu/ml) wurde 1 : 50 in entweder 0,9% NaCl, dem wäßrigen 0,05 M Natriumsalz eines anionischen Polymers oder dem wäßrigen 0,05 M Salz des Amins (eingestellt auf einen pH-Wert von 7,0) verdünnt. Gemische wurden hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Infektiosität von Rotavirus mittels des Plaque-tests titriert.
- [0187] Fähigkeit wasserlöslicher Polymere und Amine zur Bildung von Mikrokapseln und einem Zusammenbrechen in simulierter Magensäure zu widerstehen: Polymere und Amine, welche Rotavirus nicht inaktivierten, wurden in Kombination zur Bestimmung ihrer Fähigkeit, Mikrokapseln auszubilden, die einem Zusammenbrechen in simulierter Magensäure widerstanden, getestet. Sechs wasserlösliche anionische Polymere wurden in Kombination mit 7 wäßrigen Aminen (42 mögliche Kombinationen) getestet. Anfänglich wurde 1 ml des wäßrigen Natriumsalzes von anionischem Polymer tropfenweise zu 1 ml wäßrigem Aminhydrochlorid (oder -acetat) hinzugefügt, um die Fähigkeit zur Ausbildung eines Grenzflächenpräzipitats zu bestimmen. Kombinationen, welche festes Material erzeugten, wurden dann zur Herstellung von Mikrokapseln verwendet. Mikrokapseln wurden durch Dispersion des Natriumsalzes von anionischem Polymer als Tröpfchen mit einer Größe von etwa 5 µm in einer wäßrigen Lösung des Aminsalzes in einer Art und Weise, analog zu der zuvor beschriebenen für die Herstellung von Calcium-Alginat-Mikrokapseln (US-Patent Nr. 4,744,933), ausgebildet. Die Kurzzeitstabilität von Mikrokapseln wurde durch Beobachten bei Raumtemperatur für 5 Tage in wäßrigen Lösung getestet. Mikrokapseln, die bei Raumtemperatur stabil waren, wurden mit simulierter Magensäure (pH 1,2) bei 37°C für 2 Stunden behandelt.
- [0188] Kombinationen von sauren Polymeren und Aminen, welche stabile mono- oder oligodisperse Mikrokapseln lieferten, wurden durch Variieren des Verhältnisses der chemischen Äquivalente von Amin zu den Äquivalenten von sauren Wiederholungseinheiten des Polymers im Bereich von 32 : 1 bis 1 : 32 optimiert. Reaktantenverhältnisse, welche maximale abgesetzte Volumina an Mikrokapseln lieferten, wurden ausgewählt.
- [0189] Die Größe von Mikrokapseln wurde durch Vergleich mit Latexperlen bekannter Größe (Duke Scientific Corp., Palo Alto, CA) mittels Lichtmikroskopie bestimmt.
- [0190] Fähigkeit von Natriumalginat-Sperminhydrochlorid-Mikrokapseln, infektiöses Virus einzuschließen: Ein aliquoter Teil von 5 ml einer geklärten Zellkulturstammlösung von WC3 ( $6 \times 10^6$  pfu/ml) wurde zu 5 ml von

0,68 mM Natriumalginat hinzugefügt und als Tröpfchen mit einer Größe von nominal 5 µm in 20 ml von 0,55 mM Sperminhydrochlorid dispergiert. Mutmaßlich Rotavirus enthaltende Mikrokapseln wurden bei 600× g zentrifugiert, mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen und mit 8,0 M Natriumphosphat (pH 7,0) zerstört. Flüssige Überstände aus den Waschschritten und Flüssigkeiten, die nach der Zerstörung (von mutmaßlich Rotavirus enthaltenden Mikrokapseln) erhalten wurden, wurden hinsichtlich des Vorhandenseins von infektiösem Virus mittels Plaquetest getestet. Zur Bestimmung, ob in dem obigen Experiment freigesetztes Virus auf der Oberfläche oder in der Matrix von Mikrokapseln vorhanden war, wurden  $3 \times 10^7$  pfu aus Zellkultur erhaltenes WC3 (in einem Volumen von 1 ml) vorher ausgebildeten Spermin-Alginat-Mikrokapseln, welche kein Virus enthielten (Placebo-Perlen), hinzugefügt. Das Virus wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur adsorbieren gelassen. Placebo-Perlen, zu welchen Virus hinzugefügt worden war, wurden gewaschen und zerstört, und flüssige Überstände wurden hinsichtlich des Vorhandenseins von infektiösem Virus getestet, wie es oben beschrieben ist.

[0191] Bestimmung der Kernbeladung und der Kernbeladungseffizienz des Mikroverkapselungsverfahrens: Die Menge an Rotavirus-Antigen, das innerhalb von Mikrokapseln enthalten war, wurde mittels ELISA bestimmt. Kurz gesagt wurden einzelne Wells von 96-Well-Platten mit flachem Boden (Costa) über Nacht mit 100 µl Meerschweinchen-Anti-WC3-Hyperimmunantiserum, das 1 : 1.000 in 1,5 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und 3,5 mM NaHCO<sub>3</sub> verdünnt war, beschichtet. Die Wells wurden fünfmal mit Puffer gewaschen, welcher 1,73 M NaCl, 0,03 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,13 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 0,025% Tween 20 in destilliertem Wasser enthielt (Waschpuffer). 200 µl Puffer, welcher 0,5% (v/v) Gelatine und 0,05% Tween 20 in PBS enthielt (Blockierungspuffer), wurden zu jedem Well hinzugefügt. Die Wells wurden dreimal mit Waschpuffer und zweimal mit destilliertem H<sub>2</sub>O gewaschen, und 100 µl Flüssigkeit von zerstörten, Rotavirus enthaltenden Mikrokapselpräparationen wurden zu jedem Well hinzugefügt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Wells wurden fünfmal mit Waschpuffer gewaschen, und 100 µl Kaninchen-Anti-WC3-Hyperimmunantiserum wurden zu jedem Well hinzugefügt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Wells wurden fünfmal mit Waschpuffer gewaschen, und 100 µl einer 1 : 2.000 Verdünnung (in 1% BSA) von phosphatasekonjugiertem Ziege-Anti-Kaninchen-IgG (Organon Teknika, Durham, NC) wurden zu jedem Well hinzugefügt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach fünf Waschschritten mit Waschpuffer wurden 100 µl 1 M Diethanolamin plus 0,1% (w/w) p-Nitrophenylphosphat zu jedem Well hinzugefügt, und die Platten wurden für 1 bei 37°C mit 140 U. p. M. bewegt. 50 µl Dinatriumthylendiamintetraessigsäure wurden zu jedem Well hinzugefügt, und kolorimetrische Veränderungen wurden bei 450 nm auf einem Mikrotiterplattenlesegerät 2000 (BioWhittaker, Walkersville, MD) untersucht. Rotavirus-Antigen-Konzentrationen wurden durch Vergleich mit einer Standardkurve, die unter Verwendung von gereinigtem Rotavirus bekannter Konzentration erstellt worden war, bestimmt.

[0192] Inokulierung von Mäusen mit rhodaminmarkierten Mikrokapseln und Verteilung von Mikrokapseln in darmverbundenem Lymphoidgewebe (GALT): Rhodamin-Isothiocyanat (RITC, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) mit einer Konzentration von 1 mg/ml in 50 mM Natriumbicarbonat-Puffer (pH 9,5) wurde an Natriumalginat (1%-ige Lösung in destilliertem Wasser) nach Mischen in gleichen Volumen konjugiert; die Reaktion wurde in der Dunkelheit für 2 Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt. Natriumalginat-RITC wurde dann zur Extinktion mit destilliertem Wasser dialysiert und bei der Bildung von Spermin-Alginat-Mikrokapseln eingesetzt. Die RITC-markierten Mikrokapseln wurden vor der Verwendung fünfmal mit destilliertem Wasser gewaschen.

[0193] Acht Wochen alte weibliche C57BL/6-Mäuse wurden oral mit 20 mg rhodaminmarkierten Mikrokapseln oder 20 mg rhodaminmarkiertem Natriumalginat durch proximale Speiseröhrenintubierung inokuliert. Zwei Mäuse von jeder Gruppe wurden 1, 4, 7, 14, 21 und 28 Tage nach Inokulierung getötet, und die Peyers-Haufen (PP), mesenterischen Lymphknoten (MLN) und Milzen wurden entfernt und manuell zerkleinert. (Milzerythrozyten wurden in AKC-Medium (0,16 M NH<sub>4</sub>Cl, 0,01 M KHCO<sub>3</sub>, pH 7,2) lysiert. Zellen aus allen Geweben wurden für 5 Minuten bei 600× g zentrifugiert, dreimal in RPMI 1640 (GIBCO, Gaithersburg, MD) gewaschen und durch eine Säule von steriler, nicht absorbierender Baumwolle geleitet.  $1 \times 10^4$  Zellen von jedem Gewebe (in einem Volumen von 100 l) wurden auf einem Mikroskopobjektträger unter Verwendung der Cytospin 2 (Shandon Inc., Pittsburgh, PA) mit einer Geschwindigkeit von 1.200 U. p. M. für 5 Minuten zentrifugiert. Die Objektträger wurden für 24 Stunden luftgetrocknet, und die Häufigkeit rhodaminmarkierter Zellen in jeder Zellpopulation wurde durch Fluoreszenzmikroskopie bei einer Wellenlänge von 520 nm bestimmt (Dialux 20, Leitz, Deutschland).

[0194] Aufnahme von rhodaminmarkierten Mikrokapseln durch peritoneale Ausscheidungszellen: Peritoneale Ausscheidungszellen wurden aus erwachsenen C57BL/6-Mäusen nach intraperitonealer Inokulierung mit 5 ml RPMI 1640-Medium erhalten. Ausscheidungszellen wurden zweimal in RPMI 1640 gewaschen und mit einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen pro Milliliter in RPMI 1640, welches 10% FBS enthielt, resuspendiert.  $1 \times 10^4$  Zellen wurden mit etwa 5 mg rhodaminmarkierten Spermin-Alginat-Mikrokapseln für 10 Minuten bei 37°C in einem Inkubator mit 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit einer 1 : 100-Verdünnung in PBS von Anti-MAC 1 (Anti-CD11b) Antikörper, konjugiert mit Fluorescein-Isothiocyanat (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) für 1 Stunde bei Raumtemperatur gefärbt. Die Zellen wurden in PBS gewaschen, in Glycerin-PBS (Citifluor, Citifluor Ltd., London, UK) fixiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie

bei Wellenlängen von 580 nm (zur Feststellung der Fluoreszeinmarkierung) und 520 nm (zur Feststellung der Rhodaminmarkierung) untersucht.

[0195] Feststellung von intrazellulären, für Rotavirus spezifischen Proteinen in GALT durch indirekte Immunfluoreszenz nach Inokulierung von Mäusen mit Rotavirus enthaltenden Mikrokapseln oder freiem Virus: Zwei Gruppen von vier 8 Wochen alten C57BL/6-Mäusen wurden oral mit etwa  $1 \times 10^7$  pfu pro Maus von entweder freiem oder mikroverkapseltem WC3-Virus inokuliert. Paare von Mäusen aus jeder Gruppe wurden 1 oder 4 Tage nach der Inokulierung getötet, und PP, MLN und Milzen wurden entfernt. Die Zellen aus diesen Geweben wurden gesammelt und auf Mikroskopobjektträgern zentrifugiert, wie es oben beschrieben ist. Die Objektträger wurden in Methanol für 10 Minuten fixiert, luftgetrocknet und für 1 Stunde mit 100 µl polyklonalem Hyperimmun-Anti-WC3-Serum vom Kaninchen, 1 : 2.500 in PBS verdünnt, inkubiert. Die Objektträger wurden mit PBS gewaschen und für 1 Stunde mit 100 µl fluoreszeinkonjugiertem Schwein-Anti-Kaninchen-Immunglobulin (Dako Corporation, Carpinteria, CA), 1 : 100 in PBS verdünnt, inkubiert. Die Objektträger wurden mit PBS gewaschen, mit Glycerin-PBS fixiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

[0196] Detektion von für Rotavirus spezifischen Antikörpern mittels ELISA nach oraler oder parenteraler Inokulierung von Mäusen mit mikroverkapseltem oder freiem Virus: Gruppen von zwei bis vier Mäusen wurden 1) intraperitoneal mit  $5 \times 10^4$  oder  $1 \times 10^4$  pfu pro Maus mikroverkapseltem WC3-Rotavirus oder freiem WC3 inokuliert, 2) oral mit  $2,5 \times 10^6$  oder  $6,25 \times 10^5$  pfu pro Maus mikroverkapseltem WC3 oder freiem WC3 inokuliert, 3) oral mit  $6,25 \times 10^4$  oder  $1,25 \times 10^4$  pfu pro Maus mikroverkapseltem RRV-Rotavirus oder freiem RRV inokuliert oder 4) oral mit einem äquivalenten Volumen von flüssigem Überstand einer zum Schein infizierten Zellkultur inokuliert. Drei Wochen nach der Inokulierung wurden Seren durch retroorbitale Kapillarplexuspunktion erhalten und auf das Vorhandensein von Rotavirus bindendem IgG mittels ELISA wie folgt getestet: Einzelne Wells von 96-Well-Platten mit flachem Boden wurden entweder mit PBS oder mit 200 mg gereinigtem WC3 oder RRV, verdünnt in einem Volumen von 100 µl PBS, beschichtet. Die Platten wurden über Nacht bei 4°C gelagert. Die Platten wurden viermal mit PBS gewaschen, und 200 µl 1% BSA, verdünnt in PBS, wurden zu jedem Well hinzugefügt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Weltduplikate wurden viermal mit PBS gewaschen, und 100 µl 2-fach-Verdünnungen von Antiseren (beginnend bei einer Verdünnung von 1 : 100) wurden zu jedem Well hinzugegeben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Wells wurden viermal mit PBS gewaschen, und 100 µl von mit Meerrettichperoxidase konjugiertem Ziege-Anti-Maus-IgG (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL), 1 : 2.000 in 1 % BSA verdünnt, wurden zu jedem Well hinzugefügt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Wells wurden viermal mit PBS gewaschen, und 100 µl einer 0,04%igen Tetramethylbenzidinperoxidase-Lösung (Kierkegaard und Perry, Gaithersburg, MD) wurden hinzugefügt und für 5 Minuten inkubiert. 75 µl einer 85%-igen Phosphorsäurelösung wurden zu jedem Well hinzugefügt, und kolorimetrische Veränderungen wurden bei einer Wellenlänge von 450 nm auf einem Mikroplatten-ELISA-Lesegerät bestimmt. Seren wurden als positiv bewertet, wenn der OD-Wert in virusbeschichteten Wells um  $>0,1$  Einheiten höher war als der OD-Wert von Wells, die nicht mit Virusantigen beschichtet waren.

[0197] Ergebnisse – Wirkung verschiedener wasserlöslicher anionischer Polymere und Amine auf Rotavirus: Im wesentlichen keine Wirkung auf die Rotavirus-Infektiosität fand man für Alginsäure, Zellulosesulfat, Zelluloseacetatphthalat, Carbopol 934®, Carboxymethylzellulose, Polyacrylsäure, Methylenblau und Spermin. Eine 2,5- bis 10-fache Reduzierung der Infektiosität stellte man fest für Heparin, Triethylamin, Triethylentetramin, Arginin, Ethylendiamin und Octadecylamin. Eine 30-fache Reduzierung der Infektiosität beobachtete man für Piperazin, eine 300-fache Reduzierung für Arabinsäure und eine vollständige Auslöschung der Infektiosität für Dodecylamin.

[0198] Fähigkeit von wasserlöslichen Polymeren und Aminen zur Bildung von Mikrokapseln, welche einer Zerstörung durch simulierte Magensäure widerstehen: Sechs wasserlösliche anionische Polymere und sieben wässrige Amine, welche eine minimale Wirkung auf die Rotavirus-Infektiosität zeigten, wurden in Kombination (42 mögliche Kombinationen) hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Bildung stabiler, oligodisperser Mikrokapseln, welche einer Zerstörung durch simulierte Magensäure widerstehen, getestet; 14 der 42 möglichen Kombinationen aus Polymeren und Aminen bildeten Mikrokapseln, die in simulierter Magensäure stabil waren. Diese Kombinationen umfaßten Methylenblau mit entweder Zellulosesulfat oder Zelluloseacetatphthalat, Spermin mit entweder Alginsäure oder Zellulosesulfat, Triethylentetramin mit entweder Alginsäure oder Zellulosesulfat, oder Octadecylamin mit entweder Alginsäure, Zellulosesulfat, Carboxymethylzellulose, Zelluloseacetatphthalat, Polyacrylsäure oder Carbopol 934®.

[0199] Fähigkeit von Natriumalginat-Sperminhydrochlorid-Mikrokapseln, infektiöses Virus einzuschließen: Aus Natriumalginat und Sperminhydrochlorid hergestellte Mikrokapseln wurden für eine weitere Untersuchung ausgewählt, weil 1) weder Natriumalginat noch Sperminhydrochlorid die Rotavirus-Infektiosität verminderten, 2) diese Kombination am einfachsten monodisperse Mikrokapseln bildete, und 3) diese Kombination das größte Volumen an Kapselmateriale lieferte. Zur Bestimmung, ob infektiöses Rotavirus in Mikrokapseln enthalten war, wurde WC3-Virus in Spermin-Alginat-Mikrokapseln verkapselt, und die Mikrokapseln wurden hinsichtlich des Vorhandenseins von infektiösem Virus durch Zerstörung nach mehreren Waschschritten getestet. Infekti-

öses Virus wurde nach 3 Waschschritten nicht in flüssigen Überständen festgestellt, aber es wurde bei der Mikrokapselzerstörung deutlich freigesetzt. Zur Bestimmung, ob infektiöses Virus innerhalb oder auf der Oberfläche von Mikrokapseln angeordnet war, wurde darüber hinaus Virus zu vorher gebildeten Mikrokapseln hinzugegeben, welche gewaschen und in einer ähnlichen Art und Weise zerstört wurden. Infektiöses Virus wurde nach der Zerstörung von vorher gebildeten Mikrokapseln, zu welchen Virus hinzugefügt worden war, nicht freigesetzt. Daher war infektiöses Rotavirus innerhalb der Matrix und nicht nur auf der Oberfläche von Spermin-Alginat-Mikrokapseln lokalisiert.

[0200] Effizienz des Verkapselungsverfahrens, Kernbeladungskapazität und physikalische Eigenschaften von Mikrokapseln: In drei separaten Experimenten fanden wir heraus, daß 1,0%, 2,0% und 6,3% der anfänglichen Menge an infektiösem Virus in der Matrix von Spermin-Alginat-Mikrokapseln verkapselt waren. In gleicher Weise waren 2,0–5,0% der anfänglichen Menge an Virusantigen in Mikrokapseln eingeschlossen. Daher war die Kernbeladungseffizienz sowohl für infektiöses Virus als auch für Virusantigen ähnlich. Die Kernbeladungskapazität (d. h. die Menge an Virusantigen, geteilt durch die Menge an Perlenmaterial (w/w)) betrug etwa 2,0–3,0%. Bei Vergleich mit Latexperlen bekannter Größe mittels Lichtmikroskopie hatte der Hauptanteil der Mikrokapseln eine Größe von etwa 2 µm bei Größen im Bereich von 1–10 µm.

[0201] Aufnahme von rhodaminmarkierten Mikrokapseln durch peritoneale Makrophagen: Rhodaminmarkierte Spermin-Alginat-Mikrokapseln wurden nur in peritonealen Ausscheidungszellen festgestellt, die MAC 1 (CD1 1b) auf ihrer Oberfläche trugen. Etwa 50%–60% aller MAC 1 tragenden Zellen in der Präparation peritonealer Ausscheidungszellen enthielten rhodaminmarkierte Mikrokapseln.

[0202] Verteilung von rhodaminmarkierten Mikrokapseln in GALT nach oraler Inokulierung von Mäusen: Erwachsene C57BL/6-Mäuse wurden oral mit jeweils etwa 20 mg rhodaminmarkierten Spermin-Alginat-Mikrokapseln inokuliert. Rhodaminmarkierte Mikrokapseln wurden bis wenigstens 28 Tage nach der oralen Inokulierung in Zellen der PP, MLN und der Milz festgestellt. Die größte Menge an Mikrokapseln in PP und MLN wurde 4 Tage nach der Inokulierung und in Milz 14 Tage nach der Inokulierung festgestellt. Rhodaminmarkierte Zellen wurden nicht in PP, MLN oder Milzen von Tieren festgestellt, die jeweils mit 20 mg rhodaminmarkiertem Natriumalginat inokuliert worden waren. Daher war das Vorhandensein von rhodaminmarkierten Zellen in GALT nach Inokulierung mit rhodaminmarkierten Mikrokapseln nicht auf eine Zerstörung von Mikrokapseln an der intestinalen Schleimhautoberfläche und Absorption von rhodaminmarkiertem Natriumalginat zurückzuführen, sondern vielmehr auf aktive Phagocytose der Perlen.

[0203] Detektion von für Rotavirus spezifischen Proteinen in GALT durch indirekte Immunfluoreszenz nach Inokulierung von Mäusen mit Rotavirus enthaltenden Mikrokapseln oder freiem Virus: Erwachsene C57BL/6-Mäuse wurden oral mit entweder freiem oder mikroverkapseltem Rotavirusstamm WC3 in einer Dosis von  $1,0 \times 10^7$  pfu pro Maus inokuliert. 1 und 4 Tage nach der Inokulierung wurden Tiere getötet und Zellen von PP, MLN und Milz hinsichtlich des Vorhandenseins von für Rotavirus spezifischen Proteinen durch indirekte Immunfluoreszenz untersucht. Drei bis 5 Zellen, die für Rotavirus spezifische Proteine enthielten, wurden pro  $10^4$  Zellen, erhalten von PP, MLN und Milz, sowohl 1 als auch 4 Tage nach der Inokulierung mit mikroverkapseltem Virus festgestellt. Zellen, die Rotavirus-Antigen enthielten, wurden in Lymphgeweben von Tieren, die mit freiem Virus inokuliert worden waren, nicht festgestellt.

[0204] Wirkung der Mikroverkapselung auf die Rotavirus-Immunogenizität: Zur Feststellung, ob die Verkapselung von infektiösem Rotavirus die Rotavirus-Immunogenizität verstärkte, wurden erwachsene C57BL/6-Mäuse intraperitoneal mit mikroverkapseltem oder freiem RRV inokuliert, und 7 Tage alte CD2 (F1) Säuglingsmäuse wurden oral mit verschiedenen Dosen von entweder freiem oder mikroverkapseltem WC3 oder RRV inokuliert. Drei Wochen später wurden Antiseren erhalten und hinsichtlich des Vorhandenseins von für Rotavirus spezifischem IgG mittels ELISA getestet. Zum Schein infizierte Tiere hatten entsprechend für Rotavirus spezifische IgG Titer  $< 1 : 100$ . Tiere wurden erachtet, eine für Rotavirus spezifische Immunantwort aufzuweisen, wenn die Titer größer als oder gleich  $1 : 400$  waren (d. h. wenigstens ein 4-facher Anstieg der Titer über diejenigen, die man in zum Schein infizierten Tieren feststellte). Drei von vier Tieren, die parenteral entweder mit  $5,0 \times 10^4$  oder  $1,0 \times 10^4$  pfu mikroverkapseltem WC3 inokuliert worden waren, aber keines von vier Tieren, die mit äquivalenten Dosen von freiem WC3 inokuliert worden waren, entwickelten feststellbares, Rotavirus bindendes IgG. In ähnlicher Weise entwickelten drei von drei Mäusen, die oral mit RRV in einer Dosis von  $1,25 \times 10^4$  pfu pro Maus inokuliert worden waren, für Rotavirus spezifisches IgG, verglichen mit 0 von 4, die mit der gleichen Dosis von freiem Virus inokuliert worden waren. Drei von vier Tieren, die mit mikroverkapseltem WC3 in einer Dosis von  $6,25 \times 10^5$  pfu pro Maus inokuliert worden waren, entwickelten für Rotavirus spezifisches IgG, verglichen mit 0 von 4 Tieren, die mit der gleichen Dosis von freiem Virus inokuliert worden waren.

[0205] Dieses Beispiel zeigt, daß infektiöses Rotavirus unter Verwendung eines Systems auf wäßriger Basis mikroverkapselt werden kann. Die sanfte Art des Mikroverkapselungsverfahrens mit geladenem Film erlaubt eher eine Zurückhaltung von viralen Epitopen, die für eine Induzierung von humoralen und zellulären Immunantworten erforderlich sind, als Verfahren, welche die Verwendung organischer Lösungsmittel erfordern. Mehrere zusätzliche Eigenschaften der Mikrokapseln mit geladenem Film machen diese interessant für eine

Verwendung als Antigenauslieferungssysteme. Erstens werden Mikrokapseln in wäßrigen Medien aus Materialien, die im allgemeinen als sicher und biologisch abbaubar angesehen werden, hergestellt. Natriumalginat, ein gelierendes Polysaccharid, das aus Seetang extrahiert wird, wird üblicherweise in Eiscremes, Softdrinks und Salatdressings als Stabilisieren und Verdickungsmittel verwendet. Spermin, ein Derivat von Spermidin, ist ein Polyamin, das man in nahezu allen Säugerzellen findet. Zweitens können Mikrokapseln so hergestellt werden, daß sie einem Abbau durch Magensäure widerstehen. Drittens haben Mikrokapseln einen inneren Volumenanteil, welcher ein effizientes Einschließen von Antigen erlaubt.

[0206] Für Rotavirus-Antigen hat man Kernbeladungskapazitäten von 2,0–3,0% gefunden, verglichen mit etwa 1% für Influenzaprotein enthaltende PLCG-Mikrokapseln. Viertens wird die Mikroverkapselung bei oder unterhalb von Raumtemperatur durchgeführt; unverkapseltes infektiöses Virus kann einfach wiedergewonnen werden. Schließlich lassen sich Mikrokapseln einfach lyophilisieren, preiswert herstellen, einfach an einen kommerziellen Maßstab anpassen und können steril hergestellt werden.

[0207] Bei Verabreichung an Mäuse wurde die höchste Anzahl an fluoreszierenden Spermin-Alginat-Mikrokapseln in PP und MLN 4 Tage nach oralen Inokulierungen und in Milz 14 Tage nach der Inokulierung festgestellt. Diese Beobachtungen sind fast identisch zu denjenigen, die zuvor für Mäuse, die oral mit PLCG-Mikrokapseln inokuliert wurden, beschrieben wurden (Eldridge, J. H. et al., 1989 Curr. Top. Microbiol. Immunol. 146: 59–66; Eldridge, J. H. et al. 1990 J. Controlled Release 11: 205–214; Eldridge, J. H. et al. 1991 Mol. Immunol. 28–287–294). Die Aufnahme von PLCG-Mikrokapseln in PP war von der Größe und der Hydrophobizität der Mikrokapseln abhängig. PLCG-Mikrokapseln mit einem Durchmesser von größer als 10 µm wurden nicht von M-Zellen aufgenommen und in PP internalisiert. PLCG-Mikrokapseln mit Durchmessern im Bereich von 5–10 µm wurden nur in PP festgestellt, und diejenigen mit Durchmessern <5 µm wurden in PP, MLN und Milz festgestellt. Die durchschnittliche Größe von Spermin-Alginat-Mikrokapseln (d. h. 2 µm) ist konsistent mit der Aufnahme von Perlen in PP, MLN und Milz.

[0208] Fluoreszente Spermin-Alginat-Mikrokapseln werden in PP wahrscheinlich von Makrophagen aufgenommen. Detektion von mit Rhodamin markierten Mikrokapseln nur innerhalb solcher peritonealer Ausscheidungszellen, welche MAC 1 (CD11b) auf ihrer Oberfläche tragen, stützt dies. In ähnlicher Weise nehmen Makrophagen PLCG-Mikrokapseln auf, wie es durch das Vorhandensein von MAC 1 auf der Oberfläche von Zellen, die fluoreszeinmarkierte PLCG-Mikrokapseln enthalten, festgestellt wurde. Ob Makrophagen, die Mikrokapseln in PP enthalten, zu MLN und Milz migrieren oder ob freie Mikrokapseln über Lymphgefäße zu MLN und über den Blutstrom zu der Milz wandern (wo sie von lokalen Makrophagen aufgenommen werden), bleibt noch zu bestimmen. Makrophagen machen etwa 5–9% aller Zellen innerhalb von PP aus. Daher deutet unsere Feststellung von mit Rhodamin markierten Spermin-Alginat-Mikrokapseln in bis zu 1,8% aller Zellen innerhalb von PP darauf hin, daß Mikrokapseln von 20–35% der verfügbaren Makrophagen aufgenommen werden.

[0209] Für Rotavirus spezifische Proteine wurden in GALT von Mäusen, die oral mit mikroverkapseltem Rotavirus, aber nicht mit freiem Virus inokuliert worden waren, festgestellt. Die Feststellung von für Rotavirus spezifischen Proteinen nach Inokulierung mit mikroverkapseltem Virus stimmt mit der Auslieferung von größeren Mengen an Virus als nach Inokulierung mit freiem Virus aufgenommen wird an Antigen präsentierende Zellen (welche Perlen aufnehmen) überein. Die Menge an freiem Virus, welches in diesen Experimenten inokuliert wurde, war jedoch ausreichend, eine humorale Immunantwort zu induzieren. Das Unvermögen, für Rotavirus spezifische Proteine in Antigen präsentierenden GALT-Zellen (in Tieren, die mit freiem Virus inokuliert worden waren) nachzuweisen, spiegelt wahrscheinlich die Tatsache wider, daß Antigen in zu kleinen Mengen oder in einer zu geringen Anzahl von Zellen erzeugt wird, als daß es nach heterologer Virusinfektion des Wirtes festgestellt werden kann. Für Rotavirus spezifische Antigene wurden in GALT nach oraler Inokulierung von Säuglingsmäusen mit homologen Wirts-(d. h. Maus-)Rotaviren festgestellt.

[0210] Orale oder parenterale Inokulierung von Mäusen mit mikroverkapselten Rotaviren induzierte eine virusspezifische Antikörperreaktion, die stärker war als diejenige, die nach Inokulierung mit der gleichen Dosis an freiem Virus induziert wurde.

[0211] Obwohl bestimmte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung oben beschrieben und/oder beispielhaft dargestellt wurden, wird der Fachmann anhand der vorausgegangenen Offenbarung verschiedene andere Ausführungsformen erkennen. Die vorliegende Erfindung ist daher nicht auf die bestimmten beschriebenen und/oder beispielhaft dargestellten Ausführungsformen beschränkt, sondern unterliegt beträchtlicher Variation und Modifikation, ohne vom Umfang der anhängenden Patentansprüche abzuweichen.

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Mikrokapseln, die einen wäßrigen Kern umfassen, der von einer Lewis-Salzkapselwand umgeben ist, wobei die Lewis-Salzkapselwand das Reaktionsprodukt eines ausgewählten wasserlöslichen anionischen Polymers oder eines wasserlöslichen Salzes davon mit einem ausgewählten wasserlöslichen Amin oder einem wasserlöslichen Salz davon umfaßt, wobei das anionische Polymer und das Amin unter Paaren von anionischem Polymer und Amin ausgewählt sind, welche die Eigenschaft haben, daß,

wenn Tropfen einer wäßrigen Lösung des gepaarten Polymers in eine wäßrige Lösung des gepaarten Amins eingebracht werden, stabile Mikrokapseln aus dem Aminsalt des anionischen Polymers gebildet werden, wobei das Verfahren die Stufen umfaßt, bei denen man

- a) das ausgewählte anionische Polymer oder das Salz davon unter Bildung einer Lösung des anionischen Polymers in Wasser löst,
- b) das ausgewählte Amin oder das Salz davon unter Bildung einer Aminlösung in Wasser löst,
- c) die Lösung des anionischen Polymers in der Form von Tropfen oder eines unterbrochenen feinen Stroms zu der Aminlösung hinzugibt, so daß die Mikrokapseln gebildet werden, und
- d) die Mikrokapseln gewinnt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das anionische Polymer eine reaktive Carboxylat- oder Sulfatgruppe aufweist und aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Alginsäuren, mit einem Fluorophor verbundenen Alginsäuren, Arabinsäure, Zellulosesulfat, Carboxymethylzellulose, Carrageenane, Chondroitinsulfat, Heparin, Polyacrylsäure, polyoxyethylenvernetzte Acrylsäure und Polyvinylcarbonsäure besteht.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das Fluorophor unter Fluoreszeinisothiocyanat und Rhodaminisothiocyanat ausgewählt ist.

4. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Amin eine Mono-, Di-, Tri- oder Tetra-Aminoverbindung ist, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Arginin, Decylamin, Dodecylamin, Ethylendiamin, Piperazin, Methylenblau, Octadecylamin, Triethylamin, Triethylentetramin und Spermin besteht.

5. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das anionische Polymer unter Polyacrylsäure, Polyvinylcarbonsäure, Alginsäure, polyoxyethylenvernetzter Acrylsäure, Zellulosesulfat, Carboxymethylzellulose, Heparin und Chondroitinsulfat ausgewählt ist und das Amin unter Spermin, Decylamin, Dodecylamin, Tetradecylamin, Methylenblau, Hexadecylamin und Octadecylamin ausgewählt ist.

6. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das anionische Polymer unter Polyacrylsäure, Polyvinylcarbonsäure und Zellulosesulfat ausgewählt ist und das Amin unter Ethylendiamin und Triethylentetramin ausgewählt ist.

7. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das anionische Polymer Polyvinylcarbonsäure, Polyacrylsäure oder Alginsäure und das Amin Triethylamin, Arginin oder Piperazin ist.

8. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das anionische Polymer Arabinsäure ist und das Amin unter Decylamin, Dodecylamin, Tetradecylamin, Methylenblau, Hexadecylamin und Octadecylamin ausgewählt ist.

9. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der wäßrige Kern von einer Kapselwand umgeben ist, umfassend das Reaktionsprodukt von

- a) Methylenblau oder einem wasserlöslichen Salz davon mit Zellulosesulfat oder einem wasserlöslichen Salz davon,
- b) Methylenblau oder einem wasserlöslichen Salz davon mit Zelluloseacetatphthalat oder einem wasserlöslichen Salz davon,
- c) Spermin oder einem wasserlöslichen Salz davon mit Alginsäure oder einem wasserlöslichen Salz davon,
- d) Spermin oder einem wasserlöslichen Salz davon mit Zellulosesulfat oder einem wasserlöslichen Salz davon,
- e) Spermin oder einem wasserlöslichen Salz davon mit Chondroitinsulfat oder einem wasserlöslichen Salz davon,
- f) Triethylentetramin oder einem wasserlöslichen Salz davon mit Alginsäure oder einem wasserlöslichen Salz davon,
- g) Triethylentetramin oder einem wasserlöslichen Salz davon mit Zellulosesulfat oder einem wasserlöslichen Salz davon,
- h) Octadecylamin oder einem wasserlöslichen Salz davon mit Alginsäure oder einem wasserlöslichen Salz davon,
- i) Octadecylamin oder einem wasserlöslichen Salz davon mit Zellulosesulfat oder einem wasserlöslichen Salz davon,
- j) Octadecylamin oder einem wasserlöslichen Salz davon mit Carboxymethylzellulose oder einem wasserlöslichen Salz davon,
- k) Octadecylamin oder einem wasserlöslichen Salz davon mit Zelluloseacetatphthalat oder einem wasserlöslichen Salz davon oder
- l) Octadecylamin oder einem wasserlöslichen Salz davon mit Polyacrylsäure oder einem wasserlöslichen Salz



davon.

10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei die Kapselwand das Reaktionsprodukt von Spermin oder einem wasserlöslichen Salz davon mit Alginsäure oder einem wasserlöslichen Salz davon umfaßt.

11. Verfahren nach Anspruch 9, wobei die Kapselwand das Reaktionsprodukt von Spermin oder einem wasserlöslichen Salz davon mit Chondroitinsulfat oder einem wasserlöslichen Salz davon umfaßt.

12. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das anionische Polymer ein durchschnittliches Molekulargewicht von mehr als 10 kD aufweist.

13. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Mikrokapseln eine Teilchengröße im Bereich zwischen 0,1 bis 2000 Mikrometern aufweisen.

14. Verfahren nach Anspruch 1 mit der weiteren Stufe, in der man einen aktiven Bestandteil in der Lösung des anionischen Polymers aus Stufe a) löst oder suspendiert, bevor man Stufe c) durchführt.

15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei der aktive Bestandteil aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus natürlich vorkommenden und biotechnologisch erhaltenen proteinhaltigen Materialien, natürlich vorkommenden und biotechnologisch erhaltenen proteinhaltigen Makromolekülen, Zellen, Arzneimitteln, Antibiotika, Farbstoffen und Pigmenten besteht.

16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei das proteinhaltige Material unter Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Calcitonin, Erythropoietin, Hämoglobin, Insulin, Interleukin, Somatotropin und larviziden Proteinen von *Bacillus thuringiensis* ausgewählt ist.

17. Verfahren nach Anspruch 15, wobei das nicht proteinhaltige Makromolekül Heparin ist.

18. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die Zellen unter Pankreas-Inselzellen, Hepatozyten und Interleukin oder andere Immunmodulatoren segregierenden Zellen, die vom Menschen oder anderen Spezies erhalten wurden, ausgewählt sind.

19. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die Arzneimittel und Antibiotika unter Fluorouracil, Prednisolon, Indomethacin, Tetracyclin, Theophyllin und Nikotinamid ausgewählt sind.

20. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die Farbstoffe und Pigmente aus der Gruppe ausgewählt sind, die aus Dextranblau, Phenolrot und Kohle besteht.

21. Verfahren nach Anspruch 14, wobei der aktive Bestandteil eine immunogene Substanz ist.

22. Verfahren nach Anspruch 21, wobei die immunogene Substanz wenigstens ein Mitglied umfaßt, das aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Proteinen, Peptiden, viralen Teilchen, prokaryontischen Organismen, Protozoenorganismen und multizellulären Parasiten besteht.

23. Verfahren nach Anspruch 14, wobei der aktive Bestandteil Rotavirus ist.

24. Verfahren nach Anspruch 23, wobei das Rotavirus aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Boviner WC3 (ATCC-Hinterlegungsnummer VR-2102), HCR3a (ATCC-Hinterlegungsnummer VR-2325), boviner WC3, modifiziert mit humanem vp4 W179, boviner WC3, modifiziert mit humanem W178-8, boviner WC3, modifiziert mit humanem W179-9 (ATCC-Hinterlegungsnummer VR-2194 und VR-2196) oder mit SC2-9 (ATCC-Hinterlegungsnummer VR-2417), boviner WC3, modifiziert mit humanem W179-4, 9 (ATCC-Hinterlegungsnummer VR-2415) und W179-4 (ATCC-Hinterlegungsnummer VR-2377), boviner WC3, modifiziert mit humanem vp4 DS1 (ATCC-Hinterlegungsnummer VR-2416), boviner WC3, modifiziert mit humanem Bricout B-9, boviner WC3, modifiziert mit humanem vp4 Bricout A, HCR3a, modifiziert mit humanem W179-9 (ATCC-Hinterlegungsnummer VR 2324), Rhesusrotavirus RRV, RRV modifiziert mit humanem Wa-9, RRV, modifiziert mit humanem DS1-9, RRV, modifiziert mit humanem P-9, und RRV, modifiziert mit humanem SC3-9.

25. Verfahren nach Anspruch 14, wobei die Mikrokapseln eine Teilchengröße im Bereich zwischen 500 und 1000 Mikrometern haben.

26. Verfahren nach Anspruch 14, wobei die Mikrokapseln eine Teilchengröße im Bereich zwischen 1 und 10 Mikrometern haben.
27. Verfahren nach Anspruch 14, welches nach der Stufe d) weiterhin ein Lyophilisieren der Mikrokapseln umfaßt.
28. Verfahren nach Anspruch 14, welches nach der Stufe d) weiterhin ein Beschichten der Mikrokapseln mit einer enteritischen Beschichtung umfaßt.
29. Verfahren nach Anspruch 28, wobei die enteritische Beschichtung ein Material umfaßt, das unter Zelloseacetatphthalat und polyoxyethylenvernetzter Polymethacrylsäure ausgewählt ist.
30. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Lösung des anionischen Polymers eine Viskosität von wenigstens 2,5 Centipoise aufweist.
31. Verfahren nach Anspruch 1, wobei wenigstens ein Teil der Aminlösung, zu welcher die Lösung des anionischen Polymers hinzugefügt wird, in Bewegung ist.
32. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Lösung des anionischen Polymers einer Schallstimulation unterzogen und zu der Aminlösung hinzugegeben wird.
33. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Polymerlösungstropfen mit im wesentlichen gleichmäßigen Abmessungen durch mechanisches Unterbrechen eines dünnen fließenden Stroms der Polymerlösung unmittelbar vor dem Zeitpunkt, zu dem die Polymerlösung zu der Aminlösung hinzugegeben wird, gebildet werden.
34. Verfahren nach Anspruch 33, wobei der dünne fließende Strom von Polymerlösung durch Schallstimulation unterbrochen wird.
35. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem man
- a) ein wasserlösliches anionisches Polymer oder ein wasserlösliches Salz davon und ein wasserlösliches Amin oder ein wasserlösliches Salz davon auswählt, wobei das anionische Polymer und das Amin unter Paaren von anionischem Polymer und Amin ausgewählt sind, welche die Eigenschaft haben, daß, wenn Tropfen einer wäßrigen Lösung des gepaarten Polymers in eine wäßrige Lösung des gepaarten Amins eingebracht werden, stabile Mikrokapseln des Aminsalzes des anionischen Polymers gebildet werden,
  - b) das ausgewählte anionische Polymer oder das Salz davon unter Bildung einer Lösung des anionischen Polymers mit einer Viskosität von wenigstens 2,5 Centipoise in Wasser löst,
  - c) das ausgewählte Amin oder das Salz davon unter Bildung einer Aminlösung in Wasser löst,
  - d) einen Tropfen der Lösung des anionischen Polymers ausbildet,
  - e) den Tropfen der Lösung des anionischen Polymers zu der Aminlösung hinzugibt,
  - f) zuläßt, daß der Tropfen und die Aminlösung im wesentlichen sofort an ihrer gemeinsamen Grenzfläche unter Ausbildung einer Mikrokapsel, die einen Film aus einem Salz der ausgewählten Säure und der ausgewählten Base aufweist, reagieren.
36. Verfahren nach Anspruch 13, wobei die Mikrokapseln eine Teilchengröße im Bereich von 500 bis 1000 Mikrometern aufweisen.
37. Verfahren nach Anspruch 13, wobei die Mikrokapseln eine Teilchengröße im Bereich von 1 bis 10 Mikrometern aufweisen.
38. Verfahren nach Anspruch 14, wobei der aktive Bestandteil eine Zelle ist.
39. Verfahren nach Anspruch 14, wobei der aktive Bestandteil ein Arzneimittel ist.
40. Verfahren nach Anspruch 14, wobei der aktive Bestandteil ein Farbstoff oder ein Pigment ist.
41. Verfahren nach Anspruch 38, wobei die Zelle eine Interleukin segregierende Zelle ist.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

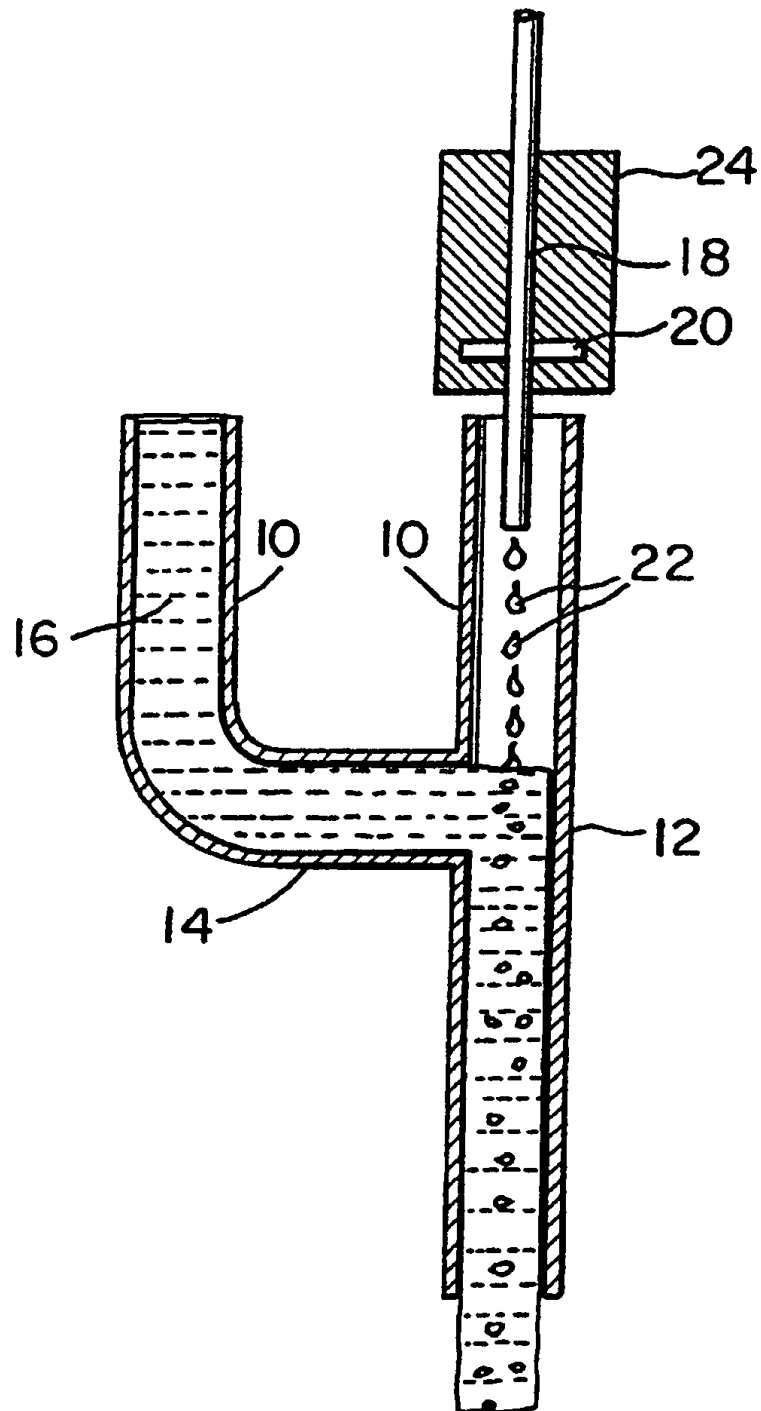


FIG. 1