



(12) PATENTSKRIFT

Patent- og
Varemærkestyrelsen

- (51) Int.Cl⁷: A 61 K 9/50
(21) Patentansøgning nr: PA 2005 00083
(22) Indleveringsdag: 2005-01-17
(24) Løbedag: 1989-03-16
(41) Alm. tilgængelig: 2005-01-17
(45) Patentets meddelelse bkg. den: 2005-09-05
(30) Prioritet: 1988-03-18 US 169,973
- (73) Patenthaver: Southern Research Institute, 2000 Ninth Avenue, South, P.O. Box 55305, Birmingham, Alabama 35255-5305, USA
The UAB Research Foundation, University Station, Birmingham, Alabama 35294, USA
- (72) Opfinder: John H. Eldridge, 2335 Deerwood Road, Jefferson County, Birmingham, Alabama 35120, USA
Richard M. Gilley, 4020 Royal Oak Circle, Jefferson County, Birmingham, Alabama, 35243, USA
Jay K. Staas, 5079 Darlene Drive, Jefferson County, Birmingham, Alabama 35120, USA
Thomas R. Tice, 1915 Forest River Court, Shelby County, Birmingham, Alabama, 35244, USA
- (74) Fuldmægtig: Zacco Denmark A/S, Hans Bekkevolds Allé 7, 2900 Hellerup, Danmark
-

(54) Benævnelse: Anvendelse af biokompatible mikrokapsler, sammensætning indeholdende biokompatible mikrokapsler samt fremgangsmåde til fremstilling af en farmaceutisk sammensætning til potensering af et immunrespons

(57) Sammendrag:

Fremgangsmåde og præparater til indføring af et bioaktivt stof, fortrinsvis et antigen, i et dyr, hvorved en effektiv mængde af det bioaktive stof indkapsles i et biokompatibelt excipients til dannelse af mikrokapsler med en størrelse mindre end ca. 10 µm, og en effektiv mængde af mikrokapslerne indgives, fortrinsvis oralt, til dyret. Det bioaktive stof indkapsles fortrinsvis i en bioaktiv polymer eller copolymer, som kan passere gennem mave-tarmkanalen eller eksistere på en slimhindeoverflade uden at blive nedbrudt eller med et minimum af nedbrydning, således at det bioaktive stof når frem til og føres ind i de Peyerske plaques eller andre slimhindeassocierede lymfoide væv i uændret form og i effektive mængder til at stimulere det systemiske eller det slimhindeassocierede immunsystem. Der opnås et pulserende respons, såvel som slimhinde- og systemisk immunitet.

Den foreliggende opfindelse angår en sammensætning, fremgangsmåde til fremstilling af denne sammensætning, samt anvendelse til fremstilling af en sammensætning til indgivelse af et bioaktivt stof til potensering af immun respons hos et menneske eller andet dyr. Endvidere angår opfindelsen anvendelse af mikrokapsler til indføring af den bioaktive sammensætning, hvor et bioaktivt middel er indkapslet i en eller flere biokompatible polymer- eller copolymerexcipienser, fortrinsvis en bionedbrydelig polymer eller copolymer, som på grund af den passende størrelse og de fysisk-kemiske egenskaber deraf medfører, at mikrokapslerne og det deri indeholdte stof når frem til og på effektiv vis optages af de i dyrets mavetarmkanal beliggende follikulære lymfatiske aggregater, også kendt som de Peyerske plaques, uden at virkningen går tabt på grund af stoffets passage gennem mavetarmkanalen. Lignende follikulære lymfatiske aggregater findes i respirationsvejene, køns- og urinvejene, tyktarmen og andre slimhindevæv i kroppen. I det følgende benævnes de ovennævnte væv generelt som "slimhindeassocierede lymfoide væv".

Det er velkendt at anvende mikroindkapsling til beskyttelse af følsomme bioaktive stoffer mod nedbrydning. Typisk indkapsles et bioaktivt stof inde i et vilkårligt antal beskyttende vægmaterialer, sædvanligvis af polymer art. Stoffet, der skal indkapsles, kan overtrækkes med en enkelt væg af polymert materiale (mikrokapsler) eller kan dispergeres homogent i en polymer matrix (mikrosfærer). (I det følgende henviser udtrykket "mikrokapsler" til både mikrokapsler og mikrosfærer). Stoffmængden inde i mikrokapslen kan varieres efter ønske og spænder fra en lille mængde til så meget som 95 % eller derover af mikrokapslens sammensætning. Mikrokapslens diameter kan også varieres efter ønske, og spænder fra 1 μm til så stor som 3 mm eller derover.

De Peyerske plaques er aggregater af lymfoide småknuder, som er beliggende i tyndtarmens, tyktarmens og blindtarmens vægge, hvor de udgør en vigtig del af kroppens forsvar mod adhæring og penetration af infektiøse stoffer og andre for kroppen fremmede stoffer. Antigener er stoffer, der inducerer kroppens antistofdannende og/eller cellemedierede immunsystemer, og

kan omfatte fremmed protein eller væv. Det ved interaktion mellem et antigen og immunsystemet inducerede immunologiske respons kan være enten positivt eller negativt, hvad angår kroppens evne til ved en senere udsættelse for antigenet at iværksætte et antistof- eller cellemedieret immunrespons over for dette. Et cellemedieret immunrespons omfatter for eksempel drab af fremmede celler eller væv, "cellemedieret cytotoxicitet", og hypersensitivitetsreaktioner af den forsinkede type. Antistoffer tilhører en klasse proteiner kaldet immunglobuliner (Ig), der dannes som respons på et antigen, og som specifikt forbinder sig med antigenet. Når et antistof forbindes med et antigen, danner de et kompleks. Dette kompleks kan hjælpe til at udrense antigenet fra kroppen, hjælpe til at dræbe levende antigener, såsom infektiøse stoffer og fremmede væv eller cancerarter, og neutralisere toxiners eller enzyms aktivitet. Når det drejer sig om kroppens slimhindeoverflader, er den i størst mængde forekommende antistofklasse, som findes i sekretene, der bader disse steder, sekretorisk immunglobulin A (sIgA). Sekretoriske IgA antistoffer forhindrer, at infektiøse stoffer og andre antigener adhærer til og penetrerer gennem kroppens slimhindevæv.

Selv om adskillige antigener kommer ind i kroppen gennem slimhindevævene, inducerer almindeligt anvendte immuniseringsmetoder, såsom intramuskulær eller subcutan injektion af antigener eller vacciner, sjældent forekomst af sIgA antistoffer i slimhindesekretet. Sekretoriske IgA antistoffer induceres mest effektivt gennem direkte immunisering af de slimhindeassocierede lymfoide væv, hvoraf den største masse i kroppen udgøres af de Peyerske plaques i mavetarmkanalen.

I de Peyerske plaques er der IgA prækursor B-celler, som kan tage plads i mavetarmkanalens og de øvre luftvejes lamina propria områder og differentiere til modne IgA-syntetiserende plasmaceller. Det er disse plasmaceller, som rent faktisk secernerer antistofmolekylerne. Undersøgelser foretaget af Heremans og Bazin til måling af udvikling af IgA-responser i mus, der var peroralt immuniseret med antigen, viste, at der forekom en sekventiel optræden af antigen-specifikke IgA-plasmaceller, først i lymfeknuder i mesenteriet,

senere i milten og til slut i mavetarmkanalens lamina propria [Bazin, H., Levi, G. og Doria, G., "Predominant contribution of IgA antibody-forming cells to an immune response detected in extraintestinal lymphoid tissues of germ free mice exposed to antigen via the oral route", *J. Immunol.* 105:1049, (1970), og
5 Crabbe, P.A., Nash, D.R., Bazin, H., Eyssen, H. og Heremans, J.F., "Antibodies of the IgA type in intestinal plasma cells of germ-free mice after oral or parenteral immunization with ferritin", *J. Exp. Med.* 130:723, (1969)]. Senere undersøgelser har vist, at peroral administrering af antigener fører til dannelse af sIgA-antistoffer i tarmen og også i slimhindesekretioner, der forekommer længere væk fra tarmen, f.eks. i bronchials skylninger, colostrum, mælk, spyt og tårer [Mestecky, J., McGhee, J.R., Arnold, R.R., Michalek, S.M., Prince, S.J. og Babb, J.L., "Selective induction of an immune response in human external secretions by ingestion of bacterial antigen", *J. Clin. Invest.* 61:731, (1978); Montgomery, P.C., Rosner, B.R. og Cohen, J., "The secretory antibody response. Anti-DNP antibodies induced by dinitrophenylated Type III pneumococcus", *Immunol. Commun.* 3:143, (1974), og Hanson, L.A., Ahistedt, S., Carlsson, B., Kaijser, B., Larsson, P., Mattsby Baltzer, A., Sohl Akerlund, A., Svanborg Eden, C. og Dvennerholm, A.M., "Secretory IgA antibodies to enterobacterial virulence antigens: their induction and possible relevance", *Adv. Exp. Med. Biol.* 1007:165, (1978)]. Det er derfor tydeligt, at de Peyerske plaques er en beriget kilde til prækursor IgA-celler, som efter antigen-sensibilisering cirkulerer og er årsag til, at IgA udtrykkes i såvel området for den oprindelige udsættelse for antigen som på slimhindeoverflader langt derfra. Dette cirkulerende mønster giver et slimhinde-immunrespons ved
10 15 20 25 kontinuerligt at transportere sensibiliserede B celler til slimhinder, hvor der sker respons på i tarmen mødte antigener fra omgivelserne eller potentielle patogener.

Af særlig vigtighed for den foreliggende opfindelse er evnen til ved oral immunisering at inducere beskyttende antistoffer. Det er kendt, at dyrs indtagelse af antigener fører til forekomsten af antigen-specifikke sIgA antistoffer i bronchial- og næseskylninger. For eksempel viser undersøgelser foretaget
30

med frivillige mennesker, at oral administrering af influenzavaccine er effektiv til inducering af sekretoriske anti-influenza antistoffer i næsesekretorer.

5 Omfattende undersøgelser har vist, at det er muligt ved oral immunisering at inducere det almindelige slimhinde-immunsystem, men bortset fra sjældne undtagelser har de store doser, som er nødvendige til opnåelse af effektiv immunisering, gjort denne fremgangsmåde upraktisk. Det fremgår, at enhver metode eller præparat, der indebærer oral administrering af en bestanddel, skal være udformet således, at stoffet beskyttes mod nedbrydning under 10 passage gennem mavetarmkanalen og målrettet indfører bestanddelen i de Peyerske plaques. Hvis dette ikke er tilfældet, så vil bestanddelen, hvis den overhovedet når frem til de Peyerske plaques, forefindes i en utilstrækkelig mængde eller være i en ineffektiv tilstand.

15 Der er derfor et behov for en fremgangsmåde til oral immunisering, som på effektiv vis kan stimulere immunsystemet og overvinde problemet med nedbrydning af antigenet under dets passage gennem mavetarmkanalen til de Peyerske plaques. Når først antigenet er inde i kroppen, er der et særligt behov for en fremgangsmåde til målretning af antigenet til de Peyerske plaques og frigivelse af antigenet,. Der er også et behov for en fremgangsmåde til 20 immunisering gennem andre af kroppens slimhindevæv, hvorved problemerne med nedbrydning af antigenet og målretning af dets indføring i de slimhinde-associerede lymfoide væv kan overvindes. Endvidere er der et behov for beskyttelse mod nedbrydning af på slimhinden påførte bioaktive stoffer, forbedring og/eller målretning af deres indtrængen i kroppen gennem de slimhindeassocierede lymfoide væv og frigivelse af det bioaktive stof, når det 25 først er kommet ind i kroppen.

SAMMENFATNING AF OPFINDELSEN

30

Opfindelsen angår en metode og et præparat til på målrettet vis at føre et bioaktivt stof ind i og derpå frigive det i et dyrs krop ved påføring på slimhinden. Stoffet er mikroindkapslet i en fortrinsvis bionedbrydelig biokompatibel

polymer eller copolymer, som kan passere gennem mavetarmkanalen eller eksistere på en slimhindeoverflade uden at blive nedbrudt eller med kun et minimum af nedbrydning, således at stoffet uændret og i effektive mængder når frem til og kommer ind i de Peyerske plaques eller andre slimhinde-associerede lymfoide væv. Med udtrykket "biokompatibel" menes der et polymert materiale, som ikke er toksisk for kroppen, ikke er carcinogent og som ikke inducerer inflammation i kropsvæv. Fortrinsvis er den polymere mikrokapsel-excipiens bionedbrydelig på en sådan måde, at den ved kropsprocesser nedbrydes til produkter, som kroppen let kan bortskaffe, og som derfor ikke akkumulerer i kroppen. Mikrokapslerne er også af en sådan størrelse og fysisk-kemisk sammensætning, at de på effektiv og selektiv vis kan optages af de Peyerske plaques. Således er problemene forbundet med, at stoffet når frem til de Peyerske plaques eller andre slimhinde-associerede væv og optages der, løst.

15

Den foreliggende opfindelse angår en sammensætning til indgivelse af et bioaktivt stof til det slimhinde associerede lymforetikulære væv hos et menneske eller et andet dyr, som omfatter:

- biokompatible mikrokapsler, som omfatter et bioaktivt stof indkapslet i en biokompatibel exciapiens og som har en størrelse fra 1 μm til mindre end 5 μm , til selektiv absorption i og passage gennem det slimhinde associerede lymforetikulære væv for tilvejebringelse af systemisk immunitet, og
 - biokompatible mikrokapsler, som omfatter et bioaktivt stof indkapslet i en biokompatibel exciapiens og som har en størrelse fra 5 μm til mindre en 10 μm , til selektive absorption og tilbageholdelse i det slimhinde associerede lymforetikulære væv for tilvejebringelse af slimhinde immunitet,
- i en kombineret sammensætning til potensering af immun respons hos et menneske eller andet dyr. Foretrukne udførelsesformer er angivet i krav 2-8.

30 Den foreliggende opfindelse angår også en anvendelse til fremstilling af en sammensætning, samt en fremgangsmåde til fremstilling af en sammensætning, som er i stand til at blive selektivt absorberet af det slimhinde associe-

rede lymforetikulære væv for tilvejebringelse af både systemisk og slimhinde immunitet hos et menneske eller et dyr, af

(1) biokompatible mikrokapsler, som omfatter et bioaktivt stof indkapslet i en biokompatibel excipients og som har en størrelse fra 1 μm til mindre en 5 μm for tilvejebringelse af systemisk immunitet og

(2) biokompatible mikrokapsler, som omfatter et bioaktivt stof indkapslet i en biokompatibel excipients og som har en størrelse på mellem 5 μm og 10 μm for tilvejebringelse af slimhinde immunitet.

10 Den foreliggende opfindelse angår også anvendelse til fremstilling af en sammensætning for tilvejebringelse af systemisk eller slimhinde immunitet, af biokompatible mikrokapsler, som omfatter et bioaktivt stof indkapslet i en biokompatibel excipients og som har en størrelse fra 1 μm til mindre end 5 μm til absorption i og passage gennem slimhinde associerede lymforetikulære væv.

15 Endvidere angår opfindelsen en sammensætning til potensering af immun respons i et menneske eller et andet dyr, som omfatter en blanding af et første frit bioaktivt stof, som tilvejebringer et primært respons og biokompatible mikrokapsler, som har en størrelse mellem 1 μm og 10 μm og som indeholder et sekundært bioaktivt stof indkapslet i en biokompatibel excipients til pulserende frigørelse for at opnå et efterfølgende respons. Foretrukne udførelsesformer er blandt andet angivet i krav 16 - 19.

25 Endvidere angår opfindelsen også en fremgangsmåde til fremstilling af en farmaceutisk sammensætning til inducering af et immun respons, som omfatter indkapsling af et første bioaktivt stof valgt blandt antigener, allergener, lymfokiner, cytokiner, monokiner og immunomodulatorer i en biokompatibel excipients til dannelse af mikrokapsler, som har en størrelse på mellem 1 μm og 10 μm , samt tilsætning af et andet bioaktivt stof i fri form til mikrokapslerne i sammensætningen. Foretrukne udførelsesformer er blandt andet angivet i krav 20 - 21.

30

Endnu et formål med opfindelsen er at anvise en anvendelse af mikrokapsler, som har en størrelse mellem 1 μm og 10 μm og som indeholder et bioaktivt stof indkapslet i en biokompatibel excipiens til fremstilling af en injektions sammensætning til potensering af immun respons hos mennesker eller andre dyr, forudsat at excipiensen ikke er et proteinoid, polyacryl stivelse eller krystalliseret carbohydrat, hvor det bioaktive stof omfatter en peptid, et protein eller en nukleinsyre. Excipiensen kan være hydrofob og/eller den kan omfatte en poly(DL-lactid-co-glycolid), en poly(L-lactid), en poly(DL-lactid) en poly(glycolid), en copolyoxalat, en polycaprolactone, en poly(lactid-co-caprolacton), en poly(esteramid), en polyortester, en poly(β -hydroxy butansyre) eller en polyanhydrid eller en blanding deraf. Foretrukne udførelsesformer er angivet i krav 25 -26.

Opfindelsen angår også en anvendelse af mikrokapsler, som har en størrelse mindre end ca. 10 μm og som indeholder et immunogen indkapslet i en biokompatibel excipiens, til fremstilling af et middel til indgivelse nasalt, rektalt, oftalmisk, intratrachealt eller ved oral inhalering til slimhindeassocierede lymforetikulære væv i mennesker eller dyr, hvor det bioaktive stof omfatter et peptid, et protein eller en nukleinsyre. Foretrukne udførelsesformer er angivet i krav 28 -30.

Opfindelsen angår også en anvendelse af mikrokapsler, som har en størrelse mellem 1 μm og 10 μm og som indeholder et bioaktivt stof indkapslet i en biokompatibel excipiens til fremstilling af en injektions sammensætning til potensering af immun respons hos mennesker eller andre dyr, forudsat at excipiensen ikke er et proteinoid, polyacryl stivelse eller krystalliseret carbohydrat, hvor det bioaktive stof endvidere inkluderer en adjuvans.

Opfindelsen angår også en anvendelse af mikrokapsler, som har en størrelse mellem 1 μm og 10 μm og som indeholder et bioaktivt stof indkapslet i en

biokompatibel excipients til fremstilling af en injektions sammensætning til
potensering af immun respons hos mennesker eller andre dyr, hvor det
bioaktive stof endvidere inkluderer en adjuvans. Excipiensen kan være hy-
drofob, men kan omfatte en poly(DL-lactid-co-glycolid), en poly(L-lactid), en
5 poly(DL-lactid) en poly(glycolid), en copolyoxalat, en polycaprolactone, en
poly(lactid-co-caprolacton), en poly(esteramid), en polyortester, en poly(β -
hydroxy butansyre) eller en polyanhydrid eller en blanding deraf.

Opfindelsen angår også en anvendelse af mikrokapsler, som har en størrelse
10 mindre end ca. 10 μm og som indeholder et immunogen indkapslet i en bio-
kompatibel excipients, til fremstilling af et middel til indgivelse nasalt, rektalt,
oftalmisk, intratrachealt eller ved oral inhalering til slimhindeassocierede lym-
foretikulære væv i mennesker eller dyr, hvor det bioaktive stof endvidere in-
kluderer en adjuvans. Foretrukne udførelsesformer er angivet i krav 35 -38,
15 samt krav 44.

Opfindelsen angår også en anvendelse af mikrokapsler, som har en størrelse
mellem 1 μm og 10 μm og som indeholder et bioaktivt stof indkapslet i en
biokompatibel excipients til fremstilling af en injektions sammensætning til
20 potencering af immun respons hos mennesker eller andre dyr, forudsat at
excipiensen ikke er et proteinoid, polyacryl stivelse eller krystalliseret carbo-
hydrat, hvor det bioaktive stof endvidere inkluderer en blanding af et antigen
og cytokin.

25 Opfindelsen angår også en anvendelse af mikrokapsler, som har en størrelse
mellem 1 μm og 10 μm og som indeholder et bioaktivt stof indkapslet i en
biokompatibel excipients til fremstilling af en injektions sammensætning til
potencering af immun respons hos mennesker eller andre dyr, hvor det
bioaktive stof endvidere inkluderer en blanding af et antigen og cytokin.

30

Opfindelsen angår også en anvendelse af mikrokapsler, som har en størrelse mellem 1 μm og 10 μm og som indeholder et bioaktivt stof indkapslet i en biokompatibel excipients, hvor excipiensen omfatter en poly(DL-lactid-co-glycolid), en poly(L-lactid), en poly(DL-lactid) en poly(glycolid), en copolyoxalat, en polycaprolactone, en poly(lactid-co-caprolacton), en poly(esteramid), en polyortester, en poly(β -hydroxy butansyre) eller en polyanhydrid eller en blanding deraf, til fremstilling af en injektions sammensætning til potensering af immun respons hos et menneske eller et andet dyr, hvor det bioaktive stof omfatter en blanding af et antigen og cytokin.

10

Opfindelsen angår også en anvendelse af mikrokapsler, som har en størrelse mindre end ca. 10 μm og som indeholder et immunogen indkapslet i en biokompatibel excipients, til fremstilling af et middel til indgivelse nasalt, rektalt, oftalmisk, intratrachealt eller ved oral inhalering til slimhindeassocierede lymforetikulære væv i mennesker eller dyr, hvor det bioaktive stof omfatter en blanding af et antigen og cytokin. En foretrukken udførelsesform er angivet i krav 43.

15

Et formål med opfindelsen er således at angive en sammensætning til indgivelse af et bioaktivt stof til det slimhinde associerede lymforetikulære væv hos et menneske eller et andet dyr, hvorved antigenet når frem til og bliver optaget af de slimhinde-associerede lymfoide væv og derved stimulerer slimhinde-immunsystemet, uden at det på grund af nedbrydning på slimhindeoverfladen mister sin effektivitet.

25

Ved anvendelse af en sådan sammensætning optages antigenet af de slimhinde-associerede lymfoide væv og derved stimuleres det systemiske immunsystem, uden at det på grund af nedbrydning på slimhindeoverfladen mister sin effektivitet.

30

KORT BESKRIVELSE AF FIGUREN

Figuren viser plasma IgA-respons i mus bestemt ved titrering til endepunkt.

DETALJERET BESKRIVELSE AF OPFINDELSEN

- 5 Beskrivelser af fremgangsmåder til udførelsesformer for opfindelsen følger
nedenfor. Disse beskrivelser viser måltrettetheden mod de slimhinde-
associerede-lymfoide-væv og den programmerede indføring af antigenerne
(trinitrophenyl-keyhole limpet hemocyanin (TNP-KLH) og en toxoidvaccine af
Staphylococcus enterotoxin B) og et lægemiddel (etretinat) indkapslet i 50:50
10 poly(DL-lactid-co-glycolid) til mus.

- Det skal imidlertid bemærkes, at der kan anvendes andre polymere foruden
poly(DL-lactid-co-glycolid). Eksempler på sådanne polymerer omfatter, men
er ikke begrænset til, poly(glycolid), poly(DL-lactid-co-glycolid), copoly-
15 oxalater, polycaprolacton, poly(lactid-co-caprolacton), poly(esteramider), po-
lyorthoestere og poly(8-hydroxysmørsyre) og polyanhydrider.

- Der kan også bruges andre bioaktive bestanddele. Eksempler på sådanne
omfatter, men er ikke begrænset til, antigener til vaccinerings mod sygdomme
20 forårsaget af vira, bakterier, protozoer eller svampe, såsom influenza, respi-
ratorisk syncytial, parainfluenza-vira, Hemophilus influenza, Bordetella per-
tussis, Neisseria gonorrhoeae, Streptococcus pneumoniae og Plasmodium
falciparum eller andre sygdomme forårsaget af patogene mikroorganismer,
eller antigener til vaccinerings mod sygdomme forårsaget af makroorganis-
25 mer, såsom helminthiske patogener, eller antigener til vaccinerings mod aller-
gier. Andre anvendelige bioaktive stoffer omfatter, men er ikke begrænset til,
immunomodulatorer, næringsstoffer, lægemidler, peptider, lymfokiner og cy-
tokiner.

30

I. MIKROINDKAPSLING

A. Fremstilling af farveholdige mikrokapsler

Kumarin, et ikke-vandopløseligt fluorescerende farvestof, blev mikroindkapslet i polystyren, en ikke-bionedbrydelig polymer, hvorved opnåedes fluorescerende mikrokapsler, der kunne bruges til at følge mikrokapslers penetration ind i de Peyerske plaques. Mikrokapslerne blev fremstillet ved følgende fremgangsmåde:

Man fremstillede først en polymeropløsning ved at opløse 4,95 g polystyren (type 685D, Dow Chemical Company, Midland, Mi) i 29,5 g methylenchlorid (Syntesekvalitet, Eastman Kodak, Rochester, NY). Derefter blev ca. 0,05 g kumarin (Polysciences, Inc., Warrington, PA) sat til polymeropløsningen og opløst ved omrøring af blandingen med en magnetomrører.

I en separat beholder blev 10 vægt-% vandig polyvinylalkohol (PVA) opløsning, reaktionsmediet, fremstillet ved at opløse 40 g PVA (Vinol 2050, Air Products and Chemicals, Allentown, PA) i 360 g ionbyttet vand. Efter fremstilling af PVA-opløsningen mættes opløsningen ved tilsætning af 6 g methylenchlorid. Dernæst sættes PVA-opløsningen til en 1 liters beholder (Ace Glass, Inc., Vineland, NJ) udstyret med en gennemgående omrøringsaksel og en 6,35 cm teflonomrører og omrøres ved ca. 380 rpm med en Fisher motor med konstant hastighed.

Polystyren/kumarin-blandingens sættes derpå til beholderen indeholdende PVA-reaktionsmediet. Dette udføres ved at hælde polystyren/kumarin-blandingens gennem en langstillet 7 mm tragt, som leder blandingens ind i beholderens. Der fremkommer en stabil olie-i-vand emulsion, som dernæst omrøres i ca. 30 minutter ved omgivelseens tryk til opnåelse af mikrodråber af olie med en passende størrelse. Beholderens lukkes derpå, og trykket i beholderens reduceres gradvist til 520 mmHg ved hjælp af en vandstrålepumpe forbundet til et manometer og en udluftningsventil. Beholderens indhold omrøres ved reduceret tryk i ca. 24 timer, således at alt methylenchloridet afdamper. Derefter opsamles de størknede mikrokapsler ved centrifugering, og de tørres i 72 timer i et vakuumkammer, som holdes ved stuetemperatur.

B. Fremstilling af antigen-holdige mikrokapsler

5 TNP-KLH, et vandopløseligt antigen, blev indkapslet i poly(DL-lactid-co-glycolid), en biokompatibel, bionedbrydelig polyester. Mikrokapslerne blev fremstillet ved følgende fremgangsmåde:

10 Man fremstillede først en polymeropløsning ved at opløse 0,5 g 50:50 poly(DL-lactid-co-glycolid) i 4,0 g methylenchlorid. Derefter blev 300 µl af en vandig opløsning af TNP-KLH (46 mg TNP-LKH/ml, efter dialyse) sat til og homogent dispergeret i poly(DL-lactid-co-glycolid)-opløsningen ved hvirvelstrømsblanding på en Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY).

15 I en separat beholder blev en 8 vægt-% vandig PVA-opløsning fremstillet ved opløsning af 4,8 g PVA i 55,2 g ionbyttet vand. Efter opløsning af PVAen, sættes PVA-opløsningen til en 100 ml beholder (Kontes Glass, Inc., Inc., Vineland, NJ) udstyret med en gennemgående omrører og en 3,8 cm teflon turbineomrører. Polymeropløsningen blev derpå tilsat PVA-reaktionsmediet
20 ved udhældning gennem en langstilket tragt. Under tilsætningen blev PVA-opløsningen omrørt ved ca. 650 rpm. Efter ca. 10 minutters omrøring af den herved fremkomne olie-i-vand-emulsion i beholderen, blev beholderens indhold overført til 3,5 l ionbyttet vand indeholdt i et 4 l bægerglas og omrørt ved ca. 800 rpm med en 5 cm omrører af rustfrit stål. De herved fremkomne mi-
25 krokapsler blev omrørt i det ionbyttede vand i ca. 30 minutter, opsamlet ved centrifugering, vasket to gange med ionbyttet vand til fjernelse af resterende PVA og derpå opsamlet ved frysetørring. Mikrokapselproduktet bestod af sfæriske partikler med en diameter på 1-10 µm. Andre mikrokapsler, som f.eks mikrokapsler med Staphylococcus enterotoxin B, kan fremstilles på lig-
30 nende måde.

TNP-KLH-indholdet af de antigenholdige mikrokapsler, d.v.s. kerneindholdet af mikrokapslerne, blev bestemt ved udvejning af 10 mg antigenholdige mi-

krokapsler i et 12 ml centrifugeglas. Der tilsættes 3,0 ml methylenchlorid til glasset, som hvirvelstrømsblandes til opløsning af poly(DL-lactid-co-glycolid). Dernæst sættes 3,0 ml ionbyttet vand til glasset, og der hvirvelstrømsblandes kraftigt i 1 minut. Indholdet af centrifugeglasset centrifugeres til adskillelse af

5 de organiske og vandige lag. Det vandige lag overføres til en 10 ml målekolbe. Ekstraktionen gentages, idet de vandige lag kombineres i målekolben. Kolben fyldes op til mærket med ionbyttet vand. Mængden af TNP-KLH i kolben, og således mængden af TNP-KLH i mikrokapslerne, bestemmes derefter ved brug af et protein assay. Mikrokapslerne indeholdt 0,2 vægt-% TNP-

10 KLH. Indholdet af Staphylococcus enterotoxin B i Staphylococcus enterotoxin B mikrokapsler kan kvantificeres på lignende måde.

II. PENETRATION AF FARVESTOFHOLDIGE MIKROKAPSLER IND I DE PEYERSKE PLAQUES EFTER ORAL ADMINISTRERING

15 De Peyerske plaques er langt den største vævsmasse, der har evne til at fungere som et induktivt sted for sekretoriske IgA-responser. Disse isolerede små knuder af lymforetikulært væv er beliggende langs hele tyndtarmens og blindtarmens længde. Den målrettede indføring af intakt antigen direkte ind i

20 dette væv til opnåelse af høj lokal koncentration antages på nuværende tidspunkt at være den mest effektive måde at inducere et udbredt IgA-respons i slimhinden. Bionedbrydelige mikrokapsler udgør et ideelt vehikel til opnåelse af denne målrettede vaccinerings.

25 EKSEMPEL 1 – Optagelse af mikrokapsler af polystyren

Optagelsen af mikrokapsler ind i de tarmassocierede lymforetikulære væv og størrelsesrestriktionen af denne penetration blev undersøgt ved oral administrering af polystyrenmikrokapsler indholdende det fluorescerende farvestof

30 kumarin.

Ikke bedøvede, fastede BALB/c mus fik ved hjælp af en fødekanyle i maven indgivet 0,5 ml af en 100 mg/ml suspension af fluorescerende mikrokapsler

af forskellig størrelse (under 5 μm eller 8-50 μm i diameter) i ledningsvand. Til forskellige tidspunkter efter indgivelsen (0,5, 1 og 2 timer) blev musene slået ihjel og tyndtarmen udtaget. Tarmstykker på 1 cm indholdende en isoleret Peyersk plaque blev isoleret, lumenindholdet skyllet af, krænget ud og lymfrosset. Der blev lavet frysensnit, som undersøgtes under fluorescensmikroskop med henblik på at observere antal, beliggenhed og størrelse af de mikrokapsler, som fra tarmlumen var optaget i den Peyerske plaque.

Skønt der var sket nogen indfangning af mikrokapslerne mellem villi, som havde forhindret fjernelsen af disse ved skylningen, sås der ingen penetration ind i vævene på andre steder end i den Peyerske plaque. Der blev observeret mikrokapsler i den Peyerske plaque af den proximale, men ikke den distale del af tyndtarmen 0,5 time efter indgivelsen. Efterhånden transporteredes mikrokapslerne af de peristaltiske bevægelser, således at de efter 2 timers forløb sås gennem hele mavetarmkanalen og kunne ses i de Peyerske plaques i ileum. De endocyterede mikrokapsler var i overvejende grad beliggende perifert, væk fra apex af den Peyerske plaque-kuppel, hvilket giver indtryk af, at fysisk indfangning mellem kuplen og tilstødende villi under peristaltisk bevægelse har hjulpet til deres optagelse. Sammenligning af optageseffektiviteten af præparatet på $<5 \mu\text{m}$ versus præparatet på 8-50 μm viste, at mikrokapsler $>10 \mu\text{m}$ i diameter ikke blev absorberet ind i de Peyerske plaques, medens mikrokapsler på 1-10 μm i diameter blev hurtigt og selektivt optaget. Dette antydede, at mikrokapsler bestående af bionedbrydelige vægmaterialer ville udgøre et effektivt middel for den målrettede indføring af antigener til de lymforetikulære væv til induktion af immunitet på slimhindeoverflader.

EKSEMPEL 2 - Mikrokapsler af 85:15 poly(DL-lactid-co-glycolid)

1. Optagelse af biokompatible og bionedbrydelige mikrokapsler i de Peyerske plaques

Grupper af mus blev via en gastrisk slange indgivet bionedbrydelige mikrokapsler indeholdende det fluorescerende farvestof kumarin-6 i form af en suspension i ledningsvand. Det til disse undersøgelser valgte mikrokapselvægsmateriale bestod af 85:15 poly(DL-lactid-co-glycolid) på grund af dets evne til at modstå signifikant bioerosion i et tidsrum på seks uger. Til forskellige tidspunkter fra 1 til 35 dage efter indgivelsen blev tre repræsentative Peyerske plaques, de vigtigste mesenteriske lymfeknuder og milten fra individuelle mus fjernet, bearbejdet og serielle frysesnit fremstillet.

10 Ved betragtning under et fluorescensmikroskop med anvendelse af passende excitations- og barrierefiltre udviste kumarin en dyb grøn fluorescens, som tillod visuel detektering af mikrokapsler, som var væsentligt mindre end 1 μm i diameter. Man så på alle snittene, således at det totale antal mikrokapsler i hvert væv eller organ kunne bestemmes. Størrelsen af hver af de optagede mikrokapsler blev bestemt ved anvendelse af et kalibreret okularmikrometer og beliggenheden inden for vævet eller organet noteret.

Optagede mikrokapsler af forskellig størrelse blev observeret i de Peyerske plaques 24 timer efter oral administrering og til alle de undersøgte tidspunkter op til 35 dage som vist i tabel 1. På intet tidspunkt sås mikrokapsler af nogen størrelse at penetrere ind i tarmvævet på andre steder end de Peyerske plaques. Det totale antal mikrokapsler inde i de Peyerske plaques forøgedes til dag 4 og aftog derefter over de efterfølgende 31 dage til ca. 15 % af det højeste antal.

25 Dette stemmer overens med den iagttagelse, at frie mikrokapsler kunne ses på overfladen af tarmvilli til tidspunkterne 1, 2 og 4 dage. Det er interessant, at ca. 10 timer efter oral administrering af mikrokapselsuspensionen, kunne de kumarinholdige mikrokapsler rent faktisk ses i de passerede fæces. Denne udtømning blev fulgt ved hjælp af en ultraviolet lyskilde, og til tiden 24 timer var størstedelen af de indtagede mikrokapsler passeret. Den fortsatte optagelse af mikrokapsler i de Peyerske plaques, som sås på 2. og 4. dagen må således skyldes den lille del af den indgivne dosis, som blev indfanget i

slim mellem tarmvilli. Endvidere må optagelseeffektiviteten for de fangede mikrokapsler være flere gange større end for de mikrokapsler, der er tilstede i tarmlumen, men over slimlaget. Disse iagttagelser er vigtige, når man ekstrapolerer disse data til mennesket. Den uhyre meget større masse af Peyersk plaque-væv og den meget længere tid, det tager for materiale at passere gennem den humane tyndtarm i forhold til musen, tyder på, at effektiviteten af mikrokapslernes optagelse ind i de humane Peyerske plaques vil være meget større.

10 Der observeredes mikrokapsler af forskellig størrelse inde i de Peyerske plaques til alle de testede tidspunkter, se tabel 1. Til tidspunkterne 1, 2 og 4 dage forblev andelen af mikrokapsler på $<2 \mu\text{m}$ (45-47 %), $2-5 \mu\text{m}$ (31-35 %) og $>5 \mu\text{m}$ (18-23 %) relativt konstant. Det var tydeligt efter 7 dage og endog mere tydeligt til senere tidspunkter, at der var et skift i størrelsesfordelingen, således at de små ($<2 \mu\text{m}$) og mellemstore ($2-5 \mu\text{m}$) mikrokapsler ikke længere dominerede, og de store ($>5 \mu\text{m}$) mikrokapsler blev den talmæssigt stærkest repræsenterede art. Dette skift var sideløbende med nedgangen i det totale antal mikrokapsler i de Peyerske plaques, som sås på og efter dag 7. Disse resultater stemmer overens med den foretrukne bevægelse af de små og mellemstore størrelser mikrokapsler fra de Peyerske plaques, medens de store ($>5 \mu\text{m}$) mikrokapsler foretrukket bibeholdes.

Overensstemmende med den foretrukne bevægelse af de små og mellemstore mikrokapsler ud af de Peyerske plaques er data angående beliggenheden af mikrokapslerne inde i strukturen af de Peyerske plaques. Når en mikrokapsel sås inde i den Peyerske plaque, sås den enten at være forholdsvis nær kuppelepithelet, hvor den trådte ind i den Peyerske plaque (inden for $200 \mu\text{m}$) eller dybere inde i det lymfoide væv ($>200 \mu\text{m}$ fra det nærmeste identificerbare kuppelepithelet) (tabel 1). Mikrokapsler observeret dybt inde i det Peyerske plaque-væv var næsten alle af lille eller mellemstor diameter. På 1. dagen efter indgivelsen var 92 % af mikrokapslerne beliggende nær ved kuppelepithelet. Andelen af dybt beliggende mikrokapsler steg gennem dag 4 til 24 % af det totale og faldt derefter med tiden til ca. 2 % på dag 14 og senere.

re. De små og mellemstore mikrokapsler bevæger sig således gennem og ud af de Peyerske plaques, medens de store ($>5 \mu\text{m}$) mikrokapsler forbliver inden for kuppelområdet i et forlænget tidsrum.

5 2. Bevægelse af mikrokapsler til de mesenteriske lymfeknuder og milten

Der observeredes et lille antal mikrokapsler i de mesenteriske lymfeknuder på dag 1 efter indgivelsen, og antallet steg progressivt til og med dag 7, se tabel 2. Efter dag 7 gik antallet ned, men var stadig påviseligt på dag 35.

10 Størrelsesfordelingen viste klart, at mikrokapsler på $>5 \mu\text{m}$ i diameter ikke kom ind i dette væv, og den større andel af små ($<2 \mu\text{m}$) i forhold til mellemstore (2-5 μm) mikrokapsler på de tidligere tidspunkter indikerede, at mikrokapslerne med den mindre diameter bevæger sig til dette væv med størst effektivitet. Dertil kommer, at på de tidligere tidspunkter var størstedelen af
15 mikrokapslerne beliggende lige under kapslen i den subkapsulære sinus. Senere tidspunkter viste et skift i fordelingen til dybt inde i lymfeknudestrukturen, og ved dag 14 var 90 % af mikrokapslerne beliggende inde i cortex og de medullære områder. Den iagttagelse, at mikrokapslerne først kan påvises i eller nær den subkapsulære sinus stemmer overens med, at de ledes ind i
20 dette væv via lymfekarrene, som tømmer de Peyerske plaques. En progressiv stigning i andelen af mikrokapsler beliggende dybt i dette væv, let skelnelig på 4. dagen, efterfulgt af et progressivt fald i det totale antal på dag 14 og senere, tyder på, at mikrokapslerne fortsætter gennem dette væv og siver ud gennem den efferente lymfedrænage. (*)

25

Lignende undersøgelse af milten viste, at mikrokapsler ikke var påviselige før dag 4 efter indgivelsen. Det højeste antal mikrokapsler sås først på dag 14. Som det var tilfældet for de mesenteriske lymfeknuder, sås ingen mikrokapsler med en diameter på $>5 \mu\text{m}$. Til alle tidspunkter sås mikrokapslerne
30 dybt inde i cortex af dette organ. Det skal bemærkes, at det største antal mikrokapsler sås i milten på et tidspunkt, hvor de fleste af mikrokapslerne i de mesenteriske lymfeknuder lå dybt inde, og deres samlede antal var i aftagende. Disse data stemmer overens med det kendte mønster for lymfedræ-

nage fra de Peyerske plaques til de mesenteriske lymfeknuder og fra de mesenteriske lymfeknuder til blodbanen via ductus thoracicus. Det lader således til, at de mikrokapsler, der ses i milten, er gået igennem de Peyerske plaques og de mesenteriske lymfeknuder og er kommet ind i milten via blodstrømmen.

- 5
- Ved yderligere forsøg blev vævssnit fra de Peyerske plaques, mesenteriske lymfeknuder og milten, som indeholdt absorberede 85:15 DL-PLG-mikrokapsler undersøgt ved histokemiske og immunohistokemiske teknikker.
- 10 Blandt andet viste disse undersøgelser klart, at de mikrokapsler, som blev absorberet ind i de Peyerske plaques, fandtes inde i makrofaglignende celler farvet med periodsyre Schiff's reagens (PAS) for intracellulær carbonhydrat, formentlig glycogen, og for major histokompatibilitetskompleks (MHC) klasse II antigen. Endvidere fandt man, at mikrokapslerne observeret i de mesenteriske lymfeknuder generelt var ført dertil inde i disse PAS- og MHC klasse II-positive celler. De antigenholdige mikrokapsler er således blevet optaget i de Peyerske plaques ved antigenpræsenterende accessoriske celler (APC), og disse APC har udbredt antigenmikrokapslerne til andre lymfoide væv.
- 15
- 20 Disse data tyder på, at kvaliteten af immunresponsen induceret ved oral indgivelse af en mikroindkapslet vaccine kan kontrolleres ved størrelsen af partiklen. Mikrokapsler $<5 \mu\text{m}$ i diameter siver ud fra de Peyerske plaques inde i APC og frigiver antigenet i lymfoide væv, der er induktive steder for systemiske immunresponser. Derimod forbliver mikrokapsler på 5-10 μm i diameter i
- 25 de Peyerske plaques, ligeledes inden i APC, i et længere tidsrum og frigiver antigenet ind i dette slgA-induktive sted.

EKSEMPEL 3 - Sammenligning af optagelse i de Peyerske plaques af mikrokapsler af 10 forskellige sammensætninger

30

Der blev udført forsøg for at identificere de mikrokapsel-polymerexcipienser, som ville være nyttige ved et praktisk indføringssystem med kontrolleret frigivelse, og som ville besidde de fysisk-kemiske egenskaber, der ville tillade

målrettet absorption af mikrokapsler i de slimhindeassocierede lymforetikulære væv. Hvad angår sidstnævnte hensyn, har forskning vist, at hydrofobe partikler lettere fagocyteres af cellerne i det retikuloendotheliale system. Derfor undersøgte man absorptionen i de Peyerske plaques af mikrokapsler med en diameter på 1-10 µm fremstillet af 10 forskellige polymere spændende over en vis rækkevidde, hvad angår hydrofobicitet. De valgte vægmaterialer til disse undersøgelser bestod af polymerer, der varierede med hensyn til vandoptagelse, bionedbrydelighed og hydrofobicitet. Disse polymerer omfattede polystyren, poly(L-lactid), poly(DL-lactid), 50:50 poly(DL-lactid-co-glycolid), 85:15 poly(DL-lactid-co-glycolid), poly(hydroxysmørsyre), poly(methylmethacrylat), ethylcellulose, celluloseacetat-hydrogenphthalat og celluloseetriacetat. Mikrokapsler fremstillet af 7 ud af de 10 excipienser blev absorberet og sås overvejende i kuppelområdet af de Peyerske plaques 48 timer efter oral indgivelse af en suspension indeholdende 20 mg mikrokapsler, se tabel 3. Der sås ikke penetration af mikrosfærer ind i andre væv end de Peyerske plaques. Med én undtagelse, ethylcellulose, fandtes absorptionseffektiviteten at korrelere med den relative hydrofobicitet af excipiensen. Der observeredes op til 1.500 mikrokapsler i de tre repræsentative Peyerske plaques fra de mus, der blev indgivet den mest hydrofobe gruppe af forbindelser [poly(styren), poly(methylmethacrylat), poly(hydroxybutyrat)], medens 200 til 1.000 mikrokapsler blev observeret med de relativt mindre hydrofobe polyesterer [poly(L-lactid), poly(DL-lactid), 85:15 poly(DL-lactid-co-glycolid) og 50:50 poly(DL-lactid-co-glycolid)]. Klassen af celluloseforbindelser blev ikke absorberet.

25

Man har fundet, at mikrokapslernes fysisk-kemiske egenskaber regulerer målrettetheden af mikrokapslerne gennem effektiviteten af deres absorption fra tammlumen af de Peyerske plaques, og at dette er et overfladefænomen. Derfor kan ændringer i mikrokapslernes overfladeegenskaber i form af kemiske modifikationer af polymeren eller i form af overtræk bruges til at regulere den effektivitet, hvormed mikrokapslerne målretter overførslen af bioaktive stoffer til slimhindeassocierede lymfoide væv og til APC. Eksempler på overtræksmaterialer er kemiske stoffer, polymere, antistoffer, bioadhæsiver, pro-

30

teiner, peptider, carbonhydrater, lectiner og lignende af såvel naturlig som kunstig oprindelse.

5 III. ANTISTOF-RESPONSER INDUCERET MED MIKROINDKAPSLEDE VACCINER

MATERIALER OG METODER

Mus, BALB/c mus i alderen 8-12 uger blev brugt ved disse undersøgelser.

10

Trinitrophenyl - Keyhole Limpet Hemocyanin. Hemocyanin fra keyhole limpet (KLH) *Megathura crenulate* blev indkøbt fra Calbiochem (San Diego, CA). Det blev konjugeret med trinitrophenyl-hapten (TNP-KLH) under anvendelse af 2,4,6-trinitrobenzensulfonsyre i henhold til proceduren beskrevet af Rittenburg og Amkraut [Rittenburg, M.B. og Amkraut A.A., "Immunogenicity of trinitrophenyl-hemocyanin: Production of primary and secondary anti-hapten precipitins", *J. Immunol.* 97:421 (1966)]. Substitutionsforholdet blev spektrofotometrisk bestemt til at være TNP₈₆₁-KLH ved brug af en molær ekstinktionskoefficient på 15.400 ved en bølgelængde på 350 nm og anvendelse af en 30 % korrigeret for KLHs bidrag ved denne bølgelængde.

20

Staphylococcus enterotoxin B vaccine. En formalinbehandlet vaccine af *Staphylococcus enterotoxin B* (SEB) blev fremstillet i henhold til Warren et al. [Warren, J.R., Spero, L. og Metzger, J.F., "Antigenicity of formalin-inactivated staphylococcal enterotoxin B", *J. Immunol.* 111:885 (1973)]. Kort beskrevet blev 1 g enterotoxin opløst i 0,1 M natriumphosphat-puffer, pH 7,5, til 2 mg/ml. Der blev tilsat formaldehyd til enterotoxinopløsningen til opnåelse af et formaldehyd:enterotoxin molforhold på 4300:1. Opløsningen blev anbragt i et inkubator-rysteapparat med kontrolleret miljø under langsom omrystning ved 37 °C, og pH-værdien blev kontrolleret og holdt på 7,5 ± 0,1 daglig. Efter 30 dage blev toxoidet koncentreret og vasket over i borat-puffret saltopløsning (BBS) under anvendelse af en trykfiltreringscelle (Amicon) og steriliseret ved filtrering. Omdannelse af enterotoxin til enterotoxoid blev bekræftet ved fra-

30

vær af vægttab i kaniner med en vægt på 3-3,5 kg, som var injiceret intramuskulært med 1 mg toxoidt materiale.

- Immuniseringer. Mikroindkapslede og ikke-indkapslede antigener blev suspenderet i en passende koncentration i en opløsning af 8 dele filtersteriliseret ledningsvand og 2 dele natriumbicarbonat (7,5 % opløsning). Recipientmusene blev fastet natten over før indgivelse af 0,5 ml af suspensionen via gastrisk intubation udført med en intubationskanyle (Babb, J.L., Kiyono, H., Michalek, S.M. og McGheee, J.R., "LPS regulation of the immune response: Suppression of immune response to orally-administered T-dependent antigen", J. Immunol. 127:1052 (1981))

Opsamling af biologiske væsker

1. Plasma. Blod blev efter punktering af det retro-orbitale plexus opsamlet i kalibrerede kapillærpipetter. Efter størkning blev serum opsamlet, centrifugeret til fjernelse af røde blodceller og blodplader, varmeinaktiveret og opbevaret ved -70 °C indtil udførelse af assay.
2. Tarmsekreter. Mus blev indgivet fire doser (0,5 ml) udskylningsopløsning [25 mM NaCl, 40 mM Na₂SO₄, 10 mM KCl, 20 mM NaHCO₃ og 48,5 mM poly(ethylenglycol) med en osmolaritet på 530 mosM] med intervaller på 15 minutter [Elson, C.O., Ealding, W. og Lefkowitz, J., "A lavage technique allowing repeated measurement of IgA antibody on mouse intestinal secretions", J. Immunol. Meth. 67:101 (1984)]. Femten minutter efter den sidste udskylning blev musene bedøvet, og efter yderligere 15 minutter blev de indgivet 0,1 mg pilocarpin ved intraperitoneal injektion. Over de næste 10-20 minutter stimulerede man udtømning af tarmindeholdet. Dette blev opsamlet i en petriskål indeholdende 3 ml af en opløsning af 0,1 mg/ml sojabønne-trypsininhibitor (Sigma, St. Louis, MO) i 50 mM EDTA, kraftigt hvirvelstrømsblandet og centrifugeret til fjernelse af suspenderet stof. Supernatanten blev overført til et polycarbonat-centrifugerør med rund bund, og der tilsattes 30 µl 20 mM phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, Sigma) før klaring ved centrifugering med høj hastighed (27.000 x g, 20 minutter, 4 °C). Efter klaring blev tilsat 20

µl hver PMSF og 1 % natriumazid, og opløsningen gjort 10% i FCS til opnåelse af et alternativt substrat for eventuelt tilbageværende proteaser.

3. Spyt. Samtidig med tarmudtømningen secerneret et stort volumen spyt, og 0,25 ml deraf blev ved hårrørs-virkning opsamlet i en pasteurpipette. Tyve

5 µl hver

trypsininhibitor, PMSF, natriumazid og FCS blev tilsat før klaring.

4. Bronchial-alveolære-skyllévæsker. Der opnåedes bronchial-alveolære-skyllévæsker ved at skylle lungerne med 1,0 ml PBS. En foderkanyle til dyr blev indført intratrachealt og fikseret ved binding med sutur. PBS blev indført

10 og trukket ud 5 gange for at opnå vaskevæsker, hvortil var sat 20 µl hver trypsininhibitor, PMSF, natriumazid og FCS før klaring ved centrifugering.

5. Immunokemiske reagenser. Fastfase-absorberede og affinitetsoprensede polyklonale gede IgG antistoffer, specifikke for muse IgM, IgG og IgA, blev indkøbt kommercielt (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL).

15 Specificiteten deraf i radioimmunassays blev testet ved deres evne til at binde monoklonale antistoffer og myeloma proteiner af passende oprensning.

6. Fastfase radioimmunassays. Oprensede antistoffer blev mærket med bærefrit Na ¹²⁵I (Amersham) ved brug af chloramin T-metoden [Hunter, W.M., "Radioimmunoassay" i Handbook of Experimental Immunology, M. Weir

20 (ed.). Blackwell Scientific Publishing, Oxford, p. 14.1, (1978)]. "Immulon Removawell" assay-strimler (Dynatech) blev overtrukket med TNP-konjugeret bovin serumalbumin (BSA) eller Staphylococcus enterotoxin B i en mængde på 1 µg/ml i BBS natten over ved 4 0C. Kontrolstrimler blev ikke overtrukket,

25 men alle strimlerne blev blokeret i 2 timer ved stuetemperatur med 1 % BSA i BBS, der blev brugt som fortyndingsmiddel til alle prøver og ¹²⁵I-mærkede reagenser. Prøver af biologiske væsker blev fortyndet på passende vis, sat til

30 skyllede 3 gange vaskede replicerede brønde og inkuberet 6 timer ved stuetemperatur. Efter skylning blev 100.000 cpm ¹²⁵I-mærket isotypespecifik anti-immunglobulin sat til hver brønd og inkuberet natten over ved 4 0C. Efter fjernelse af ikke-bundne ¹²⁵I-antistoffer ved skylning blev brøndene talt i et

Gamma 5500 spektrometer (Beckman Instruments, Inc., San Ramon, CA). Hvor det drejede sig om assays for TNP-specifikke antistoffer, blev der foretaget kalibreringer ved anvendelse af dobbelte fortyndingsrækker af et stan-

dard serum (Miles Scientific, Naperville, IL) indeholdende kendte mængder immunglobuliner på brønde overtrukket med 1 µg/brønd isotypespecifikke antistoffer. Kalibreringskurver og interpolation af ukendte blev opnået på computer, idet man anvendte "Logit-log" eller "Four Parameter Logistic" BASIC Technology Center (Vanderbilt Medical Center, Nashville, TN). Hvor det drejede sig om antistoffer specifikke for Staphylococcus enterotoxin B, angives resultaterne som den reciprokke serumfortynding, der frembringer et signal, der er >3 gange så stort som i standardblodprøver ved samme fortynding ved samme fortynding (titrering til endepunkt).

10

A. Vaccine-mikrokapsler indgivet ved injektion

1. Adjuvant virkning bibragt ved mikroindkapsling

15 EKSEMPEL 1 - Adjuvant virkning bibragt ved mikroindkapsling - intraperitoneal indgivelse

Forskning udført i ansøgernes laboratorier har vist, at mikroindkapsling medfører et særdeles forhøjet immunrespons over for det inkorporerede antigen eller vaccine i talrige forsøgssystemer. Et eksempel gives ved den direkte sammenligning af mængden og isotypefordelingen af det cirkulerende antistofrespons på Staphylococcus enterotoxin B, som er årsag til Staphylococcus-madforgiftning, efter immunisering med enten opløseligt eller mikroindkapslet enterotoxoid. Grupper af mus fik indgivet forskellige doser af toxoid-vaccinen, enten inkorporeret i 50:50 poly(DL-lactid-co-glycolid)-mikrokapsler eller på opløselig form, ved intraperitoneal (IP) injektion. På 10. og 20. dagen efter immunisering udtog man plasmaprøver, som blev assayet for anti-toxinaktivitet ved titrering til endepunkt i isotype-specifikke radioimmunassays (Tabel 4). Den optimale dosis opløseligt toxoid (25 µg) udløste et generelt dårligt immunrespons over for toxinet, som kun kunne påvises i IgM-isotypen. Derimod inducerede indgivelse af 25 µg toxoid inkorporeret i mikrokapsler ikke blot et IgM-respons, men et IgG-respons, som var påviseligt i en plasmafortynding på 1/2.500 på dag 20 efter immunisering. Endvidere kunne der

30

indgives større doser toxoid i mikroindkapslet form uden at nedsætte størrelsesordenen af responset, som det ses ved 50 µg dosen af opløseligt toxoid. Den målte frigivelse opnået med mikrokapslerne tillader rent faktisk administrering af en 4-5 gange større dosis uden at forårsage "high-zone"-paralyse, hvorved opnås en betydeligt forhøjet immunitet. Denne adjuvantvirkning er endnu mere udtalt efter sekundære (tabel 5) og tertiære (tabel 6) immuniseringer.

IgG responset på anti-toxin på dag 20 efter den sekundære immunisering var 512 gange højere i mus, der modtog 50 µg mikroindkapslet toxoid, end i mus, der modtog den optimale dosis opløseligt toxoid. Yderligere var tertiær immunisering med den optimale dosis opløseligt toxoid nødvendig for at fremkalde et antistofrespons mod toxinet, som var ækvivalent til det, der sås efter en enkelt immunisering med 100 µg mikroindkapslet enterotoxoid. Der er dokumenteret adjuvant virkning af samme størrelsesorden for almindelige laboratorieprotein-antigener, såsom hapteneret keyhole limpet hemocyanin og influenza virus-vaccine.

EKSEMPEL 2 - Adjuvant virkning bibragt ved mikroindkapsling - subcutan indgivelse

Det foreliggende system til indførelse fandtes at være aktivt efter intramuskulær eller subcutan (SC) injektion. Dette blev undersøgt ved direkte at sammenligne tidsforløbet og størrelsen af immunresponset efter IP og SC injektion i grupper af mus, se tabel 7.

100 µg enterotoxoid i mikrosfærer, indgivet ved SC injektion i 4 punkter langs ryggen på mus, stimulerede et maksimalt IgG-anti-toxin-respons ækvivalent med det, der sås efter IP injektion. Der sås nogen forsinkelse i kinetiken af anti-toxin-forekomsten. Imidlertid opnåedes der glimrende antistofniveauer, hvilket påviste anvendeligheden af injektion andre steder end i peritoneum. Efter sekundær immunisering var IP og SC indgivelsesvejene igen

ækvivalente, hvad angår den maksimale titer, omend det forsinkede respons af SC indgivelsesvejen igen var tydelig, se tabel 8.

2. Mekanismen af den adjuvante virkning bibragt ved mikroindkapsling

5

EKSEMPEL 1 - Den adjuvante virkning bibragt ved mikroindkapsling er ikke et resultat af en i polymeren intrinsisk adjuvant virkning.

10 Ved overvejelse af den mekanisme, hvorved DL-PLG mikrosfærer på 1-10 μm formidler et potenseret humoralt immunrespons på det indkapslede antigen, må tre mekanismer overvejes som muligheder. For det første kan den kroniske frigivelse over et langt tidsrum (depot) sammenlignet med en bolusdosis af ikke-indkapslet antigen spille en rolle ved immunforstærkning. For det andet har forsøg udført af ansøgerne vist, at mikrosfærer af denne størrelsesorden let fagocyteres af antigenbearbejdende og -præsenterende celler. Derfor må målrettet indføring af en forholdsvis stor dosis af ikke-nedbrudt antigen direkte i de celler, der er ansvarlige for initieringen af immunresponser på T celle-afhængige antigener også overvejes. For det tredje kan mikro-kapslerne have intrinsisk immunpotenserende virkning gennem deres evne til at aktivere celler i immunsystemet på en måde, der er analog til adjuvanser, såsom bakterie-lipopolysaccharid eller muramyl-di-peptid. Immunpotensering ved sidstnævnte mekanisme er karakteristisk ved, at den udtrykkes, når adjuvanset indgives sammen med antigenet.

25 For at undersøge, om mikrosfærer er i besiddelse af en iboende adjuvant virkning, som overføres gennem disse partiklers evne til på uspecifik vis at aktivere immunsystemet, sammenlignede man antistofresponset på 100 μg mikroindkapslet enterotoxoid med det antistofrespons, der induceredes efter indgivelse af en lige så stor dosis enterotoxoid blandet med placebo-mikrosfærer, der ikke indeholdt antigen. De forskellige antigenformer blev indgivet ved IP injektioner til grupper på 10 BALB/c mus, og de enterotoxinspecifikke IgM- og IgG-antistofresponser i plasma bestemt ved endepunkt-titrerings-RIA, se tabel 9.

Plasma-antistofresponset på en bolusinjektion af den optimale dosis af opløseligt enterotoxoid (25 µg) var generelt dårligt og bestod i en maksimal IgM-titer på 800 på dag 10 og en maksimal IgG-titer på 800 på dag 20. Indgivelse af en lige så stor dosis mikrokapslet enterotoxoid inducerede et stærkt respons i både IgM- og IgG-isotyperne, som stadig var i stigning på 30. dagen efter immunisering. Samtidig indgivelse af opløseligt enterotoxoid og en dosis placebo-mikrosfærer af samme vægt, størrelse og sammensætning som dem, der blev anvendt til indgivelse af indkapslet antigen, inducerede ikke et antitoxinrespons i plasma, som var signifikant højere end det, der induceredes af opløseligt antigen alene. Dette resultat ændres ikke ved indgivelse af det opløselige antigen 1 dag før eller 1, 2 eller 5 dage efter placebo-mikrosfærene. Således indikerer disse data, at den immunpotensering, der udtrykkes ved indgivelse af antigenet i 1-10 µm DL-PLG mikrosfærer, ikke er en funktion af mikrosfæremes evne til intrinsisk at aktivere immunsystemet. Materialet stemmer snarere overens med forekomsten af en depotvirkning, målrettet indføring af antigenet i antigen-præsenterende accessoriske celler eller en kombination af disse to mekanismer.

20 EKSEMPEL 2 - Forsinkelse af hastigheden af antigenfrigivelse fra 1-10 µm mikrokapsler forøger størrelsen af antistofresponset og forsinker tidspunktet for det maksimale respons.

Fire enterotoxoidholdige mikrokapselpræparater med forskellige hastigheder for antigenfrigivelse blev sammenlignet for deres evne til at inducere et antitoxinrespons i plasma efter IP injektion. Hastigheden af antigenfrigivelsen af mikrokapslerne anvendt i denne undersøgelse er en funktion af to mekanismer: diffusion gennem poreme i vægmatrix og hydrolyse (bioerosion) af vægmatrix. Portionerne nr. 605-026-1 og nr. 514-140-1 har forskellig begyndelseshastighed for frigivelse gennem poreme efterfulgt af et andet frigivelsestrin, som er en funktion af deres nedbrydning ved hydrolyse. I modsætning dertil er portionerne nr. 697-143-2 og nr. 928-060-00 fremstillet med en tæt ensartet matrix af vægmateriale, der kun har lille frigivelse gennem po-

reme, og deres frigivelse er i det væsentlige en funktion af den hastighed, hvormed vægmaterialerne hydrolyseres. Dog er disse to sidstnævnte portioner forskellige, hvad angår forholdet mellem lactid og glycolid, som mikrokapslerne består af, og den større modstand over for hydrolyse, som ses for
5 85:15 DL-PLG medfører en lavere hastighed for frigivelse af enterotoxoid.

Immunresponset induceret af portion nr. 605-026-1 (60 % frigivelse efter 48 timer) nåede en maksimal IgG-titer på 6.400 på dag 20 (tabel 10). Portion nr. 514-140-1 (30 % frigivelse efter 48 timer) stimulerede IgG-antistoffer, der
10 også nåede et maksimum på dag 20, men som forefandt i en højere koncentration både på dagene 20 og 30.

Immunisering med portion nr. 697-143-2 (10 % frigivelse efter 48 timer) førte til maksimale niveauer af IgG-antistof på dagene 30 og 45, som var betydeligt højere (102.400) end dem, der induceres af begge portioner med tidlig frigivelse. Yderligere forsinkelse af hastigheden af antigenfrigivelse ved at
15 anvende et forhold på 85:15 mellem lactid og glycolid, portion nr. 928-060-00 (0 % frigivelse efter 48 timer) forsinkede de maksimale antistofniveauer indtil dagene 45 og 60, men der sås ingen yderligere forøgelse af immunpotensering.
20

Disse resultater stemmer overens med en forsinket og vedvarende frigivelse af antigen til stimulering af et større antistofrespons. Imidlertid tyder visse aspekter af responsmønstret induceret af disse forskellige mikrosfærer på,
25 at en depotvirkning ikke er den eneste immunpotenseringsmekanisme. Jo hurtigere den første frigivelse er, jo lavere er den maksimale antistoftiter. Disse resultater stemmer overens med en model, hvor antigen frigivet inden for de første 48 timer via diffusion gennem porerne, ikke er mere effektivt end indgivelse af opløseligt antigen. Signifikant forsinkelse ved starten af frigivelse for at tillade tid til fagocytose af mikrosfærene af makrofager tillader effektiv
30 bearbejdning og præsentering af antigenet, og størrelsen af det resulterende respons styres af den mængde antigen, der føres ind i de præsentende celler. Imidlertid fører forsinkelse af antigenfrigivelse ud over det punkt,

hvor alt antigenet er ført ind i de præsenterende celler, ikke til yderligere potentisering af responset, det forsinker kun tidspunktet for det maksimale niveau.

5 2. Pulserende frigivelse af vacciner fra mikrokapsler til programmeret forstærkning efter en enkelt injektion

Når man ved injektion modtager en vaccine, er to, tre eller flere indgivelser af vaccinen nødvendige for at fremkalde et godt immunrespons. Typisk gives den
10 første injektion til opnåelse af et primært respons, den anden injektion gives til opnåelse af et sekundært respons, og en tredje injektion gives til opnåelse af et tertiært respons. Multiple injektioner er nødvendige, fordi der kræves gentagen reaktion mellem antigenet og immunsystemets celler til stimulering af et stærkt immunologisk respons. En patient må derfor efter modtagelse af
15 den første vaccineinjektion igen hen til lægen flere gange for at modtage den anden, tredje og efterfølgende injektioner til opnåelse af beskyttelse. Ofte returnerer patienter aldrig til lægen for at få de efterfølgende injektioner.

Vaccinepræparatet, som injiceres i en patient, kan bestå af et antigen i forbindelse med et adjuvans. Et antigen kan for eksempel være bundet til alun.
20 Ved den første injektion er brugen af antigen/adjuvans-kombinationen vigtig, derved at adjuvanset hjælper til at stimulere et immunrespons. Ved den anden og tredje injektion forbedrer indgivelsen af antigenet kroppens immunrespons på antigenet. Den anden og tredje indgivelse eller efterfølgende indgivelser kræver imidlertid ikke nødvendigvis et adjuvans.
25

Alza corporation har beskrevet metoder til kontinuerlig frigivelse af et antigen og et immunforstærkende middel (adjuvans) til stimulering af et immunrespons (US patentskrift nr. 4 455 142). Den foreliggende opfindelse adskiller sig på mindst to vigtige måder fra Alzas patent. For det første kræves der
30 ikke et immunforstærkende middel til at forøge immunresponset, og for det andet frigives antigenet ikke kontinuerligt fra indføringssystemet.

Den foreliggende opfindelse angår formulerering af en vaccine (antigen) indeholdt i mikrokapsler (eller mikrosfærer), hvorved antigenet indkapsles i bionedbrydelige polymerer, såsom poly(DL-lactid-co-glycolid). Mere specifikt fremstiller man forskellige vaccinemikrokapsler, som derpå blandes, således

5 at en enkelt injektion af blandingen af vaccinekapsler forøger det primære immunrespons og derefter på senere tidspunkter indfører antigen på en pulserende måde til opnåelse af sekundære, tertiære og efterfølgende responser.

10 Blandingen af mikrokapsler består af små og store mikrokapsler. De små mikrokapsler, der er mindre end 10 μm , foretrukket mindre end 5 μm , eller mere foretrukket 1-5 μm , potenserer det primære respons (uden at et adjuvans er nødvendigt), fordi de små mikrokapsler påeffektivt vis genkendes og optages af makrofager. Mikrokapslerne inde i makrofagerne frigiver derpå

15 antigenet, som dernæst bearbejdes og præsenteres på overfladen af makrofagen til opnåelse af det primære respons. De større mikrokapsler, der er større end 5 μm , foretrukket større end 10 μm , men ikke så store, at de ikke kan indgives ved for eksempel injektion, foretrukket mindre end 250 μm , er fremstillet af forskellige polymere, således at de bionedbrydes med forskellig

20 hastighed, de frigiver antigen på en pulserende måde.

Ifølge den foreliggende opfindelse er sammensætningen af antigenmikrokapslerne til det primære respons dybest set den samme som sammensætningen af antigenmikrokapslerne anvendt til det sekundære, tertiære og efterfølgende responser. Det vil sige, antigenet er indkapslet i den samme klasse

25 af bionedbrydelige polymere. Antigen mikrokapslernes størrelse og egenskaberne til pulserende frigivelse maksimerer immunresponsen på antigenet.

De foretrukne bionedbrydelige polymerer er sådanne, hvis bionedbrydningshastigheder kan varieres ved blot at ændre forholdet mellem deres monomere, for eksempel poly(DL-lactid-co-glycolid), således at antigenmikrokapsler anvendt til det sekundære respons bionedbrydes hurtigere end anti-

30

genmikrokapsler anvendt til efterfølgende responser, hvorved fås pulserende frigivelse af antigenet.

5 Sammenfattende kan siges, at ved at kontrollere størrelsen af mikrokapsler af stort set samme sammensætning kan man maksimere immunresponset på et antigen. Det er også af vigtighed at have små mikrokapsler (mikrokapsler med en størrelse mindre end 10 μm , foretrukket mindre end 5 μm , mest foretrukket 1-5 μm) i blandingen af antigenmikrokapsler med henblik på at maksimere det primære respons. Anvendelsen af et immunforstærkende indføringsystem, såsom små mikrokapsler, bliver endog mere vigtigt, når man 10 forsøger at fremkalde et immunrespons på mindre immunogene forbindelser, såsom dræbte vacciner, subunit-vacciner, lav-molekylvægt vacciner, såsom peptider, og lignende.

15 **EKSEMPEL 1 - Samtidig indgivelse af fri og mikroindkapslet vaccine.**

Man undersøgte en japansk Encephalitis virus vaccine (Biken). Den anvendte virus er et produkt fremstillet af Research Foundation for Microbial Disease of Osaka University, Suita, Osaka, Japan. Fabrikanten anbefaler en 20 immuniseringsserie med tre doser bestående af to vaccinedoser indgivet med 1-2 ugers mellemrum efterfulgt af indgivelse af en tredje vaccinedosis indgivet 1 måned efter den indledende immuniseringsserie. Ansøgerne har sammenlignet det antivirale immunrespons i mus immuniseret med et standardprogram på 3 doser JE-vaccine med det antivirale respons i mus 25 immuniseret med en enkelt indgivelse af JE-vaccine bestående af 1 del uindkapslet vaccine og 2 dele indkapslet vaccine. JE-mikrokapslerne var $>10 \mu\text{m}$. Resultatet af immunisering af mus med JE-vaccine ved disse to metoder blev sammenlignet ved at måle antistoftitrene i serum over for JE-vaccine påvist ved et ELISA-assay. ELISA-assay måler tilstedeværelsen af serum-antistoffer med specificitet for JE-vaccinekomponenter, men det måler 30 imidlertid ikke mængden af tilstedeværende virusneutraliserende antistof i serum. Den virusneutraliserende antistofaktivitet blev derfor målt ved virus cytopatisk effekt (CPE) inhibitionsassay og virus plaque reduktionsassay.

assay og virus plaque reduktionsassay. Resultaterne af disse assays gives i det følgende.

Der blev undersøgt fire forsøgsgrupper bestående af

5

(1) ubehandlede kontrolmus, der ikke immuniseres,

(2) mus, der får 3,0 mg JE-vaccine (uindkapslet) på dag 0,

(3) mus, der får 3,0 g JE-vaccine (uindkapslet) på dagene 0, 14 og 42 (standardskema), og

10 (4) mus, der får 3,0 mg JE-vaccine (uindkapslet) og 3,0 mg JE-vaccine (indkapslet) på dag 0.

De ubehandlede kontroller giver baggrundstitere for virusneutralisering, imod hvilke immuniserede dyr kan sammenlignes. Dyrene, der modtager en enkelt
15 3,0 mg dosis JE-vaccine på dag 0, giver baggrundstitere for neutralisering, imod hvilke dyr, der modtager uindkapslet vaccine sammen med indkapslet vaccine, kan sammenlignes. Denne sammenligning giver bevis for, at indgivelsen af indkapslet vaccine forøger immuniseringspotentialet af en enkelt
20 3,0 mg dosis uindkapslet vaccine. Dyrene, der får 3 doser uindkapslet vaccine, er kontroller, imod hvilke den indkapslede vaccinegruppe kan sammenlignes med henblik på at dokumentere evnen af en enkelt injektion bestående af både ikke-indkapslet og indkapslet vaccine til at danne antiviral aktivitet, der er sammenlignelig med et standardimmuniserings-skema med 3 doser.

25 Serumprøver indsamlet på dagene 21, 49 og 77 fra 10 dyr i hver forsøgsgruppe blev testet for deres evne til at inhibere de cytopatiske virkninger induceret ved en standard challenge (100 TCID₅₀) med JE-virus. Resultaterne af CPE-inhibitionsassays, udtrykt som den højeste serumfortynding, der er i stand til at inhibere 50 % af viral CPE, er vist i tabel 11. Som det ses, havde
30 de ubehandlede kontroldyr (gruppe 1) på ingen af de undersøgte tidspunkter nogen signifikant virusneutraliserende aktivitet i serum. Af de 10 dyr, der fik en enkelt 3,0 mg dosis JE-vaccine på dag 0 (gruppe 2), udviklede et af dem ikke noget påviseligt virusneutraliserende antistof. Blandt de resterende 9

mus var den højeste titer 254, som sås på dag 49. Den geometriske antivirale middeltiter for denne forsøgsgruppe toppede på dag 49. Ud af de 10 dyr, der fik et standardprogram bestående af tre vaccinedoser (gruppe 3), havde 8 en nedgang i antistofaktivitet fra dag 49 til dag 77. Den geometriske middeltiter for denne gruppe gik ned med over 50 % fra dag 40 til dag 77. Alle 10 dyr, der fik indkapslet JE-vaccine (gruppe 4), udviklede antiviral aktivitet i serum. Den geometriske middeltiter for denne gruppe steg fra dag 21 til dag 77. Den gennemsnitlige titer på dag 49 i denne gruppe var signifikant lavere end for gruppen, der fik 3 vaccinedoser (gruppe 3) ($p = 0,006$); imidlertid fortsatte titeren med at stige fra dag 49 til dag 77, hvilket var i modsætning til gruppe 3. Der var ingen signifikant forskel i den gennemsnitlige titer for disse to grupper i prøverne fra dag 77 ($p = 0,75$), hvilket tyder på, at gruppen, der fik den indkapslede vaccine, opnåede sammenlignelige antivirale titere i serum på dag 77. Til forskel fra de dyr, der havde fået 3 vaccinedoser (gruppe 3), fortsatte de dyr, der havde modtaget indkapslet vaccine (gruppe 4), med at udvise stigninger i virusneutraliserende aktivitet i serum hen igennem de undersøgte tidspunkter. I modsætning til den standard vaccinebehandlede gruppe havde mus, der fik indkapslet JE-vaccine, en 2-fold stigning i den gennemsnitlige neutraliserende titer i serum fra dag 49 til dag 77. Den gennemsnitlige antivirale titer fra mus, der fik mikroindkapslet vaccine, var ikke signifikant forskellig fra gennemsnitstiteren på dag 21 for mus, der fik en enkelt dosis JE-vaccine på dag 0 ($p = 0,12$); imidlertid var gennemsnitstiterne på dag 49 og dag 77 signifikant forskellige for de to grupper (henholdsvis $p = 0,03$ og $p = 0,03$). Disse data tyder på, at virusneutraliserende titere i serum, der ligner dem dannet ved standard vaccineindgivelse, kan opnås ved indgivelse af en enkelt dosis indkapslet JE-vaccine. Skønt de antivirale titere opnået med den ved denne undersøgelse anvendte excipientsformulering ikke steg så hurtigt som dem opnået ved standard vaccinen, så nåede den neutraliserende antistofaktivitet i serum op på titere, som er sammenlignelige med dem opnået med standard 3-dosis vaccineprogrammet.

For yderligere at bekræfte disse resultater fremstillede man for hver forsøgsgruppe pulje-prøver ved at blande lige store volumener af hver serumprøve.

Disse prøver blev overgivet til et uafhængigt laboratorium til bestemmelse af antiviral aktivitet. Prøverne blev testet ved plaque-reduktionsassay imod en standard JE-virus "challenge". Resultaterne af disse assays (se tabel 12) underbygger de oven for beskrevne resultater. Selvom dyrene, der fik indkapslet vaccine, ikke nåede op på maksimale titere lige så hurtigt, som det var tilfældet for standard vaccinegruppen, så inducerede den indkapslede vaccine sammenlignelig virusneutraliserende antistofaktivitet. Endvidere opretholdt den indkapslede vaccine en højere antiviral titer over et længere tidsrum end tilfældet var for standardvaccinen. Disse resultater underbygger yderligere den konklusion, at en enkelt indgivelse af mikroindkapslet vaccine kan frembringe resultater, der er sammenlignelige med dem opnået med et 3-dosis standardvaccineprogram.

15 EKSEMPEL 2 - Samtidig indgivelse af vaccinemikrokapsler med en størrelse på $<10 \mu\text{m}$ og $>10 \mu\text{m}$

En fordel ved indføringssystemet med copolymer-mikrokapsler er evnen til at kontrollere den tid og/eller hastighed, hvormed det inkorporerede materiale frigives. Med vacciner muliggør dette planlægning af frigivelse af antigen for maksimering af antistofresponset efter en enkelt indgivelse. Blandt de mulige måder til frigivelse, som ville forventes at forbedre antistofresponset på en vaccine, er pulserende frigivelse (analog til konventionelle forstærkende immuniseringer).

25 Muligheden for at bruge pulserende frigivelse blev undersøgt ved til grupper af mus subcutant at indgive $100 \mu\text{g}$ enterotoxoid, enten i $1-10 \mu\text{m}$ (50:50 DL-PLG, 1,51 vægt-% enterotoxoid), $20-125 \mu\text{m}$ (50:50 DL-PLG, 0,64 vægt-% enterotoxoid) eller i en blanding af $1-10 \mu\text{m}$ og $20-125 \mu\text{m}$ mikrokapsler, i hvilke lige dele af enterotoxoidet var indeholdt i hvert størrelsesområde.

30 Grupperne af mus fik udtaget blodprøver med intervaller på 10 dage, og plasma IgG responserne blev bestemt ved titrering til endepunkt i isotype-specifikke radioimmunassays under anvendelse af fastfase-absorberet enterotoxin (figur 1). Efter indgivelse af de $1-10 \mu\text{m}$ enterotoxoidmikrokapsler,

kunne plasma IgG-responset spores på dag 10, det steg til en maksimal titer på 102.400 på dagene 30 og 40 og faldt til dag 60 til 25.600. I modsætning dertil forsinkedes responset på toxoidet indgivet i 20-125 µm mikrokapsler indtil dag 30 og steg derefter til en titer på 51.200 på dagene 50 og 60. Den

5 samtidig indgivelse af lige dele af toxoidet i 1-10 µm og 20-125 µm mikrokapsler frembragte et IgG-respons, som i de første 30 dage i det væsentlige var det samme som det, der stimuleredes ved 1-10 µm mikrokapslerne indgivet alene. Imidlertid steg det målte respons fra dag 40 i musene, der modtog

10 samtidig indgivelse af 1-10 µm plus 20-125 µm mikrokapsler, konstant til en titer på 819.200 på dag 60, et niveau, der lå meget højere, end de additive mængder af responserne induceret af de to størrelser indgivet hver for sig.

Det ved samtidig indgivelse af 1-10 µm og 20-125 µm enterotoxoidholdige mikrokapsler opnåede antistofrespons svarer til en 2-faset (pulserende) frigivelse af antigen. Den første puls hidrører fra vævshistiocytternes hurtige op-

15 tagelse og fremskyndede nedbrydning af 1-10 µm partiklerne, hvilket skyldes disse accessoriske cellers effektive opfyldning med høje koncentrationer af antigenet, der fører til et potenseret primært immunrespons, samt sandsynligvis deres aktivering. Den anden fase af antigenfrigivelsen skyldes bioned-

20 brydningen af 20-125 µm mikrokapsler, som er for store til at blive optaget af fagocytotiske celler. Denne anden puls af antigen frigives i en forbehandlet vært og stimulerer et anamnetisk immunrespons. Ved at anvende 50:50 DL-PLG-copolymeren, kan der således konstrueres et system til indføring af vaccine bestående af en enkelt injektion, som potenserer antistofresponser

25 (1-10 µm mikrokapsler), og som kan indføre en tidstilpasset og langvarig sekundær forstærkende immunisering (20-125 µm mikrokapsler). Dertil kommer, at det ved ændring af forholdet mellem de copolymerer er muligt at fremstille præparater, som har endog senere frigivelse, med henblik på at tilvejebringe tertiære eller endog kvaternære forstærkende frigivelser, uden nød-

30 vendigheden af yderligere injektioner.

Der eksisterer derfor flere mulige fremgangsmåder til vaccinerings med de injicerbare mikrokapsler ifølge den foreliggende opfindelse. Blandt disse er

multiple injektioner af små mikrokapsler, fortrinsvis 1-5 μm , som vil blive opslugt af makrofager og fjerne behovet for immunpotenserende midler, såvel som blandinger af frit antigen til et primært respons kombineret med mikroindkapslet antigen i form af mikrokapsler med en diameter på 10 μm eller
5 derover, som frigiver antigenet pulserende til potensering af sekundære og tertiære responser og tilvejebringer immunisering med en enkelt indgivelse. Der kan også anvendes en kombination af småmikrokapsler til et primært respons og større mikrokapsler til sekundære og senere responser, hvorved fjernes behovet for både immunpotenserende midler og multiple injektioner.

10

B. Oralt administrerede vaccine-mikrokapsler

EKSEMPEL 1 - Oralt administrerede mikrosfærer indeholdende TNP-KLH inducerer samtidige cirkulerende antistof- og slimhindeantistofresponser på
15 TNP.

Mikrokapsler indeholdende det haptenerende proteinantigen trinitrophenyl-keyhole limpet hemocyanin (TNP-KLH) blev fremstillet med 50:50 DL-PLF som excipients. Disse mikrokapsler blev adskilt efter størrelse, og til bedømmelse udvalgte man dem med en diameter af størrelsesordenen 1-5 μm .
20 Disse mikrokapsler indeholdt 0,2 vægt-% antigen. Deres evne til at fungere som et effektivt system til indføring af antigen ved indtagelse blev testet ved at indgive 0,5 ml af en 10 mg/ml suspension (10 μg antigen) i bicarbonatpufret sterilt ledningsvand via gastrisk intubation på 4 efter hinanden følgende
25 dage. Til sammenligning blev en anden gruppe mus sideløbende hermed oralt immuniseret med 0,5 ml af en opløsning indeholdende 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ uindkapslet TNP-KLH. Kontrolmus blev oralt indgivet fortyndingsmiddel alene.

På dagene 14 og 28 efter den sidste immunisering, udtog man serum, spyt
30 og tarmsekreter fra 5 fastede mus i hver gruppe. Disse prøver blev testet ved isotypespecifikke radioimmunassays til bestemmelse af mængden af TNP-specifikke og totale antistoffer af isotyperne IgM, IgG og IgA (tabel 13). Spyt- og tarmsekretprøverne indeholdt antistoffer, som næsten uden undtagelse

tilhørte IgA-klassen. Disse resultater stemmer overens med tidligere undersøgelser og viser, at de procedurer, der bruges til opsamling af disse sekreter, ikke medfører kontaminering med serum. Ingen af immuniseringsprogrammerne førte til signifikante ændringer i de totale immunglobulinmængder i nogen af de testede væsker. I simuleret immuniserede kontrolmus sås lave, men påviselige mængder af naturligt forekommende anti-TNP antistoffer af isotyperne IgM og IgG i serum og af isotypen IgA i serum og tarmsekreter. Indgivelse af 30 µg mikroindkapslet TNP-KLH i lige store doser over 3 på hinanden følgende dage førte imidlertid til fremkomsten af en signifikant mængde antigenspecifikke IgA antistoffer i sekreterne og af alle isotyper i serum på dag 14 efter immunisering (se den sidste søjle i tabel 13). Disse antistofmængder var steget yderligere på dag 28. Oral indgivelse af den samme mængde uindkapslet antigen var derimod i alle de testede væsker virkningsløs til inducering af specifikke antistoffer af nogen isotype.

Disse resultater er bemærkelsesværdige i flere henseender. For det første induceres en signifikant mængde antigenspecifikke IgA-antistoffer i serum og slimhindesekretorer, et respons, der er lavt eller fraværende efter de almindeligt anvendte systemiske immuniseringsmetoder. Det kan derfor forventes, at denne immuniseringsmetode fører til signifikant forøget immunitet på slimhinder, som er indgangsstedet eller det patologiske sted for et antal bakterielle og virale patogener. For det andet var det mikroindkapslede antigenpræparat et effektivt immunogen ved oral indgivelse, hvorimod den samme mængde uindkapslet antigen ikke havde en sådan virkning. Således førte mikroindkapsling til en dramatisk forøgelse af virkningsgraden på grund af målrettethed mod og forøget optagelse af de Peyerske plaques. For det tredje lader det til, at den induktive fase af immunresponsen er af lang varighed. Hvor systemisk immunisering med proteinantigener i fravær af adjuvanter er karakteristisk ved at give en maksimal antistofmængde inden for 7 til 14 dage, var de ved oralt administrerede antigenholdige mikrokapsler inducerede responser højere på dag 28 end på dag 14. Dette tyder på, at bionedbrydning af vægmateriale og frigivelse af antigenet sker over et længere tidsrum og således inducerer et respons af længere varighed.

EKSEMPEL 2 - Oralt administrerede mikrokapsler indeholdende SEB-toxoid inducerer sideløbende cirkulerende og slimhinde anti-SEB-toxin-antistoffer.

- 5 De ovenfor præsenterede resultater, som viser, at (a) mikroindkapsling bi-bringer stærk adjuvansvirkning, og (b) mikrokapsler med en diameter på <5 μm spredes til de mesenteriske lymfeknuder og milten efter at være ledt ind gennem de Peyerske plaques, tyder på, at det ville være muligt at inducere et systemisk immunrespons ved oral immunisering med vaccine, der er in-
- 10 korporeret i bionedbrydelige mikrokapsler af passende størrelse. Denne mulighed blev bekræftet ved forsøg, hvori grupper af mus blev immuniseret med 100 μm Staphylococcus enterotoxoid B i opløselig form eller indlejret i mikrokapsler med en excipiens bestående af 50:50 DL-PLG. Disse mus blev tre gange med et mellemrum på 30 dage via et gastrisk rør indgivet det opløselige
- 15 eller mikroindkapslede toxoid, og man udtog plasmaprøver på dagene 10 og 20 efter hver immunisering. Tabel 14 viser titreringer til endepunkt af IgM og IgG antitoxinrespons i plasma til tiden 20 dage efter de primære, sekundære og tertiære orale immuniseringer.
- 20 Mus, der fik vaccinen inkorporeret i mikrokapsler, udviste en konstant stigning i toxinspecifikke antistoffer i plasma ved hver immunisering, mens opløseligt enterotoxoid var virkningsløst. I dette forsøg anvendtes mikrokapsler fra samme portion som forsøgene vist i tabel 4, 5 og 6, og det blev udført og assayet parallelt med disse forsøg. Derfor viser disse data direkte, at oral
- 25 immunisering med mikroindkapslet Staphylococcus enterotoxoid B er mere effektivt til inducering af et antitoxinrespons i serum end den parenterale injektion af det opløselige enterotoxoid i optimal dosis.

Man undersøgte det sekretoriske IgA-respons i de samme grupper af mus.

- 30 Man ræsonnerede, at egenskaberne ved denne portion enterotoxoidholdige mikrokapsler, en heterogen størrelsesorden fra <1 μm til ca. 10 μm , gjorde det sandsynligt, at en del af mikrokapslerne frigav toxoidet, mens de var fixerede i de Peyerske plaques. På dagene 10 og 20 efter den tertiære orale

immunisering udtog man derfor prøver af spyt og tarmskylninger og assayedisse for toxinspecifikke antistoffer af IgA-isotypen (tabel 15). I modsætning til det opløselige toxoids manglende evne til at fremkalde et respons ved oral indgivelse, førte indtagelse af en lige så stor mængde af toxoidvaccinen

5 inkorporeret i mikrokapsler til et betydeligt slgA-antitoxidrespons i både spyt og tarmsekreter. Det skal påpeges, at tarmsekreterne fra hver mus fortyndes til totalt 5 ml under opsamlingen. Skønt det er svært at bestemme den præcise fortyndingsfaktor, som herved påføres det opsamlede materiale, kan man med sikkerhed antage, at slgA-koncentrationen er mindst 10 gange højere i

10 det slim, som tarmen er badet i, og dette er ikke indregnet i de her viste målinger.

Disse data viser klart virkningsgraden af mikroindkapslet enterotoxoid til ved oral indgivelse at inducere et slgA-antitoxinrespons i såvel tarmen som en

15 slimhinde beliggende fjernt derfra. Endvidere er det ved brug af en blanding af mikrokapsler med en diameter i størrelsesordenen fra <1 til 10 μm muligt at inducere dette slimhinderespons sideløbende med et stærkt cirkulerende antistofrespons. Dette tyder på, at en række vacciner kan gøres både mere effektive og mere bekvemme at indgive ved brugen af mikroind-

20 kapslingsteknologi.

C. Vaccinemikrokapsler indgivet intratrachealt

EKSEMPEL 1 - Intratrachealt indgivne mikrokapsler indeholdende SEB to-

25 xoid inducerer samtidigt cirkulerende og slimhinde antitoxin-antistoffer.

Follikulære lymfatiske aggregater i lighed med de Peyerske plaques i mave-

tarmkanalen findes i de slimhindeassocierede lymfoide væv, der ses belig-

gende andre anatomiske steder, såsom luftvejene. Deres funktion har lighed

30 med funktionen af de Peyerske plaques, idet de absorberer materiale fra lu-

men af lungerne og er induktive steder for antistofrespons, der er karakteri-

seret ved en stor andel af slgA. Det blev undersøgt om der var mulighed for at immunisere gennem de bronchialassocierede lymfoide væv. Grupper af

mus fik direkte ind i trachea indgivet 50 µl PBS indeholdende 50 µg SEB toxoid i enten mikroindkapslet eller ikke-indkapslet form. På dagene 10, 20, 30 og 40 efter immuniseringen blev der opsamlet prøver af plasma, spyt, tarmskylninger og bronchial-alveolære skylninger.

5

Assay af plasmaprøverne for antitoxinspecifikke antistoffer viste, at indgivelse af frit SEB toxoid ikke førte til induktion af et påviseligt antistofrespons i nogen af isotyperne (tabel 16). I modsætning hertil udløste intratracheal inddrypning af en lige så stor dosis mikroindkapslet SEB vaccine toxinspecifikke antistoffer af alle isotyper. Dette respons nåede maksimale niveauer på dag 10 30 og blev opretholdt til dag 40 med IgM-, IgG- og IgA-titers på henholdsvis 400, 51.300 og 400.

I lighed med de i plasma observerede responser induceredes der toxinspecifikke antistoffer i bronchial-alveole-skyllingerne af det mikroindkapslede toxoid, men ikke af den ikke-indkapslede vaccine (tabel 17). Kinetikken af fremkomsten af antitoxin-antistofferne i de bronchiale sekreter var noget forsinket i forhold til plasmaresponsen derved, at responsen på dag 20 kun påvises i IgG-isotypen og var lavt i sammenligning med de senere opnåede plateau-mængder. Der opnåedes imidlertid maksimale titers af IgG- og IgA-antitoxin-antistoffer (henholdsvis 1.280 og 320) på dag 30, som opretholdtes til dag 40. Der påvises ingen antistoffer af klassen IgM i bronchial-alveole-skyllingerne ved brug af denne immuniseringsmetode, et resultat der stemmer overens med fraværet af IgM-secernerende plasmaceller i lungerne og 20 den manglende evne af dette store antistofmolekyle til at transudere fra serum gennem molvægtsafsækningen på 200.000, som udgøres af den kapillær-alveolære membran.

Disse data viser, at mikroindkapsling frembragte immunrespons over for 30 SEB-toxoid-antigenet efter indgivelse i luftvejene, mens det ikke-indkapslede antigen var virkningsløst. Dette respons sås både i cirkulationen og i de sekreter, der bader luftvejene. Det skal bemærkes, at denne immuniseringsmetode var effektiv til induktion af antistoffer af klassen IgA. Dette antistof er

formentlig produktet af lokal syntese i de øvre luftveje, et område, der ikke er beskyttet af antistoffer af klassen IgG, som ledes ind i den nedre del af lungerne fra blodcirkulationen. Således vil intratracheal immunisering med mikroindkapslede antigener gennem inhalering af aerosoler være en effektiv
5 måde til at inducere antistoffer, som beskytter de øvre luftveje.

D. Vaccinemikrokapsler indgivet ved blandede immuniseringsveje

I både mennesker og dyr er det vist, at systemisk immunisering koblet med
10 slimhindepræsentering af antigen er mere effektiv end nogen anden kombination til at fremme slimhindeimmunresponser (Pierce, N.F. og Gowans, J.L. "Cellular kinetics of the intestinal immune response to cholera toxoid i rotter", J. Exp. Med. 142:1550, (1975)). Tre grupper af mus blev forbehandlet ved IP immunisering med 100 µg mikroindkapslet SEB-toxoid og 30 dage senere
15 udsat for 100 µg mikroindkapslet SEB-toxoid ved enten IP, oral eller IT indgivelse. Dette blev gjort for direkte at bestemme, om et blandet immuniseringsprogram, der anvender mikroindkapslet antigen, var fordelagtigt, hvad angår mængderne af induceret slgA.

20 Tyve dage efter de mikroindkapslede forstærkende immuniseringer udtog man prøver af plasma, tarmskylninger og bronchial-alveolære skylninger og bestemte mængderne og isotypefordelingen af anti-SEB-toxin antistoffer ved endepunktitrerings-radioimmunassays (tabel 18). Den IP forstærkning af IP forhandlede mus førte til fremkomsten af højt indhold af IgG antitoxinantistoffer i plasma- og sekretprøverne, men var helt uden virkning til induktion af påviselige IgA-antistoffer i nogen af de testede væsker. I modsætning hertil forøgede sekundær immunisering med mikroindkapslet SEB-toxoid ved enten oral eller IT indgivelse effektivt indholdet af specifikke IgG-antistoffer i plasma (præ-sekundær immuniseringstiter i hver gruppe var 51.200) og inducerede også fremkomsten af signifikante mængder af slgA-antistoffer i
25 tarm- og bronchial-alveolære skylninger. Oral forstærkning af IP forhandlede mus inducerede anti-SEB-toxin slgA-antistoffer, som secernerer ind i tarmsekreterne i mængder sammenlignelige med dem, der kræver 3 orale
30

immuniseringer indgivet med mellemrum (tabel 18 sammenlignet med tabel 15). Intratracheal forstærkning af tidligere IP immuniserede mus var især effektiv til inducering af et udbredt slimhinderespons og udløste forekomsten af høje samtidige mængder af IgG og slgA i både bronchial-alveolære prøver og tarmsekretprøver.

Disse resultater er især vigtige, hvad angår immunisering mod talrige infektiøse stoffer, som udøver deres patofysiologiske virkninger gennem akutte infektioner i respirationsvejene. Antistoffer i luftvejene stammer fra to forskellige kilder. Sekretorisk IgA er almindeligt forekommende i den slim, der bader næse-svælg og bronchieerne [Soutar, C.A., "Distribution of plasma cells and other cells containing immunoglobulin in the respiratory tract of normal man and class of immunoglobulin contained therein", *Thorax* 31:58 (1976) og Kaltreider, H.B. og Chan, M.K.L., "The class-specified immunoglobulin composition of fluids obtained from various levels of canine respiratory tract", *J. immunol.* 11:423 (1976)], og er produktet af lokale plasmaceller i lamina propria i de øvre luftveje. I modsætning til næse-svælg og bronchieerne indeholder bronchioleerne og alveoleerne overvejende IgG, som passivt opnås fra blodcirkulationen via transudation [Reynolds, H.Y. og Newball, H.H., "Analysis of proteins and respiratory cells obtained from human lungs by bronchial lavage", *J. Lab. Clin. Med.* 84:559, (1974)]. Effektiv beskyttelse af lungerne kræver således både cirkulerende IgG-antistoffer og slimhinde-slgA-antistoffer.

Disse data tyder på, at immuniseringsprogrammer, der benytter blandet indgivelsesvej med mikroindkapslede antigener, vil vise sig at være de mest effektive til induktion af samtidige cirkulerende antistof- og slimhinde-antistofresponser. Skønt de her rapporterede forsøg undersøger afgrænsede forbehandlings- og forstærkningstrin, som hver krævede en indgivelse af mikroindkapslet antigen, vil det være muligt at bruge fleksibiliteten i kontrolleret pulserende frigivelse tilvejebragt ved mikrokapsel-indføringsystemet til at udforme et system med en enkelt indgivelse, som vil stimulere maksimal samtidig systemisk og sekretorisk immunitet. For eksempel kunne mikroind-

kapslet antigen indgives både ved injektion og ingestion under et enkelt lægebesøg. Ved at variere forholdet mellem lactid og glycolid i de to doser kunne den systemisk indgivne dosis frigives inden for få dage til forbehandling af immunsystemet, og den anden (orale) dosis kunne frigives i de Peyerske plaques på et senere tidspunkt til stimulering af et forstærket slimhinde-respons.

IV. ABSORPTION AF LÆGEMIDLER

10 Det følgende eksempel viser, at små mikrokapsler (under 5 μm , fortrinsvis 1-5 μm) også kan forbedre kroppens absorption af lægemidler såvel som anti-

gener. Etreinat, (all-E)-9-(4-methoxy-2,3,6-trimethylphenyl)-3,7-dimethyl-2,4,6,8-nonatetraenonsyre ethylester) blev mikroindkapslet i 50:50 poly(DL-lactid-co-glycolid). Mikrokapslerne var 0,5 til 4 μm i diameter og indeholdt

15 37,2 vægt-% etreinat. Disse etreinatmikrokapsler, såvel som uindkapslet etreinat, blev indgivet til mus ved oral gavage, idet der anvendtes 1 vægt-% Tween 80 i vand som vehikel. Der blev kun indgivet enkelt-doser på 50 mg etreinat/kg. Blod fra de doserede mus blev opsamlet med specifikke tidsintervaller, og serum fra dette blod blev mængdebestemt for etreinat og/eller

20 metabolitter deraf ved brug af en high performance chromatografisk procedure (tabel 19). Resultaterne viser, at mus behandlet med etreinatmikrokapslerne havde signifikant højere etreinatindhold i blodet end mus behandlet med uindkapslet etreinat. Ligesom det er tilfældet med vaccine-mikrokapslerne på under 5 μm , antages det, at mikrokapslerne fører etreinat

25 til blodstrømmen via det lymfoide væv (de Peyerske plaques) i mavetarmkanalen. Den samme fremgangsmåde kan også forventes at kunne anvendes til at forøge absorptionen af andre lægemidler, hvor anvendelsen deraf ville være specielt nyttig til indføring af biologiske lægemidler, såsom peptider, proteiner, nucleinsyrer og lignende.

Tabel 1:

| Penetration af 85:15 DL-PLG mikrosfærer indeholdende kumarin-6 ind i og gennem de Peyerske plaques efter oral administrering | | | | | | |
|--|------------|-------------------------|--------------------|-------------------|----------------------------|------|
| Tid | Antal | Procentdel med diameter | | | Procentdel med beliggenhed | |
| (dage) | observeret | < 2 μm | 2 -5 μm | > 5 μm | Kuppel | Dybt |
| 1 | 296 | 47 | 35 | 18 | 92 | 8 |
| 2 | 325 | 45 | 32 | 23 | 83 | 17 |
| 4 | 352 | 46 | 31 | 23 | 76 | 24 |
| 7 | 196 | 21 | 29 | 41 | 88 | 11 |
| 14 | 148 | 16 | 29 | 55 | 98 | 2 |
| 21 | 91 | 7 | 27 | 66 | 98 | 2 |
| 28 | 63 | 5 | 24 | 71 | 100 | 0 |
| 35 | 52 | 6 | 19 | 79 | 97 | 3 |

Tabel 2:

| Bevægelse af 85:15 DL-PLG mikrosfærer indeholdende kumarin-6 ind i og gennem de mesenteriske lymfeknuder efter oral administrering | | | | | | |
|--|------------|-------------------------|--------------------|-------------------|----------------------------|------|
| Tid | Antal | Procentdel med diameter | | | Procentdel med beliggenhed | |
| (dage) | observeret | < 2 μm | 2 -5 μm | > 5 μm | Kuppel | Dybt |
| 1 | 8 | 50 | 50 | 0 | 100 | 0 |
| 2 | 83 | 76 | 24 | 0 | 95 | 5 |
| 4 | 97 | 73 | 27 | 0 | 73 | 27 |
| 7 | 120 | 67 | 32 | 0 | 64 | 36 |
| 14 | 54 | 83 | 17 | 0 | 9 | 91 |
| 21 | 20 | 75 | 25 | 0 | 5 | 95 |
| 28 | 15 | 67 | 32 | 0 | 0 | 95 |
| 35 | 9 | 44 | 56 | 0 | 0 | 100 |

Tabel 3:

| Målrettet absorption i de Peyerske plaques i de tarmassocierede lymfoide væv efter oral administrering af 1-10 μm mikrosfærer med forskellige excipienser | | |
|--|----------------|-----------------------------|
| Excipiens | Bionedbrydelig | Absorption Peyerske plaques |
| Poly(styren) | Nej | Meget god |
| Poly(methylmethacrylat) | Nej | Meget god |
| Poly(hydroxybutyrat) | Ja | Meget god |
| Poly(DL-lactid) | Ja | God |
| Poly(L-lactid) | Ja | God |
| 85:15 Poly(DL-lactid-co-glycolid) | Ja | God |
| 50:50 Poly(DL-lactid-co-glycolid) | Ja | God |
| Celluloseacetat-hydrogenphthalat | Nej | Ingen |
| Cellulosetriacetat | Nej | Ingen |
| Ethylcellulose | Nej | Ingen |

Tabel 4:

| Primært anti-toxin respons på mikroindkapslet versus opløselig Staphylococcus enterotoxoid B | | | | | |
|--|-----------------|---------------------------|-----|--------|--------|
| Toxoid dosis (µg) pr. immunisering | Form | Anti-toxin titer i plasma | | | |
| | | Dag 10 | | Dag 20 | |
| | | IgM | IgG | IgM | IgG |
| 100 | Mikroindkapslet | 1.280 | 320 | 1.280 | 10.240 |
| 50 | Mikroindkapslet | 640 | 320 | 1.280 | 5.120 |
| 25 | Mikroindkapslet | 320 | <20 | 640 | 2.560 |
| 50 | Opløselig | <20 | <20 | <20 | <20 |
| 25 | Opløselig | 320 | <20 | 160 | <20 |
| 12,5 | Opløselig | 40 | <20 | <20 | <20 |

Tabel 5:

| Sekundært anti-toxin respons på mikroindkapslet versus opløselig Staphylococcus enterotoxoid B | | | | | |
|--|-----------------|---------------------------|---------|--------|---------|
| Toxoid dosis (µg) pr. immunisering | Form | Anti-toxin titer i plasma | | | |
| | | Dag 10 | | Dag 20 | |
| | | IgM | IgG | IgM | IgG |
| 100 | Mikroindkapslet | 320 | 163.840 | 160 | 81.920 |
| 50 | Mikroindkapslet | 640 | 81.920 | 640 | 163.840 |
| 25 | Mikroindkapslet | 2.560 | 40.960 | 640 | 81.920 |
| 50 | Opløselig | 160 | <20 | 80 | <20 |
| 25 | Opløselig | 320 | 160 | 160 | 320 |
| 12,5 | Opløselig | 160 | 40 | 40 | 80 |

5

Tabel 6:

| Tertiært anti-toxin respons på mikroindkapslet versus opløselig Staphylococcus enterotoxoid B | | | | | |
|---|-----------------|---------------------------|---------|--------|---------|
| Toxoid dosis (µg) pr. immunisering | Form | Anti-toxin titer i plasma | | | |
| | | Dag 10 | | Dag 20 | |
| | | IgM | IgG | IgM | IgG |
| 100 | Mikroindkapslet | 1.280 | 655.360 | 640 | 327.680 |
| 50 | Mikroindkapslet | 2.560 | 327.680 | 280 | 327.680 |
| 25 | Mikroindkapslet | 2.560 | 327.680 | 640 | 163.840 |
| 50 | Opløselig | 640 | 1.280 | 640 | 640 |
| 25 | Opløselig | 320 | 10.240 | 80 | 10.240 |
| 12,5 | Opløselig | 160 | 1.280 | 40 | 1.280 |

Tabel 7:

| Primært systemisk anti-toxin respons induceret ved forskellige parenterale immuniseringsveje | | | | |
|--|-------------------|-------------------------------|---------|---------|
| Mikroindkapslet toxoid dosis (μg) | Immuniserings vej | IgG anti-toxin titer i plasma | | |
| | | Dag 15 | Dag 30 | Dag 45 |
| 100 | Intraperitoneal | 12.800 | 102.400 | 204.800 |
| 100 | Subkutan | 6.400 | 25.600 | 204.800 |

Tabel 8

| Sekundært systemisk anti-toxin respons induceret ved forskellige parenterale immuniseringsveje | | | | |
|--|-------------------|-------------------------------|-----------|-----------|
| Mikroindkapslet toxoid dosis (μg) pr. immunisering | Immuniserings vej | IgG anti-toxin titer i plasma | | |
| | | Dag 15 | Dag 30 | Dag 45 |
| 100 | IP - IP | 819.200 | 1.638.400 | 3.276.800 |
| 100 | SC - SC | 409.600 | 819.200 | 3.276.800 |

5 Tabel 9:

| Mikrosfærer besidder ikke intrinsisk adjuvansvirkning | | | | | | | |
|---|----------------------------------|---------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|
| Toxoid dosis (μg) pr. immunisering | Form | Anti-toxin titer i plasma | | | | | |
| | | Dag 10 | | Dag 20 | | Dag 30 | |
| | | IgM | IgG | IgM | IgG | IgM | IgG |
| 25 | Antigen i mikrosfærer | 6.400 | 6.400 | 400 | 12.800 | 800 | 25.600 |
| 25 | Opløseligt antigen | 800 | <50 | 200 | 800 | 100 | <50 |
| 25 | Antigen plus placebo-mikrosfærer | 800 | <50 | 200 | <50 | 200 | 50 |

Tabel 10:

| Systemisk antitoxin respons induceret ved parenteral immunisering med μm mikrosfærer, der udtømmer antigen med forskellig hastighed | | | | | | | | | |
|--|-------------|-------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|-------|--------|---------|---------|---------|
| Toxoid dosis (μg) | Form | Lactid/glycolid forhold | Antigen udtømmning efter 48 timer | IgG anti-toxin titer i plasma på dag: | | | | | |
| | | | | 10 | 15 | 20 | 30 | 45 | 60 |
| 100 | Opløselig | - | - | <50 | <50 | <50 | <50 | <50 | <50 |
| 100 | Mikrosfærer | 50:50 | 60% | 400 | - | 6.400 | 3.200 | - | - |
| 100 | Mikrosfærer | 50:50 | 30% | 400 | - | 12.800 | 6.400 | - | - |
| 100 | Mikrosfærer | 50:50 | 10% | - | 6.400 | - | 102.400 | 102.400 | 51.200 |
| 100 | Mikrosfærer | 85:15 | 0% | - | 3.200 | - | 51.200 | 102.400 | 102.400 |

Tabel 11

| Resultater af CPE-inhibitions-assays af serumprøver fra immuniseringsundersøgelserne af JE-vaccine | | | |
|--|--|---------|---------|
| Dyr | Serumfortynding i stand til at reducere virus induceret CPE med 50% på dag | | |
| | 21 | 49 | 77 |
| Gruppe 1 = ubehandlede kontroller | | | |
| GMT | <10 | 11 | 11 |
| Gennemsnit | <10 | 11 | 11 |
| Maksimum | <10 | 16 | <20 |
| Minimum | <10 | <10 | <10 |
| Gruppe 2 = 3,0 mg uindkapslet JE-vaccine IP på dag 10 | | | |
| GMT | 44 | 73 | 50 |
| Gennemsnit | 55 | 95 | 71 |
| Maksimum | 127 | 254 | 160 |
| Minimum | <10 | 13 | <10 |
| Gruppe 3 = 3,0 mg uindkapslet JE-vaccine IP på dag 0, 14 og 42 | | | |
| GMT | 507 | 3.880 | 1.576 |
| Gennemsnit | 934 | 5.363 | 2.951 |
| Maksimum | 4.064 | >10.240 | >10.240 |
| Minimum | 160 | 806 | 254 |
| Gruppe 4 = 3,0 mg uindkapslet JE-vaccine + 3,0 mg indkapslet JE-vaccine IP på dag 0 | | | |
| GMT | 77 | 718 | 1.341 |
| Gennemsnit | 803 | 1.233 | 2.468 |
| Maksimum | 320 | 5.120 | 10.240 |
| Minimum | 13 | 160 | 254 |

^aGMT = geometriske middeltitlere.

Tabel 12:

| Resultater af plaque-reduktions-assays af forenede serumprøver fra immuniseringsundersøgelserne af JE-vaccine | | | | |
|---|------------|-----|-----------------------------------|------|
| Gruppe | Behandling | Dag | Serum fortynding til opnåelse af: | |
| | | | 50 % | 80 % |
| 1 ^a | Kontroller | 0 | <10 | <10 |
| 1 | Kontroller | 14 | <10 | <10 |
| 1 | Kontroller | 21 | <10 | <10 |
| 1 | Kontroller | 42 | <10 | <10 |
| 1 | Kontroller | 49 | <10 | <10 |

| | | | | |
|----------------|--------------------|----|-----------------|-------|
| 1 | Kontroller | 84 | <10 | <10 |
| 2 ^b | Uindkapslet JE | 0 | <10 | <10 |
| 2 | Uindkapslet JE | 14 | 160 | 20 |
| 2 | Uindkapslet JE | 21 | ND ^c | ND0 |
| 2 | Uindkapslet JE | 42 | 320 | 80 |
| 2 | Uindkapslet JE | 49 | 320 | 40 |
| 2 | Uindkapslet JE | 84 | 640 | 160 |
| 3 ^d | Uindkapslet JE | 0 | <10 | <10 |
| 3 | Uindkapslet JE | 14 | 160 | 40 |
| 3 | Uindkapslet JE | 21 | 2.560 | 640 |
| 3 | Uindkapslet JE | 42 | 1.280 | 640 |
| 3 | Uindkapslet JE | 49 | 5.120 | 2.560 |
| 3 | Uindkapslet JE | 84 | 2.560 | 1.280 |
| 4 ^e | Mikroindkapslet JE | 0 | <10 | <10 |
| 4 | Mikroindkapslet JE | 14 | 160 | 20 |
| 4 | Mikroindkapslet JE | 21 | 320 | 80 |
| 4 | Mikroindkapslet JE | 42 | 5.120 | 640 |
| 4 | Mikroindkapslet JE | 49 | 5.120 | 640 |
| 4 | Mikroindkapslet JE | 84 | 10.000 | 2.560 |

^a Ubehandlede kontroller.

^b Dyrene fik 3,0 mg uindkapslet JE vaccine IP på dag 0.

^c ND = Ikke bestemt (utilstrækkelig prøvemængde).

^d Dyrene fik 3,0 mg uindkapslet JE vaccine IP på dagene 0, 14 og 42.

5 ^e Dyrene fik 3,0 mg uindkapslet og 3,0 mg mikroindkapslet JE-vaccine IP på dag 0.

Tabel 13.

Inducering af TNP-specifikke antistoffer i serum og slimhindesekretorer hos BALB/c mus ved oral immunisering med mikroindkapslet TNP-KLH

| Immunogen | Tid efter immunisering | Biologisk prøve | ng Immunoglobulin / mL prøve | | | | | |
|---------------------|------------------------|-----------------|------------------------------|----------|-----------|----------|-----------|----------|
| | | | IgM | | IgG | | IgA | |
| | | | Total | Anti-TNP | Total | Anti-TNP | Total | Anti-TNP |
| Kontrol | Dag 14 | Tarmvæske | <1 | <1 | 62 | <1 | 79355 | 25 |
| | | Spyt | <40 | <10 | <40 | <10 | 2.651 | <10 |
| | | Serum | 445.121 | 6 | 5.503.726 | 37 | 1.470.553 | 32 |
| Uindkapslet TNP-KLH | Dag 14 | Tarmvæske | 4 | 1 | 11 | <1 | 64.985 | 17 |
| | | Spyt | <40 | <10 | <40 | <10 | 1.651 | 354 |
| | | Serum | 298.733 | 11 | 6.000.203 | 29 | 1.321.986 | 21 |
| TNP-KLH | Dag 14 | Tarmvæske | 3 | <1 | 130 | <1 | 95368 | 222 |
| | | Spyt | <40 | <10 | <40 | <10 | 1461 | 88 |
| | | Serum | 360987 | 1461 | 5312896 | 572 | 1411312 | 1077 |
| Uindkapslet TNP-KLH | Dag 28 | Tarmvæske | <1 | <1 | 94 | <1 | 88.661 | 64 |
| | | Spyt | <40 | <10 | <40 | <10 | 1.278 | <10 |
| | | Serum | 301.223 | 21 | 5.788.813 | 67 | 1.375.322 | 63 |
| TNP-KLH | Dag 28 | Tarmvæske | 4 | <1 | 122 | 2 | 82.869 | 422 |
| | | Spyt | <40 | <10 | <40 | <10 | 1.628 | 130 |
| | | Serum | 320.192 | 1.904 | 5.951.503 | 2.219 | 1.277.505 | 1.198 |

Tabel 14:

Antitoxin-IgM- og -IgG-mængder i plasma på dag 20 efter primær, sekundær og tertiær oral immunisering med opløseligt eller mikroindkapslet (50:50 DL-PLG) Staphylococcus toxoid

| Enterotoxoid dosis (µg) pr. immunisering | Form | Antitoxin titer i plasma på dag 20 | | | | | |
|--|-------------|------------------------------------|------|----------|------|---------|--------|
| | | Primær | | Sekundær | | Tertiær | |
| | | IgM | IgG | IgM | IgG | IgM | IgG |
| 100 | Mikrosfærer | 80 | 1280 | 320 | 5120 | 1280 | 40.960 |
| 100 | Opløselig | <20 | <20 | 80 | <20 | 640 | <20 |

5 Tabel 15:

Toxinspecifikke IgA antistoffer i spyt og tarmvæske hos mus på dag 10 og 20 efter tertiær oral immunisering med opløseligt eller mikroindkapslet entero toxoid

| Enterotoxoid dosis (µg) pr. immunisering | Form | IgA anti-enterotoxin titer efter immunisering | | | |
|--|-------------|---|-----------|--------|-----------|
| | | Dag 10 | | Dag 20 | |
| | | Spyt | Tarmvæske | Spyt | Tarmvæske |
| 100 | Mikrosfærer | 1280 | 1024 | 640 | 256 |
| 100 | Opløselig | 40 | <8 | 10 | <8 |

Tabel 16:

Antitoxin-antistof-mængder i serum induceret ved intratracheal immunisering med opløseligt eller mikroindkapslet *Staphylococcus enterotoxin B* toxoid

| Enterotoxoid dosis (μ g) pr. immunisering | Form | IgA anti-enterotoxin titer efter immunisering | | | | | | | | | |
|--|-----------------|---|-----|-----|--------|-------|-----|--------|--------|-----|-----|
| | | Dag 10 | | | Dag 20 | | | Dag 30 | | | C |
| | | IgM | IgG | IgA | IgM | IgG | IgA | IgM | IgG | IgA | |
| 50 | Mikroindkapslet | <50 | <50 | <50 | 200 | 25600 | 400 | 400 | 51.200 | 400 | 400 |
| 50 | Opløselig | <50 | <50 | <50 | <50 | <50 | <50 | <50 | <50 | <50 | <50 |

Tabel 17:

Antistof-mængder i bronchial-alveolære skylninger induceret ved intracheal immunisering med opløseligt eller mikroindkapslet *Staphylococcus enterotoxin B*-toxoid

| Enterotoxoid dosis (μ g) pr. immunisering | Form | IgA anti-enterotoxin titer efter immunisering | | | | | | | | | |
|--|-----------------|---|-----|-----|--------|-----|-----|--------|------|-----|----|
| | | Dag 10 | | | Dag 20 | | | Dag 30 | | | C |
| | | IgM | IgG | IgA | IgM | IgG | IgA | IgM | IgG | IgA | |
| 50 | Mikroindkapslet | <5 | <5 | <5 | <5 | 80 | <5 | <5 | 1280 | 320 | <5 |
| 50 | Opløselig | <5 | <5 | <5 | <5 | <5 | <5 | <5 | <5 | <5 | <5 |

Tabel 18:

Anti-SEB-toxin antistof-respons induceret i forskellige biologiske væsker ved programmer med soring ved anvendelse af mikroindkapslet SEB-toxoid

| Immuniseringsvej | | Dosis mikroindkapslet SEB toxoid pr. immunisering (μ g) | Anti-toxin titer dag 20 efter sekundær immunisering | | | | | | | |
|------------------|----------|--|---|---------|-----|---------------|-------|------|-----------|-------|
| Primær | Sekundær | | Plasma | | | Tarmskyllning | | | Bronchial | |
| | | | IgM | IgG | IgA | IgM | IgG | IgA | IgM | IgG |
| IP | IP | 100 | 3200 | 1638400 | <50 | <20 | 10240 | <20 | <5 | 10240 |
| IP | Oral | 100 | 1600 | 204800 | <50 | <20 | 640 | 640 | <5 | 2560 |
| IP | IT | 100 | 1600 | 819200 | <50 | <20 | 2560 | 2560 | <5 | 20480 |

5

Tabel 19:

Etretinatkoncentration i museserum efter oral dosering med mikroindkapslet og uindkapslet Eretinal.

| Tid (h) | Etretinat koncentration (ng/ml) | |
|---------|---------------------------------|-------------|
| | Mikrokapsler | Uindkapslet |
| 1 | 4.569 | 191 |
| 3 | 634 | 158 |
| 6 | 242 | <31 |
| 24 | ND | ND |

ND = Intet påvist

PATENTKRAV:

1. Sammensætning til indgivelse af et bioaktivt stof til det slimhinde associerede lymforetikulære væv hos et menneske eller et andet dyr, som omfatter:
 - 5 - biokompatible mikrokapsler, som omfatter et bioaktivt stof indkapslet i en biokompatibel excipients og som har en størrelse fra 1 μm til mindre end 5 μm , til selektiv absorption i og passage gennem det slimhinde associerede lymforetikulære væv for tilvejebringelse af systemisk immunitet, og
 - 10 - biokompatible mikrokapsler, som omfatter et bioaktivt stof indkapslet i en biokompatibel excipients og som har en størrelse fra 5 μm til mindre end 10 μm , til selektive absorption og tilbageholdelse i det slimhinde associerede lymforetikulære væv for tilvejebringelse af slimhinde immunitet, i en kombineret sammensætning til potensering af immun respons hos et menneske eller andet dyr.
- 15 2. Sammensætning ifølge krav 1, i hvilken det bioaktive stof er en immunomodulator, lymfokin, monokin, cytokin, antigen eller allergen.
3. Sammensætning ifølge krav 2, i hvilken det bioaktive stof er et influenza antigen, Staphylococcus antigen, respiratorisk syncytial, parainfluenza-vira, Hemophilus influenza, Bordetella pertussis, Neisseria gonorrhoeae, Streptococcus pneumoniae, Plasmodium falciparum, helminthiske patogener, antigener til vacciner mod sygdomme forårsaget af vira, bakterier, protozoer eller svampe eller antigen til vaccine mod allergi.
- 20 4. Sammensætning ifølge krav 3, i hvilken det bioaktive stof omfatter et influenzavirus eller staphylococcal enterotoxin B.
5. Sammensætning ifølge et af kravene 1-4, hvor excipientsen er en polymer eller en copolymer.
- 30 6. Sammensætning ifølge krav 5, hvor excipientsen omfatter en poly(DL-lactid-co-glycolid), en poly(L-lactid), en poly(DL-lactid) en poly(glycolid), en

copolyoxalat, en polycaprolactone, en poly(lactid-co-caprolacton), en poly(esteramid), en polyortester, en poly(β -hydroxy butansyre) eller en poly-anhydrid eller en blanding deraf.

- 5 7. Sammensætning ifølge ethvert af kravene 1-6, hvilken sammensætning er til oral indgivelse.
8. Sammensætning ifølge ethvert af kravene 1-6, hvilken sammensætning er til oral inhalering, nasal, rektal eller oftalmisk indgivelse.
- 10 9. Anvendelse til fremstilling af en sammensætning, som er i stand til at blive selektivt absorberet af det slimhinde associerede lymforetikulære væv for tilvejebringelse af både systemisk og slimhinde immunitet hos et menneske eller et dyr, af
- 15 (1) biokompatible mikrokapsler, som omfatter et bioaktivt stof indkapslet i en biokompatibel excipients og som har en størrelse fra 1 μm til mindre en 5 μm for tilvejebringelse af systemisk immunitet og
- (2) biokompatible mikrokapsler, som omfatter et bioaktivt stof indkapslet i en biokompatibel excipients og som har en størrelse på mellem 5 μm og 10 μm
- 20 for tilvejebringelse af slimhinde immunitet.
10. Fremgangsmåde til fremstilling af en sammensætning for tilvejebringelse af både systemisk og slimhinde immunitet hos et menneske eller et dyr, hvilket til dette brug omfatter blanding af
- 25 (1) biokompatible mikrokapsler, som omfatter et bioaktivt stof indkapslet i en biokompatibel excipients og som har en størrelse fra 1 μm til mindre en 5 μm for tilvejebringelse af systemisk immunitet og
- (2) biokompatible mikrokapsler, som omfatter et bioaktivt stof indkapslet i en biokompatibel excipients og som har en størrelse på mellem 5 μm og 10 μm
- 30 for tilvejebringelse af slimhinde immunitet.
11. Anvendelse ifølge krav 9 eller en fremgangsmåde ifølge krav 10, som yderligere inkluderer et eller flere af de forhold som er specificeret i krav 2-8.

12. Anvendelse til fremstilling af en sammensætning for tilvejebringelse af systemisk immunitet, af biokompatible mikrokapsler, som omfatter et bioaktivt stof indkapslet i en biokompatibel excipients og som har en størrelse fra 1 μm til mindre end 5 μm til absorption i og passage gennem slimhinde associerede lymforetikulære væv.
13. Anvendelse til fremstilling af en sammensætning for tilvejebringelse af slimhinde immunitet, af biokompatible mikrokapsler, som omfatter et bioaktivt stof indkapslet i en biokompatibel excipients og som har en størrelse fra 5 μm til 10 μm til absorption og tilbageholdelse i slimhinde associerede lymforetikulære væv.
14. Anvendelse ifølge krav 12 eller 13, som yderligere inkluderer et eller flere af de forhold som er specificeret i krav 2-8.
15. Sammensætning til potensering af immun respons i et menneske eller et andet dyr, som omfatter en blanding af et første frit bioaktivt stof, som tilvejebringer et primært respons og biokompatible mikrokapsler, som har en størrelse mellem 1 μm og 10 μm og som indeholder et sekundært bioaktivt stof indkapslet i en biokompatibel excipients til pulserende frigørelse for at opnå et efterfølgende respons.
16. Sammensætning ifølge krav 15, hvor i det mindste et af stofferne er en immunomodulator, lymfokin, monokin, cytokin, antigen eller allergen.
17. Sammensætning ifølge krav 15, hvor det første og det andet stof begge er et antigen eller begge er et allergen.
18. Sammensætning ifølge krav 15-17, hvor excipientsen er som defineret i krav 5 eller i krav 6.

19. Fremgangsmåde til fremstilling af en farmaceutisk sammensætning til inducering af et immun respons, som omfatter indkapsling af et første bioaktivt stof valgt blandt antigener, allergener, lymfokiner, cytokiner, monokiner og immunomodulatorer i en biokompatibel excipients til dannelse af mikrokapsler, som har en størrelse på mellem 1 μm og 10 μm , samt tilsætning af et andet bioaktivt stof valgt blandt de tidligere nævnte i fri form til mikrokapslerne i sammensætningen.
20. Fremgangsmåde ifølge krav 19, hvor både det første og det andet bioaktive stof er et antigen eller begge er et allergen.
21. Fremgangsmåde ifølge krav 19 eller krav 20, hvor excipiensen er defineret som i krav 5 eller i krav 6.
22. Anvendelse af mikrokapsler, som har en størrelse mellem 1 μm og 10 μm og som indeholder et bioaktivt stof indkapslet i en biokompatibel excipients til fremstilling af en injektions sammensætning til potensering af immun respons hos mennesker eller andre dyr, forudsat at excipiensen ikke er et proteinoid, polyacryl stivelse eller krystalliseret carbohydrat, hvor det bioaktive stof omfatter en peptid, et protein eller en nukleinsyre.
23. Anvendelse af mikrokapsler, som har en størrelse mellem 1 μm og 10 μm og som indeholder et bioaktivt stof indkapslet i en biokompatibel hydrofob excipients til fremstilling af en injektions sammensætning til potensering af immun respons hos mennesker eller andre dyr, hvor det bioaktive stof omfatter en peptid, et protein eller en nukleinsyre.
24. Anvendelse af mikrokapsler, som har en størrelse mellem 1 μm og 10 μm og som indeholder et bioaktivt stof indkapslet i en biokompatibel excipients, hvor excipiensen omfatter en poly(DL-lactid-co-glycolid), en poly(L-lactid), en poly(DL-lactid) en poly(glycolid), en copolyoxalat, en polycaprolactone, en poly(lactid-co-caprolacton), en poly(esteramid), en polyortester, en poly(β -hydroxy butansyre) eller en polyanhydrid eller en blanding deraf, til fremstill-

ing af en injektions sammensætning til potensering af immun respons hos et menneske eller et andet dyr, hvor det bioaktive stof omfatter et peptid, et protein eller en nukleinsyre.

- 5 25. Anvendelse ifølge et af kravene 22-25, hvor det bioaktive stof omfatter en nukleinsyre.
26. Anvendelse ifølge et af kravene 22-26, hvor det bioaktive stof er et medicament.
- 10 27. Anvendelse af mikrokapsler, som har en størrelse mindre end ca. 10 μm og som indeholder et immunogen indkapslet i en biokompatibel excipients, til fremstilling af et middel til indgivelse nasalt, rektalt, oftalmisk, intratrachealt eller ved oral inhalering til slimhindeassocierede lymforetikulære væv i mennesker eller dyr, hvor det bioaktive stof omfatter et peptid, et protein eller en nukleinsyre.
- 15 28. Anvendelse ifølge krav 27, hvor midlet skal indgives nasalt, intratrachealt eller ved oral inhalering.
- 20 29. Anvendelse ifølge krav 27 eller 28, hvor mikrokapslerne har en størrelse mellem ca. 1 μm og ca. 10 μm .
- 25 30. Anvendelse ifølge et af kravene 27-29, hvor det bioaktive stof omfatter en nukleinsyre.
- 30 31. Anvendelse af mikrokapsler, som har en størrelse mellem 1 μm og 10 μm og som indeholder et bioaktivt stof indkapslet i en biokompatibel excipients til fremstilling af en injektions sammensætning til potensering af immun respons hos mennesker eller andre dyr, forudsat at excipiensen ikke er et proteinoid, polyacryl stivelse eller krystalliseret carbohydrat, hvor det bioaktive stof endvidere inkluderer en adjuvans.

32. Anvendelse af mikrokapsler, som har en størrelse mellem 1 μm og 10 μm og som indeholder et bioaktivt stof indkapslet i en biokompatibel hydrofob excipients til fremstilling af en injektions sammensætning til potensering af immun respons hos mennesker eller andre dyr, hvor det bioaktive stof endvidere inkluderer en adjuvans.
33. Anvendelse af mikrokapsler, som har en størrelse mellem 1 μm og 10 μm og som indeholder et bioaktivt stof indkapslet i en biokompatibel excipients, hvor excipiensen omfatter en poly(DL-lactid-co-glycolid), en poly(L-lactid), en poly(DL-lactid) en poly(glycolid), en copolyoxalat, en polycaprolactone, en poly(lactid-co-caprolacton), en poly(esteramid), en polyortester, en poly(β -hydroxy butansyre) eller en polyanhydrid eller en blanding deraf, til fremstilling af en injektions sammensætning til potensering af immun respons hos et menneske eller et andet dyr, hvor det bioaktive stof endvidere inkluderer en adjuvans.
34. Anvendelse af mikrokapsler, som har en størrelse mindre end ca. 10 μm og som indeholder et immunogen indkapslet i en biokompatibel excipients, til fremstilling af et middel til indgivelse nasalt, rektalt, oftalmisk, intratrachealt eller ved oral inhalering til slimhindeassocierede lymforetikulære væv i mennesker eller dyr, hvor det bioaktive stof endvidere inkluderer en adjuvans.
35. Anvendelse ifølge krav 34, hvor midlet skal indgives nasalt, intratrachealt eller ved oral inhalering.
36. Anvendelse ifølge krav 34 eller 35, hvor mikrokapslerne har en størrelse mellem ca. 1 μm og ca. 10 μm .
37. Anvendelse ifølge et af kravene 31-36, hvor det bioaktive stof omfatter en blanding af et antigen og en adjuvans.
38. Anvendelse ifølge et af kravene 31-36, hvor det bioaktive stof omfatter en blanding af et antigen, en adjuvans og en cytokin.

39. Anvendelse af mikrokapsler, som har en størrelse mellem 1 μm og 10 μm og som indeholder et bioaktivt stof indkapslet i en biokompatibel excipients til fremstilling af en injektions sammensætning til potensering af immun respons
5 hos mennesker eller andre dyr, forudsat at excipiensen ikke er et proteinoid, polyacryl stivelse eller krystalliseret carbohydrat, hvor det bioaktive stof endvidere inkluderer en blanding af et antigen og cytokin.
40. Anvendelse af mikrokapsler, som har en størrelse mellem 1 μm og 10 μm
10 og som indeholder et bioaktivt stof indkapslet i en biokompatibel excipients til fremstilling af en injektions sammensætning til potensering af immun respons hos mennesker eller andre dyr, hvor det bioaktive stof endvidere inkluderer en blanding af et antigen og cytokin.
41. Anvendelse af mikrokapsler, som har en størrelse mellem 1 μm og 10 μm
15 og som indeholder et bioaktivt stof indkapslet i en biokompatibel excipients, hvor excipiensen omfatter en poly(DL-lactid-co-glycolid), en poly(L-lactid), en poly(DL-lactid) en poly(glycolid), en copolyoxalat, en polycaprolactone, en poly(lactid-co-caprolacton), en poly(esteramid), en polyortester, en poly(β -
20 hydroxy butansyre) eller en polyanhydrid eller en blanding deraf, til fremstilling af en injektions sammensætning til potensering af immun respons hos et menneske eller et andet dyr, hvor det bioaktive stof omfatter en blanding af et antigen og cytokin.
42. Anvendelse af mikrokapsler, som har en størrelse mindre end ca. 10 μm
25 og som indeholder et immunogen indkapslet i en biokompatibel excipients, til fremstilling af et middel til indgivelse nasalt, rektalt, oftalmisk, intratrachealt eller ved oral inhalering til slimhindeassocierede lymfocytiske væv i mennesker eller dyr, hvor det bioaktive stof omfatter en blanding af et antigen og
30 cytokin.
43. Anvendelse ifølge krav 42, hvor midlet skal indgives nasalt, intratrachealt eller ved oral inhalering.

44. Anvendelse ifølge krav 34 eller 35, hvor mikrokapslerne har en størrelse mellem ca. 1 μm og ca. 10 μm .

