



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 20 686 T2** 2006.02.23

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 077 679 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 20 686.3**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/GB99/01449**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 922 274.8**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 99/058112**

(86) PCT-Anmeldetag: **07.05.1999**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **18.11.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **28.02.2001**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **29.09.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **23.02.2006**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 9/16** (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

9810236 13.05.1998 GB

(73) Patentinhaber:

Health Protection Agency, Salisbury, Wiltshire, GB

(74) Vertreter:

**Lauer, J., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 79837
St. Blasien**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**FARRAR, Graham Henry, Salisbury, Wiltshire SP4
0JG, GB; TINSLEY-BOWN, Anne Margaret,
Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, GB; JONES, David
Hugh, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, GB**

(54) Bezeichnung: **Verbesserungen in Bezug auf die Verkapselung von bioaktiven Wirkstoffen**

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

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

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Verbesserungen in der Verkapselung von bioaktiven Wirkstoffen wie z.B. Antigene, Arzneimittel und DNA zur Impfung und Gentherapie. Die vorliegende Erfindung betrifft insbesondere Verfahren zur Verkapselung von Antigen und/oder DNA in wässriger Lösung in einem polymeren Mikropartikel, so dass die Mikropartikel, wenn sie einem Empfänger verabreicht werden, Antigen zu Antigen präsentierenden Zellen des Empfängers liefern, und/oder die Expression der DNA in dem Empfänger in den Antigen präsentierenden Zellen induzieren. Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls Mikropartikel und Mikropartikel enthaltende Zusammensetzungen.

[0002] Die vorliegende Technologie der Mikroverkapselung ist schon wenigstens 10 Jahre alt, doch hat sie, wie es scheint, noch keine kommerziell erfolgreichen Produkte hervorgebracht trotz vieler angekündigter Durchbrüche. Tatsächlich, abgesehen von WO-A-97/17063 (der gleichen Erfinder wie der der vorliegenden Erfindung), veröffentlichte Verfahren haben sich als ineffizient und unzuverlässig herausgestellt.

[0003] Viele veröffentlichte Patente und Anmeldungen lauten auf den Namen des Southern Research Instituts (SR). Speziell die US-A-5407609 behauptet in Beispiel 7, ein auf einer Emulsion basierendes Verfahren zur Herstellung von hohlen Partikeln zu beschreiben. Ein anderes auf einer Emulsion basierendes Verfahren zur Herstellung von Partikeln, die ein Protein enthalten, insbesondere BSA, ist beschrieben in Sah et al. (J. Microencapsulation, 1995, Band. 12, Nr. 1, Seiten 59-69). Sofern diese Partikel zur Verabreichung eines verkapselten bioaktiven Wirkstoffes an Antigenpräsentierende Zellen im Epithel des Darmes verwendet werden sollen, ist es von grosser Bedeutung, dass ihre Grösse kleiner als 10 Mikrometer im Durchmesser ist. Grössere Partikel werden von den Darmzellen nicht aufgenommen und passieren den Darm ohne Effekt.

[0004] Die in US-A-5407609 sowie durch Sah et al beschriebenen Verfahren sind allerdings in der Herstellung relativ grosser Partikel erfolgreich, oder zumindest in der Herstellung von Partikeln über einen breiten Grössenbereich, wobei ein signifikanter Teil der Partikel grösser ist als der kritische Wert (cut-off-point) für biologische Aktivität von 10 Mikrometern.

[0005] Eine breite Streuung von Partikelgrössen, so wie dies aus US-A-5407609 ersichtlich ist, führt unvermeidbar dazu, dass ein Grossteil des verkapselten Wirkstoffes in Partikeln mit einer Grösse enthalten ist, welche für die Phagozytose nicht geeignet ist.

[0006] Weiter von Nachteil ist, dass Sah et al eine Mischung von Partikelgrössen erhielt mit einem offensichtlich minimalen Durchmesser um 10 Mikron. Beide bekannten Verfahren sind deshalb nicht speziell dazu ausgelegt, ein verkapseltes Produkt zur Aufnahme durch Antigen-präsentierende Zellen herzustellen. Das Verkapselungsverfahren von Sah et al. benötigt zudem sehr hohe Scherraten während der Verkapselung, welche einen schädlichen Einfluss auf die Verkapselung von Wirkstoffen wie DNA haben und von daher dazu ungeeignet sind.

[0007] US-A-5407609 bezieht sich auf die Ausbildung von mikroblassenartigen Partikeln, betont jedoch, dass wasserlösliche Wirkstoffe nicht einfach in solchen Partikeln verkapselt werden auf Grund einer Tendenz des verkapselten Wirkstoffes, aus dem Teil der Emulsion zu migrieren, der eventuell den Inhalt der Partikel bilden wird. Zur Vermeidung dieses Problems verlangt die US-A-5407609, dass sobald sich die Emulsion gebildet hat, sie sofort zu einem grossen Volumen an Extraktionsmittel, z.B. Wasser, hinzu gefügt wird. Hierbei kann jedoch die Kontrolle über die Partikelgrösse verloren gehen.

[0008] Die interne Architektur von nach dem Sah-Verfahren hergestellten Mikropartikeln ist generell eine wabenartige Matrix wie dargestellt in den das Sah-Papier begleitenden Fotografien, anstatt eine einfache, hohle mikroblassenartige Struktur. Eine unvollständige Entfernung von Lösungsmittel oder/oder Wasser von den Innenseiten dieser Matrizen während des Schrittes der Extraktion des Lösungsmittels und der anschliessenden Lyophilisation kann zu einem vorzeitigen Abbau des Polymers des Partikels und zu einem entsprechenden Abfall des pH-Wertes von jeder verkapselten wässrigen Lösung führen, was zu einer Beschädigung eines verkapselten Wirkstoffes führt.

[0009] Das Freisetzungsprofil des bioaktiven Wirkstoffes von verabreichten Mikropartikeln ist bisher verändert worden durch Änderung des relativen Anteils an in dem PLG-Polymer vorhandenem Lactid und Glycolid. Viele dieser Daten basieren jedoch auf der "Mikrokugel"-Technologie bei welcher der verkapselte Wirkstoff über eine Polymermatrix verteilt ist und es gibt keinen Stand der Technik welcher sich auf die Kontrolle des Freisetzungsprofils von Mikroblassenpartikeln bezieht. Die Veränderung des relativen Anteils von in dem

PLG-Polymer enthaltenen Lactid und Glycolid hat auf kurze Sicht begrenzten Erfolg gezeigt doch wäre es wünschenswert, alternative Mittel zur Kontrolle des Freisetzungsprofils zur Verfügung zu stellen.

[0010] WO-A-9851279 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von mikroverkapselter DNA zur Impfung und Gentherapie.

[0011] WO-A-97/17063 beschreibt Verfahren zum Erhalt signifikanter Einschluss-Grade von DNA in Mikropartikel, wobei die Autoren der vorliegenden Erfindung die Einschluss-Effizienz verbessern möchten.

[0012] Die vorliegende Erfindung ist demnach bestrebt die im Stand der Technik beobachteten Probleme zu überwinden oder zumindest zu verringern. Insbesondere zielen bevorzugte Ausführungsarten der Erfindung darauf ab, eine verbesserte Technologie für die Verkapselung von bioaktiven Wirkstoffen wie Antigene und/oder Nukleinsäuren in polymeren Mikropartikeln für die Abgabe von Antigenen und/oder genbasierte Prophylaxe und Therapie.

[0013] Die vorliegende Erfindung stellt entsprechend ein Verfahren zur Verkapselung von DNA in einem polymeren Mikropartikel zur Verfügung, umfassend:

Lösen von Polymer in einem Lösungsmittel zur Herstellung einer polymeren Lösung;

Zubereiten einer wässrigen DNA-Lösung;

Zusammengeben der polymeren und DNA-Lösungen unter Bewegen zur Herstellung einer Wasser-in-Öl Emulsion;

Hinzufügen der Wasser-in-Öl Emulsion zu einer weiteren, ein Stabilisierungsmittel oder einen Surfactanten enthaltenden wässrigen Phase unter Bewegen zur Herstellung einer (Wasser-in-Öl)-in-Wasser Emulsion;

Hinzufügen der (Wasser-in-Öl)-in-Wasser Emulsion zum Überschuss einer wässrigen Phase zur Extraktion des Lösungsmittels unter Bildung von polymeren Mikropartikeln mit einer Grösse von bis zu 10 Mikrometern im Durchmesser, wobei die genannten Mikropartikel DNA in wässriger Lösung enthalten;

wobei die DNA eine Codierungssequenz enthält und die Expression der Codierungssequenz in einem Empfänger nach Verabreichung induziert, und wobei das Lösungsmittel Ethylazetat enthält.

[0014] Bei Anwendung dieses Verfahrens hat sich mit Vorteil herausgestellt, dass Zubereitungen von Mikropartikeln erhalten werden können mit DNA verkapselt in solche einer Weise, dass diese ihre Fähigkeit behält, die Expression ihrer codierenden Sequenz zu induzieren – wie dies bestätigt wird durch Transformations- und Transfektions-Versuche unter Verwendung von aus Mikropartikeln zurückgewonnener DNA. Die Zubereitungen sind geeignet zur Bewirkung einer schützenden Immunität in einem Empfänger nach oraler Verabreichung der für ein geeignetes Antigen codierenden DNA. Die Grössen der Mikropartikel sind generell kleiner als 10 Mikrometer im Durchmesser und erhöhen dadurch den für Antigen-präsentierende Zellen verfügbaren Wirkstoffanteil. (Eldrige J.H. et al, J. Controlled Release. Volume 11, 1990, pages 205-214). Ebenso ist die Einschlusseffizienz von DNA in die Mikropartikel verbessert und konnte im Rahmen von bevorzugten Ausführungsbeispielen der Erfindung als zu annähernd 80% bestimmt werden, wobei diese Zahl eine signifikante Verbesserung gegenüber dem Stand der Technik darstellt.

[0015] Das Verfahren nach der Erfindung ist deshalb vor allem ein Lösungs-Extraktionsverfahren, bei welchem die Extraktion von Lösungsmittel nach der zweiten Emulgierungsstufe, d.h. nach Bildung der (Wasser- in Öl)-in-Wasser Emulsion, das Polymer der Mikropartikel verfestigt oder konsolidiert. Der Begriff "Bildung von polymeren Mikropartikeln" soll als Referenz auf das allgemeine Verfahren verstanden werden, bei welchem Mikropartikel ursprünglich gebildet werden mittels einer Emulsion und bei welchem polymere Schalen der Mikropartikel dann durch Lösungsextraktion verfestigt oder konsolidiert werden.

[0016] Das zur Lösung des Polymers verwendete Lösungsmittel kann auf mehreren Wegen aus der (Wasser-in-Öl)-in-Wasser Emulsion extrahiert werden. In einem besonderen, nachstehend beschriebenen Beispiel des erfindungsgemässen Verfahrens wird die (Wasser-in-Öl)-in-Wasser Emulsion in einem grossen Volumen (100 ml – 1 l) warmen Wassers (37 °C wird im Beispiel verwendet) gelöscht (quench) und dadurch die Verdampfung des Lösungsmittels aus dem Polymer in das Wasser erleichtert. Andere Beispiele von Lösungsmittel-extraktion sind bekannt und umfassen die Verwendung grösserer Wasservolumina bei Raumtemperatur und die Verwendung eines rotierenden Verdampfers.

[0017] Ein Verfahren zur Bestimmung der Einschlusseffizienz des erfindungsgemässen Verfahrens ist, die Menge an DNA, welche freigesetzt wird, von bekannten Gewichtsmengen von Mikropartikeln durch optische Absorptionsspektroskopie genau zu messen und diese Menge mit der ursprünglich eingesetzten Menge in Beziehung zu setzen. Bei Verwendung dieses optischen Messverfahrens konnte beobachtet werden, dass in be-

vorzugten Ausführungsarten der Erfindung, eine Einschlusseffizienz von typischerweise 60 – 70% erreicht wird, was eine signifikante Verbesserung gegenüber den Verfahren nach dem Stand der Technik darstellt.

[0018] Die in den Mikropartikeln enthaltene DNA enthält typisch doppelsträngige DNA. Die Herstellung einer geeigneten DNA-Sequenz zum Gebrauch im Rahmen der Erfindung ist fachkundigen Personen möglich und ist beschrieben in WO-A-97/17063. Vorzugsweise enthält die Sequenz sowohl einen transkriptiven Promotor als auch eine gencodierende Sequenz. Weiter ist es bevorzugt, dass die DNA-Sequenz eine Transkriptions-Termination und Poyladenylation stromab der codierenden Sequenz zur Verfügung stellt.

[0019] Es ist besonders bevorzugt, dass die DNA doppelsträngig ist, zirkular und supergewandelt. Es konnte beobachtet werden, dass während der Herstellung der Mikropartikel die DNA Scheerkräften ausgesetzt ist. Unter Verwendung der erfindungsgemässen Bedingungen zur Herstellung der Partikel konnten es die Erfinder erreichen, signifikante Mengen an funktionaler DNA zu behalten, obwohl sie beobachtet haben, dass vorgängig supergewandelte DNA während des Prozesses teilweise in die offene zirkulare Form überführt werden kann. Der Anteil, in welchem der Verkapselungsprozess DNA denaturiert, kann abgeschätzt werden durch Separation der natürlichen (supergewandelten) DNA von teilweise denaturierter (offen zirkularer) und denaturierter (geschnittener und abgebauter) DNA durch Verwendung von Agarosegelelektrophorese.

[0020] Ein typisches Beispiel einer solchen Separation ist dargestellt in [Fig. 1](#), wo klar definierte Bänder den zwei in den Präparationen am meisten vorhandenen Formen von DNA entsprechen – supergewandelt (unteres Band) und offen zirkular (oberes Band). Totale Degradation von DNA wird üblicherweise angenommen bei einem Verschwinden von den, den zwei üblichen Formen entsprechenden Bändern.

[0021] Die Beibehaltung von biologischer Aktivität der verkapselten DNA, ein Mass für die Beibehaltung des bevorzugten physischen Zustands, kann nach der Freisetzung von DNA aus dem Mikropartikel abgeschätzt werden durch Messung des Vermögens von DNA, in Kultur entweder kompetente Bakterien zu transformieren oder eukaryontische Zellen zu transfizieren. Die Transformationsanalyse misst die Einführung eines funktionalen antibiotischen Resistenzgens (z.B. β -Lactamase), welches in einem Plasmid vorhanden ist und welches dafür empfindlichen Bakterien Ampicillin-Resistenz verleiht. Die Transfektionsanalyse misst spezifisch die Funktionalität des Plasmids, die Expression des gerade interessierenden Gens in geeignet manipulierten Zellen in der Kultur zu induzieren. In beiden Fällen werden die erhaltenen Aktivitätswerte verglichen mit der Aktivität von äquivalenten Mengen korrespondierender Vorrats-DNA.

[0022] Plasmidische DNA oder davon durch konventionelle Manipulationen abgeleitete DNA ist speziell geeignet. Da sich auf Plasmidherstellung beziehende Literatur in grosser Menge zur Verfügung steht wird ein Fachmann in der Lage sein, ein für das erfindungsgemässe Mikropartikel geeignetes Plasmid herzustellen. Generell sind Plasmide geeignet, die irgendeine eukaryontische oder prokaryontische Promotorsequenz enthalten.

[0023] Die am besten geeigneten Polymere für die Herstellung der erfindungsgemässen Mikropartikel sollten typisch eine Reihe von Eigenschaften haben. Derartige Polymere sollten von geringer Toxizität sein, ideal pharmazeutisch akzeptabel und lösbar im verwendeten Lösungsmittel, wie z.B. in Ethylazetat entweder mit oder ohne Hilfslösungsmittel, vorzugsweise zu einem Grad von wenigstens um die 50 mg/ml. Zusätzlich sind sie typischerweise biokompatibel und biologisch abbaubar, obwohl es bevorzugt ist, wenn sie ausreichend stabil sind, um durch die sauren Verhältnisse im Magen passieren zu können. Die Erfindung soll dennoch aber, im Rahmen ihres breitesten Aspekts, nicht auf ein einzelnes bestimmtes Polymer beschränkt sein. Auf Poly-(Aminosäuren / Derivaten von Aminosäuren) basierende Polymere sind geeignet und einige spezifische Beispiele davon sind Poly(Lactid), Poly(Glycolid) und/oder Poly(Lactid-Co-Glycolid) enthaltende Polymere. Im Rahmen einer besonderen Ausführungsart der Erfindung, welche nachstehend noch genauer beschrieben wird, ist das Polymer Poly-(DL Lactid-Co-Glycolid) (PLG) und die Konzentration von PLG in der polymeren Lösung ist typisch wenigstens 10% Gewicht/Volumen. In einer anderen besonderen, ebenfalls unten beschriebenen Ausführungsart der Erfindung ist das Polymer Polycaprolacton. Das Verhältnis von Lactid zu Glycolid in dem zur Herstellung der Mikropartikel nach der Erfindung geeigneten PLG ist nicht kritisch und kommerziell erhältliche Polymere enthalten Lactid:Glycolid-Verhältnisse von 25:75, 50:50 und 75:25, obwohl das Verhältnis geeigneterweise irgendwo im Bereich von 0:100 bis 100:0 liegen kann. In besonders bevorzugten Ausführungsarten der Erfindung ist das Polymer PLG mit einem Molekulargewicht grösser als 70kD oder kleiner als 50kD. Andere für Mikropartikel nach der vorliegenden Erfindung geeignete Polymer-Formulierungen enthalten Poly-Hydroxybutyrat, Poly Hydroxyvalerinat, Poly(Hydroxybutyrat/valerinat), Ethylzellulose, Dextran, Polysaccaride, Polyalkylcyanoacrylat, Poly-Methyl-Methacrylat, Poly(e-Caprolacton), Polyhydrazin und Mischungen von all diesen Komponenten.

[0024] Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft die Universalität des zur Herstellung der Mikropartikel verwendeten Verfahrens. Die Erfinder haben insbesondere Mikropartikel gemacht unter Verwendung von Polymeren über einen weiten Bereich von Molekulargewichten ohne substantielle Veränderung der grundlegenden Methodik. Entsprechend stellt die Erfindung ein Verfahren zur Verkapselung eines bioaktiven Wirkstoffes in einem polymeren Mikropartikel zur Verfügung umfassend:

Lösen von Polymer in einem Lösungsmittel zur Herstellung einer polymeren Lösung;

Zubereiten einer wässrigen Lösung des bioaktiven Wirkstoffes;

Zusammengeben der polymeren und bioaktiven Wirkstoff-Lösungen unter Bewegen zur Herstellung einer Wasser-in-Öl Emulsion;

Hinzufügen der Wasser-in-Öl Emulsion zu einer weiteren, ein Stabilisierungsmittel oder einen Surfactanten enthaltenden wässrigen Phase unter Bewegen zur Herstellung einer (Wasser-in-Öl)-in-Wasser Emulsion;

Hinzufügen der (Wasser-in-Öl)-in-Wasser Emulsion zum Überschuss einer wässrigen Phase zur Extraktion des Lösungsmittels unter Bildung von polymeren Mikropartikeln mit einer Grösse von bis zu 10 Mikrometern im Durchmesser, wobei die genannten Mikropartikel den bioaktiven Wirkstoff enthalten; wobei das Polymer PLG mit einem Molekulargewicht von 40 kD oder geringer umfasst oder daraus besteht.

[0025] Vorzugsweise ist das Molekulargewicht des PLG kleiner als 30kD oder niedriger und in besonderen Ausführungsarten der Erfindung enthalten Mikropartikel PLG von 3kD, 6kD, 9kD, 22kD und Mischungen daraus. Der Molekulargewichtsbereich von geeignetem Polymer ist 1.5kD – 250kD. Wir haben kommerzielle Zubereitungen von 3, 6, 9, 12, 18, 22, 60, 65 & 90kD verwendet. Die Hydrolyserate des Polymers steht in Beziehung zum Molekulargewicht, so dass Polymere mit niedrigerem Molekulargewicht schneller abgebaut werden.

[0026] Wenn Mikropartikel eine wabenförmige Struktur haben, so wie dies in Sah et al vorgeschlagen wurde, wird die wässrige Phase in der Polymermatrix während des Gefriertrocknens nicht lyophilisiert. Das könnte die häufig beobachtete Denaturierung des biologischen Wirkstoffs erklären und die pH-Erniedrigung der Zubereitungen nach dem Stand Technik, indem das nasse Polymer zu Glycol- und Lactidsäuren hydrolysierte. Wir haben beobachtet, dass nach der vorliegenden Erfindung hergestellte Mikropartikel kollabieren wenn sie grob behandelt werden, was darauf schliessen lässt, das sie Hohlräume aufweisen aus denen Wasser entfernt wurde.

[0027] Die Mikropartikel nach der vorliegenden Erfindung sind in der Tat schalenförmig, ([Fig. 3b](#)) und nicht fest, wabenförmig oder eine materielle Phase irgendeiner Art ausser Wasser einschliessend, wenn sie hydratisiert werden. Die Mikropartikel nach der vorliegenden Erfindung können darüberhinaus ohne Verlust der sphärischen Struktur ([Fig. 4a](#)) z.B. durch Gefriertrocknen getrocknet werden. Die vorliegende Erfindung ermöglicht daher die Zubereitung von Mikropartikeln, die trockene pDNA enthalten, die viel stabiler ist als wässrige Zubereitungen.

[0028] Die Herstellung der erfindungsgemässen Mikropartikel ermöglicht den Einschluss von jeglichen wasserlöslichen Substanzen in die Mikropartikel, selbst von jeglichen in Wasser dispergierbaren Substanzen, obwohl der bioaktive Wirkstoff bevorzugt ausgewählt ist auch RNA, proteinischem Antigen, nicht-proteinischem Antigen, protein- oder peptidkonjugierten Polysacchariden, Protein- oder Peptid-DNA Komplexen, synthetischen Peptiden, synthetischen Proteinen, DNA-Viren, Zytokinen, Krebstherapeutika, Mini-Genen und wasserlöslichen Pharmazeutika. Der bioaktive Wirkstoff kann zusätzlich begleitet sein durch Hilfsstoffe (Excipienten) und/oder Adjuvanten, wobei ein Beispiel dafür Alaun ist.

[0029] Tatsächlich kann jedes rekombinante oder natürliche proteinische Antigen unter Verwendung der erfindungsgemässen Verfahren verkapselt werden, insbesondere rekombinantes oder natürliches Antigen, welches zur Immunisierung gegen pathogene Organismen verwendbar ist. Nur um ein Beispiel zu geben kann ein proteinisches Antigen zum Einschluss in Mikropartikel nach der vorliegenden Erfindung optional ausgewählt werden aus:

- (a) den Antigenen FHA, PT, 69kD-Pertactin, Tetanustoxin, gp48, NS1, Capsid, gp350, NS3, SA, I, NP E, M, gp340, F, H, HN, 35kD Protein, BP1, E1, E2, C, M, E und MSHA nach Tabelle 4, und
- (b) immunogetischen Fragmenten, Varianten und Derivaten der Polypeptide von (a).

[0030] Details von Zugriffsnummern von Gensequenzen für diese Antigene sind in Tabelle 4 aufgelistet.

[0031] In einem (Wasser-in Öl)-in-Wasser Emulsionssystem nach der vorliegenden Erfindung ist der die DNA oder bioaktiven Wirkstoff enthaltende Wassertropfen in dem Öl dispergiert, welches selbst in der zweiten wässrigen Phase dispergiert ist. Dies könnte in der Bildung von "Rosinenbrötchen" resultieren, wobei die Rosinen die wässrige Phase + DNA und das Brötchen das Polymer bilden. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung spielen die Erzeugung dieser ursprünglichen Wasser-in-Öl Emulsion und ihre Dispergierung in die zweite Wasser

Phase eine grosse Rolle für die Bildung und den Charakter der fertigen Mikropartikel. Die Bildung unserer Mikropartikel wird stark beeinflusst durch die anfängliche Emulgierungsstufe, weil die resultierenden Mikropartikel einzelnen Tropfen der dispergierte DNA – oder bioaktiven Wirkstoff – enthaltenden wässrigen Phase entsprechen. Das Polymer kondensiert genau um diese herum. In den bevorzugten Ausführungsarten der Erfindung werden die Konzentration des Polymers und das Verhältnis der polymeren Lösung zu der anfänglichen wässrigen Phase kontrolliert, um die erhaltenen Mikropartikel zu beeinflussen.

[0032] In bevorzugten Ausführungsarten der Erfindung ist das Verhältnis Lösungsmittel:wässrige Phase bei der Bildung der Wasser-in-Öl Emulsion insbesondere im Bereich von 4:1 bis 20:1 (Volumen:Volumen), bevorzugt 5:1 bis 15:1 und besonders bevorzugt 5:1 bis 12:1 (Volumen:Volumen). Bei Auswahl von Verhältnissen innerhalb dieser Bereiche bildet sich eine anfängliche Wasser-in-Öl Emulsion, welche zur Bestimmung des Grössenbereichs und des Aufbaus der resultierenden Mikropartikel dienlich ist und welche die Einschlusseffizienz von DNA in die Mikropartikel verbessert. Wenn das Verhältnis Lösungsmittel:wässrige Phase unter 4:1 fällt ergibt sich eine signifikante Reduktion bezüglich des Einschlusses des bioaktiven Wirkstoffes, wie z.B. DNA, in die Mikropartikel. Das ist das Ergebnis, wenn nicht ausreichend Polymer enthaltende Phase vorhanden ist, um die wässrigen Tropfen effektiv zu bedecken und somit Schalenbildung zu verhindern und einen Verlust an bioaktivem Wirkstoff in die wässrige Umgebung der zweiten Emulsionsphase. Die Einschlusseffizienz steigt in einem Verhältnis von wenigstens 4:1 und bevorzugt wenigstens 5:1. Wenn das Verhältnis über 20:1 hinausgeht wird es extrem schwierig, die Bildung von "rosinenbrötchen"-artigen Strukturen, so wie in dem Artikel von Sah gezeigt, zu verhindern. Das ist eine Konsequenz eines Überschusses an Polymer enthaltender Phase, welche die Auflösung individueller Schalenstrukturen "percents", was zu Konglomerationen in "Rosinenbrötchen"-Strukturen und zu festen Mikropartikeln führt, die im Innern Polymermatrix aufweisen. Die Strukturen sind um ein Vielfaches grösser als 10 Mikrometer im Durchmesser und vollkommen ungeeignet zur oralen Immunisierung gemäss der Erfindung. Unterhalb von etwa 20:1 und bevorzugt unterhalb etwa 15:1 fällt die Neigung zur Bildung dieser "Rosinenbrötchen"-Strukturen ab und Mikropartikel von bis zu 10 Mikrometern im Durchmesser werden leichter gebildet.

[0033] Zur Lösung des Polymers geeignete Lösungsmittel sind vorzugsweise von niedriger Toxizität und sind idealerweise ausgewählt aus der Kategorie III Liste von zum pharmazeutischen Gebrauch zugelassenen Lösungsmitteln. Lösungsmittel der Kategorie II Liste können ebenfalls verwendet werden, obwohl es für menschlichen Gebrauch üblicherweise notwendig sein wird, den Anteil an restlichem Lösungsmittel in den Partikeln zu bestimmen, bevor diese Partikel pharmazeutisch zugelassen werden können. Derartige Lösungsmittel lösen bevorzugt wenigstens 50 mg/ml Polymer und sollten mit Wasser im wesentlichen unvermischbar sein, um dadurch die Bildung einer (Wasser-in-Öl)-in-Wasser Emulsion zu erleichtern. In bevorzugten Ausführungsbeispielen der Erfindung weist das Lösungsmittel einen hohen Dampfdruck auf, so dass der letzte Lösungsmittelextraktionsschritt schnell ausgeführt werden kann. Beispiele von für das Verfahren nach der Erfindung geeigneten Lösungsmitteln umfassen Ethylazetat, Dichlormethan, Chloroform, Propylencarbonat und Mischungen daraus. Azeton kann ebenfalls in Lösungsmittelmischungen verwendet werden, d.h. als ein Hilfslösungsmittel, aber nicht für sich, da es mit Wasser mischbar ist.

[0034] Weiter enthält das Lösungsmittel bevorzugt Ethylazetat entweder mit oder ohne ein Hilfslösungsmittel, welches die Menge an Polymer erhöht, die in dem Lösungsmittel gelöst werden kann. Eine Anzahl von Hilfslösungsmittel-Kombinationen sind geeignet, vorausgesetzt, dass der Hauptanteil der Mischung Ethylazetat ist (oder ein anderes pharmazeutisch akzeptables Lösungsmittel). Die Vorteile bei Einsatz von Hilfslösungsmittel-Systemen sind zweifach. Zum einen lösen die Lösungsmittel-Kombinationen ein grösseres Gewicht an Polymer als Lösungsmittel mit nur einer Komponente, was von Vorteil ist im Hinblick auf den Versuch, den Anteil an Lösungsmittel wässriger Phase bei der Generierung der anfängliche Emulsion zu reduzieren. Zum zweiten erleichtern die Hilfslösungsmittel die Auflösung von Polymeren mit hohen Molekulargewichten, was die Aufrechterhaltung von kritischen Anteilen an Lösungsmittel wässriger Phase mit weniger löslichen Polymeren erlaubt. Beispiele solcher Hilfslösungsmittel umfassen Propylencarbonat und Azeton. Die Erfindung lehrt noch allgemeiner die Verwendung eines Hilfslösungsmittels in Kombination mit jeglichem geeigneten Lösungsmittel zur Herstellung einer polymeren Lösung zum Gebrauch zur Herstellung eines Mikropartikels und die Verfahren nach der Erfindung sind somit nicht eingeschränkt auf Lösungsmittel, die notwendigerweise Ethylazetat enthalten. Zum Beispiel entspricht ein Lösungsmittel aus einer Kombination von Dichlormethan und Azeton, welches ein grösseres Gewicht an Polymer löst als in Dichlormethan allein gelöst wird, einem weiteren Aspekt der Erfindung. Weitere Aspekte der Erfindung schliessen den Gebrauch jedes pharmazeutischen Lösungsmittels in Kombination mit einem Hilfslösungsmittel wie z.B. Azeton ein, wobei das kombinierte Lösungsmittel ein grösseres Gewicht an Polymer löst als das pharmazeutische Lösungsmittel allein.

[0035] Es ist ebenfalls bevorzugt, vor allem wenn DNA verkapselt wird, dass die Emulgierungsschritte des

Verfahrens unter reduzierten Scherspannungsbedingungen ausgeführt werden, wobei dies erreicht werden kann durch Verwendung einer Emulgierungsenergie wie z.B. Geschwindigkeit im Falle eines Emulgiermischers, welche ausreichend zum Erhalt einer Emulsion ist und zur Bildung von Mikropartikeln in dem gewünschten Grössenbereich aber nicht so hoch, dass die gesamte DNA durch exzessive Scherung beschädigt wird. In einer unten beschriebenen Ausführungsart der Erfindung wird die Geschwindigkeit des Emulgiermischers so gewählt, dass wenigstens 25% der biologischen Aktivität der DNA (überprüft durch Transformation kompetenter Bakterien oder Transfizierung von Kulturzellen) in den sich ergebenden, DNA enthaltenden Mikropartikeln erhalten bleibt. Geeignete Mischergeschwindigkeiten sind im Falle eines Silverson Mischers unterhalb 8000 Upm, bevorzugt unterhalb 6000 Upm und in besonderen, unten beschriebenen Ausführungsarten sind die Geschwindigkeiten um die 3000 Upm oder oberhalb von 2000 Upm. Jede Variation der Ausrüstung, die zur Herstellung der Emulsionsphasen verwendet werden kann, erfordert eine Einschätzung bei unterschiedlichen Geschwindigkeiten sowie unter unterschiedlichen Bedingungen. Es wird den fachkundigen Personen überlassen, optimale Geschwindigkeiten und eine optimale Dauer für die Emulgierung für jedes einzelne Gerät aufzufinden. Bei Verwendung des Silverson-Homogenisators mit einer Geschwindigkeit von 8000 Upm ergibt sich eine ausgeprägte Beschädigung von DNA und unterhalb von 2000 Upm ergibt sich eine nur sehr geringe oder gar keine Bildung von Mikropartikeln mit einem Durchmesser von 10 Mikron oder weniger. Eine detailliertere Analyse des Einflusses der Mischergeschwindigkeit bei Verwendung einer Silverson Mischers findet sich in WO-A-97/17063.

[0036] Die Schritte vor und während der Bildung der Mikropartikel sind somit daran angepasst, ausreichend viel Energie einzubringen, um dadurch Mikropartikel in dem gewünschten Grössenbereich zu bilden, welcher typisch 0.01 – 10 Mikrometer ist, aber nicht so viel Energie, dass DNA oder bioaktiver Wirkstoff während des Prozesses beschädigt wird. Hier ist eine Balance erforderlich, indem eine heftigere Bewegung wie z.B. durch höhere Mischergeschwindigkeiten üblicherweise in kleineren Grössen der Mikropartikel resultiert. DNA kann jedoch beschädigt werden durch exzessive Bewegung während der Emulgierung. Auf der anderen Seite kann eine Reduktion des Energieeintrags während der Bildung der Emulsion den Effekt haben, dass keine Emulsion gebildet wird und dass keine Mikropartikel erhalten werden können. Die Erfindung ermöglicht eine Balance dieser konkurrierenden Faktoren, um die Bildung von Mikropartikeln bereitzustellen, welche einen akzeptablen Grad an biologischer Aktivität behalten.

[0037] In weiteren Ausführungsarten der Erfindung umfasst das Verfahren das Aufrechterhalten der Emulgierung der polymeren und wässrigen Lösungen zur Bildung der anfänglichen Wasser-in-Öl Emulsion über eine längere Zeit, um dadurch Tropfen wässriger Phase zu erhalten, von denen ein hoher Anteil zu Mikropartikeln mit einer Grösse bis zu 10 Mikrometern im Durchmesser wird. Dies hat den Vorteil, dass mit verlängerter Bewegung während der Bildung der Wasser-in-Öl Emulsion die Grössenverteilung der Mikropartikel homogener wird.

[0038] Eine längere Emulgierung reduziert den Anteil an Mikropartikeln welche grösser als 10 Mikrometer sind. Desweiteren erzeugt eine verlängerte Emulgierung bei verschiedenen Emulgierungsenergien Grössenverteilungen, die um verschiedene Punkte herum zentriert sind – wobei höhere Energien im Mittel kleinere Mikropartikelgrössen erzeugen. Von daher können durch Modifizieren des Verfahrens die gewünschten Grössen massgeschneidert erhalten werden. Gewisser Stand der Technik hat im Zusammenhang mit einer Aufnahme von Mikropartikeln durch die Peyer-Plaques vorgeschlagen, dass Mikropartikel von 1 bis 5 Mikrometern und solche von 5 bis 10 Mikrometern unterschiedlich aufgenommen werden, und die vorliegende Erfindung erleichtert die Herstellung mit Mikropartikeln mit jeglichem gewählten mittleren Durchmesser. Es ist ebenso bevorzugt, die Bewegung der polymeren und wässrigen Lösungen zur Bildung der Wasser-in-Öl Emulsion über längere Zeit aufrechtzuerhalten zum Erhalt von Mikropartikeln, von denen die meisten und vorzugsweise im wesentlichen sogar alle einen Durchmesser bis zu 10 Mikrometern und mehr als 0.1 Mikrometer Durchmesser haben. In diesem Zusammenhang soll die Referenz auf im wesentlichen alle Partikel bedeuten, das wenigstens drei Viertel der Teilchenzahl, und vorzugsweise sogar wenigstens 90%, eine Grösse innerhalb der gewählten Durchmesser haben.

[0039] Es ist ebenfalls bevorzugt, Ruhepausen zwischen Emulsionszyklen einzuschalten, um es dadurch jeglicher Erwärmung, die während der Bewegung der Emulsion auftritt, zu erlauben, sich abzukühlen, und dadurch Schaden am verkapselten bioaktiven Wirkstoff zu reduzieren.

[0040] Vor allem durch Ausführungsarten der Erfindung, wie sie weiter unten detaillierter beschrieben sind, wird ein Verfahren zur Verkapselung eines bioaktiven Wirkstoffes in einem polymeren Mikropartikel bereitgestellt, umfassend:

Lösen des Polymers in einem Lösungsmittel zur Herstellung einer polymeren Lösung, wobei das Lösungsmittel

Ethylazetat enthält;
 Zubereiten einer wässrigen Lösung eines bioaktiven Wirkstoffes;
 Zusammengeben der polymeren und wässrigen Lösungen unter Bewegen zur Herstellung einer Wasser-in-öl Emulsion;
 Hinzufügen der Wasser-in-Öl Emulsion zu einer weiteren wässrigen Phase unter Bewegen zur Herstellung einer (Wasser-in-Öl)-in-Wasser Emulsion;
 Hinzufügen der (Wasser-in-Öl)-in-Wasser Emulsion zum Überschuss einer wässrigen Phase zur Extraktion des Lösungsmittels unter Bildung von polymeren Mikropartikeln mit einer Grösse von bis zu 10 Mikrometern im Durchmesser;
 wobei das Bewegen der polymeren und wässrigen Lösungen und das Bewegen der Wasser-in-Öl Emulsion sowie der weiteren wässrigen Phase in einem Mischer ausgeführt werden.

[0041] Die Erfindung schafft ferner ein Verfahren zur Herstellung eines in erfindungsgemässen, polymeren Mikropartikeln verkapselten bioaktiven Wirkstoffes unter Verwendung eines Mischapparates zur Ausführung der Emulgierungsschritte. Der Mischapparat umfasst;
 einen Behälter für eine zu mischende Flüssigkeit;
 eine Schaufel zum Mischen von Flüssigkeit in dem Behälter,
 wobei die Schaufel um eine Rotationsachse rotiert und eine Mischaktion ausübt, welche das Antreiben von Flüssigkeit in einer Richtung im wesentlichen entlang der Rotationsachse einschliesst.

[0042] Die Rotation der Schaufel trägt Emulgierungsenergie in die Flüssigkeit ein durch Ausbilden eines schnell rotierenden Wirbels innerhalb der Flüssigkeit der Kammer. Somit unterscheidet sich die Wirkung des Apparates von anderen Mixern welche "Spinning Probes" verwenden, welche Flüssigkeit hochziehen, die dann durch einen Emulsionsschirm extrudiert wird. Eine derartige Behandlung erzeugt erhebliche Scherkräfte und ist hochgradig zerstörerisch für DNA. Ein Vorteil des vorliegenden Apparates ist, dass der bioaktive Wirkstoff wie z.B. DNA niedrigeren Scherkräften und anderen Belastungen während der Verkapselung ausgesetzt ist. Die Mischwirkung des Apparates ist ebenfalls unterschiedlich zu der von Sonikations-Mixern, die Ultraschallpulse zum Eintrag von Emulsionsenergie in die Flüssigkeit verwenden. Ultraschall ist ebenfalls schädigend für DNA und kann eine Fragmentierung der Polynukleotid-Stränge verursachen.

[0043] Die Emulsionsschritte werden bevorzugt ausgeführt unter Verwendung eines Apparates, welcher ein Mischer (blender/mixer) des Waring-(RTM)-Typs ist. Somit umfasst der Mischer eine Kammer zum Mischen der Emulsion und eine rotierende Schaufel, welche in der genannten Kammer fest montiert ist, welche Schaufel eine Mehrzahl von Schaufelendspitzen aufweist, die sich aufwärts und/oder abwärts von der Schaufel aus erstrecken und die grob zwischen 30-60 Grad gegenüber der Schaufel oder sogar senkrecht gegenüber der Schaufel und somit parallel zur Rotationsachse angeordnet sind.

[0044] Es ist ein Vorteil der Benutzung des Apparates nach der Erfindung, dass dieses Verfahren zur Skalierung auf einen industriellen Massstab zur Produktion von Mikropartikeln geeignet ist, in scharfem Kontrast zur Verwendung eines Homogenisators, welcher lediglich geeignet wäre für winzige, für experimentelle Zwecke geeignete Flüssigkeitsvolumina.

[0045] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auch auf eine Veränderung der Polymerschale zur Erzielung modifizierter Freisetzungsraten des Partikelinhalts.

[0046] Entsprechend stellt die vorliegende Erfindung eine Zusammensetzung bereit mit Mikropartikeln von weniger als 10 Mikrometern im Durchmesser welche eine äussere Polymerschale und eine interne wässrige Lösung eines bioaktiven Wirkstoffes enthalten, welche Zusammensetzung ein Mikropartikel umfasst, wobei das Polymer PLG mit einem Molekulargewicht kleiner als 50kD, und bevorzugt bis herab auf 1.5 kD, ist.

[0047] Die vorliegende Erfindung stellt zusätzlich eine Zusammensetzung mit Mikropartikeln mit weniger als 10 Mikrometern im Durchmesser zur Verfügung, welche eine äussere Polymerschale und eine interne wässrige Lösung eines bioaktiven Wirkstoffes enthalten, welche Zusammensetzung ein Mikropartikel umfasst, wobei das Polymer PLG mit einem Molekulargewicht von mehr als 70kD, und bevorzugt bis herauf zu 250kD, ist.

[0048] Die vorliegende Erfindung stellt auch noch eine Zusammensetzung mit Mischungen von Mikropartikeln mit weniger als 10 Mikrometern im Durchmesser zur Verfügung, welche eine äussere Polymerschale und eine interne wässrige Lösung eines bioaktiven Wirkstoffes enthalten, welche Zusammensetzung ein erstes Mikropartikel umfasst, wobei das Polymer PLG mit einem Molekulargewicht kleiner als 50kD ist und ein zweites Mikropartikel umfasst, wobei das Polymer PLG mit einem Molekulargewicht von mehr als 70kD ist. Sehr komple-

xe Mischungen individueller Typen von polymeren Partikeln können gemischt werden und als Kombinationsimpfstoffe oder -therapien verwendet werden.

[0049] Wenn möglich, werden die molekularen Massenverteilungen der Polymere, welche für den Gebrauch im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignet sind, jedoch angegeben durch ihre inhärenten Viskositäten (I.V.). Der I.V.-Wert ist ein quantifizierbarer Wert der leicht messbar und dafür bekannt ist, mit der molekularen Massenverteilung korreliert zu sein. Er bildet deshalb oft eine genauere Beschreibung der molekularen Massenverteilung eines Polymers als der Wert des "mittleren Molekulargewichtes". Der I.V.-Wert wird gemessen als eine Funktion des Volumens pro Einheitsmasse und wird generell ausgedrückt in Dezilitern pro Gramm (dl/g).

[0050] Gemäss einem Aspekt der Erfindung wird ein polymeres Mikropartikel bereitgestellt mit einer Grösse von bis zu 10 Mikrometern im Durchmesser und welches einen bioaktiven Wirkstoff enthält, wobei das Polymer PLG mit einer inhärenten Viskosität kleiner als 0.5 dl/g ist. Der bioaktive Wirkstoff kann DNA sein, so wie z.B. eine DNA, welche für ein Polypeptid codiert, das nach Verabreichung an einen Empfänger exprimiert wird oder eine Antisense-Sequenz codiert.

[0051] Das hat den Vorteil, dass das Mikropartikel aufgebrochen werden kann sobald es in einem Empfänger und durch Antigen präsentierende Zellen aufgenommen ist, jedoch bevor ein erheblicher Teil der DNA sich abgebaut hat.

[0052] Es ist bevorzugt ein Freisetzungsprofil zu erhalten bei welchem die maximale Menge von verkapselter DNA freigesetzt wird, wenn die Mehrzahl der Mikropartikel durch Zellen aufgenommen und internalisiert worden sind. Typische Freisetzungsprofile von bevorzugten Ausführungsarten der Erfindung ergeben eine 30 bis 40%-tige Freisetzung der verkapselten DNA zwischen 1 und 20 Tagen, mehr bevorzugt zwischen 2 und 10 Tagen, nach der Verabreichung an ein Tier. Wenn die Verabreichung auf oralem Weg erfolgt ist es bevorzugt, wenn eine signifikante DNA-Freisetzung erfolgt nach der Passage der Mikropartikel durch den Magen in den Darm des Tieres, wo die Mikropartikel dann aufgenommen werden durch die M-Zellen der Peyer-Plaques, wo sie sich dann zersetzen und die verkapselte DNA freisetzen.

[0053] Es wurde bereits darüber diskutiert, wie die Verwendung von PLG mit niedrigem I.V.-Wert (typischerweise geringes Molekulargewicht) eine verbesserte Immunisierung ergeben könnte wegen eines schnelleren Zerfalls von Partikeln und einer schnelleren Freisetzung des Partikelinhalts als bei Verwendung des Standard 60kD PLG's (mit hohem I.V.-Wert). Sofern eine Zusammensetzung mit Mikropartikeln verwendet wird, die einen Bereich von I.V.-Werten haben (und deshalb auch einen Bereich von Molekulargewichten), kann es ein Vorteil sein, dass diese Kombination einen vorteilhaften Immunisierungseffekt hervorruft.

[0054] In einer besonderen Ausführungsart der vorliegende Erfindung können Freisetzungsprofile für die Mikropartikel durch Einstellung des I.V.Wertes und/oder der Molekularmassenverteilung des Polymers konstruiert werden. In einer besonderen, weiter unten noch detaillierter beschriebenen Ausführungsart der Erfindung wird diese Einstellung ausgeführt durch Kombination von PLG-Zubereitungen mit höheren und niedrigeren I.V.-Werten zur Herstellung eines compositen Polymers mit mittlerem I.V.-Wert. Die mit mittlerem I.V.-Wert des PLG hergestellten Mikropartikel zeigen ein verändertes DNA-Freisetzungsprofil, wobei die DNA um so schneller freigesetzt wird, je grösser der Anteil des vorhandenen Polymers mit dem niedrigeren I.V.-Wert ist. Auf diese Weise werden Mikropartikel nach der Erfindung hergestellt, welche das gewünschte, für orale und andere Verabreichungswege geeignete Freisetzungsprofil zeigen.

[0055] Vorzugsweise liegt der I.V.-Wert im Bereich von 0.1 bis 0.4 dl/g. In besonderen Ausführungsarten der Erfindung konnte festgestellt werden, dass Mikropartikel mit Polymerschalen aus PLG mit einem I.V.-Wert innerhalb dieses Bereichs gute DNA-Freisetzungsprofile zeigten und bei Untersuchung mit dem Rasterelektronenmikroskop eine gute partikuläre Struktur behielten. In besonderen, unten beschriebenen Beispielen der Erfindung wurden Partikel hergestellt mit Mischungen aus PLG mit einem I.V.-Wert von 0.19 dl/g und 0.39 dl/g und diese Partikel zeigten sehr gute zeitliche Freisetzungsprofile.

[0056] Die vorliegende Erfindung bezieht sich ebenso auf Impftherapien und Verfahren unter Verwendung der Mikropartikel nach der vorliegenden Erfindung. Entsprechend stellt die vorliegende Erfindung auch ein Verfahren zur Herstellung eines Mikropartikels zum Gebrauch als oder in einer Impfstoffzusammensetzung zur Verfügung, umfassend das Befolgen der Verfahren nach der vorliegenden Erfindung, wobei das Mikropartikel für ein Antigen codierende DNA enthält.

[0057] Die vorliegende Erfindung stellt weiter auch noch eine Zusammensetzung für den Gebrauch als oder in einer Impfstoffzusammensetzung bereit, umfassend eine erfindungsgemässe Zusammensetzung wie vorstehend beschrieben, wobei das Mikropartikel für ein Antigen codierende DNA enthält, und die Verwendung einer Zusammensetzung nach der Erfindung zur Herstellung eines Medikaments zum Impfen, wobei das Mikropartikel für ein Immunogen codierende DNA enthält.

[0058] In einer speziellen Ausführungsart der Erfindung sind die Mikropartikel angeordnet innerhalb oder umgeben von einer Matrix. Solch eine Matrix wird bevorzugt hergestellt aus biologisch abbaubarem Material, welches sich mit der Zeit zersetzt, um Mikropartikel freizusetzen entweder in einem stetigen Strom oder in periodischen Impulsen. Das erfindungsgemässe Depot wird typischerweise subkutan verabreicht oder in einen anderen Teil des Körpers implantiert. Es ist bevorzugt, dass das Depot teilweise resistent ist gegen Rehydrierung, so dass die im Kern angeordneten Partikel in einem dehydrierten Zustand bleiben bis sie freigesetzt werden, wodurch sichergestellt ist, dass die verkapselte DNA während im wesentlichen der gesamten Lebensdauer des Depots von hoher Integrität ist. Beispiele von zur Herstellung solcher Depots geeigneter Materialien sind in dem Fachgebiet allgemein bekannt und beinhalten, ohne darauf beschränkt zu sein, Polyhydroxybutyrsäure, Polycaprolacton, Silikon, Ethylenvinylazetat und Polyvinylazetat.

[0059] Unter Befolgung von bevorzugten Ausführungsarten der Erfindung, liegt die Mehrzahl (typisch 90% oder mehr) von erhaltenen Mikropartikeln im Grössenbereich von 10 oder weniger Mikrometern. Elektronische Mikrografie von Mikropartikelzubereitungen zeigen, dass die Mehrzahl davon Schalen zu sein scheint ([Fig. 3b](#)). Das Vorhandensein von kleineren Mikropartikeln ist nicht schädlich für die Wirksamkeit der Zubereitung, weil von Mikropartikeln kleiner als 1 Mikrometer immer noch bekannt ist, dass sie durch M Zellen aktiv phagocytiert und anschliessend auf Zellen des mit dem Darm assoziierten lymphatischen Gewebes (GALT) transferiert werden. In der Tat wurde von kleinen Mikropartikeln (kleiner als 2 Mikrometer im Durchmesser) behauptet, dass sie vorteilhaft sind durch Förderung der Aufnahme durch phagocytische Zellen und M-Zellen des Darms. Die Hauptbarriere für die Zubereitung kleiner, bioaktive Moleküle enthaltender Partikel bestand in dem Erfordernis, grosse Menge an potentiell zerstörerischer Energie einzubringen, um die gewünschte Grössenverteilung herzustellen. Ein klarer Vorteil der vorliegenden Erfindung ist, dass die zusätzliche Kontrolle des Energieeintrags durch Anwendung der Mischer-Technologie die Erzeugung kleinerer Partikel ohne Denaturierung des bioaktiven Moleküls erlaubt. Sie offeriert auch die Möglichkeit einer Produktion dieser potentiell verbesserten Freigabevehikel in grossem Masstab.

[0060] Die Grösse der Mikropartikel ist sehr wichtig im Prozess der Phagozytose von Mikropartikeln durch M-Zellen und für den Tranfer von Zelle zu Zelle. Es ist bekannt, dass Mikropartikel mit Grössen grösser als 10 Mikrometern nicht aufgenommen und durch das Darmepithel transportiert werden. In einigen der nach dem Stand der Technik hergestellten Zubereitungen haben wir erhebliche Zahlen von Mikropartikeln mit Durchmessern von 10 bis 60 Mikrometern gesehen, d.h. grösser als die benötigte optimale Grösse. Unter Berücksichtigung, dass das Volumen einer Kugel nach einer kubischen Funktion berechnet wird, ist es vollständig plausibel, dass in derartigen Präparationen die meiste pDNA in den grossen Schalen enthalten sein könnte. Das würde sie für das Immunsystem unverfügbar machen und somit könnte die Dosis erheblich niedriger als vorausgesehen sein, ein Problem hierin überwunden durch Befolgen der Verfahren wie in der vorliegenden Erfindung beschrieben, was in Zubereitungen von Mikropartikeln resultiert mit einer Mehrheit von Mikropartikeln im gewünschten Grössenbereich von bis zu 10 Mikrometern.

[0061] Die Kontrolle der Freisetzungsscharakteristiken der Mikropartikel nach der Erfindung wurde abgehandelt. Wie der bioaktive Wirkstoff von der Mikroschale genau freigegeben wird, ist unklar – möglicherweise in einem Schwall, wenn die Schale sich durch Hydrolyse abbaut. Dies führt zu einer anhaltenden Freisetzung, weil die Mikropartikelzerstörung zu verschiedenen Zeiten auftritt. Die Zeitspanne kann sich vorstellbar über eine kürzere Zeitspanne erstrecken als vorher angenommen und ist durch das polymere Molekulargewicht wie beschrieben kontrollierbar.

[0062] Eine Reihe von Surfactanten ist zur Verwendung im Rahmen der Erfindung geeignet und die vorliegende Erfindung ist nicht eingeschränkt auf den bestimmten, in den Beispielen verwendeten Surfactanten Polyvinylalkohol. Andere akzeptable Surfactanten sind im Stand der Technik bekannt, wobei Methylzellulose ein weiteres Beispiel ist. Der Surfactant dient dazu, die doppelte Emulsion zu stabilisieren. Die Wahl eines wässrigen Surfactanten kann dem Fachmann überlassen werden, wobei dieser die Wahl unter Berücksichtigung der Wahl des Polymers und des polymeren Lösungsmittels trifft.

[0063] Anderes relevantes Hintergrundwissen in Bezug auf die Aufnahme von Mikropartikeln durch M-Zellen im Darm wird vermittelt durch:

Jepson MA et al, Journal of Drug Targeting, 1993, Vol. 1 pp 245-249;
 Howard KA et al, Pharmaceutical Science Communications, 1994, Vol. 4, pp 207-216;
 Neutra MR et al, Cell, 1996, Vol. 86, pp 345-348;
 Florence AT, Pharmaceutical Research, 1997, Vol. 14, pp 259 et seq;
 O'Hagen DT, J. Anat., 1996, Vol. 189, pp, 477-482; and
 Kreutzer J, J. Anat., 1996, Vol. 189, pp 503-505.

[0064] Die vorliegende Erfindung wird nunmehr beschrieben in speziellen Ausführungsarten mit Bezug auf die beigefügten Zeichnungen in welchen:

[0065] [Fig. 1](#) ein Agarosegelelektrophorese zeigt, welches den physikalischen Zustand der DNA wiedergibt, die von mit Dichlormethan (Lösungsmittel des Standes der Technik) und Ethylazetat (in Übereinstimmung mit der Erfindung) hergestellten Mikropartikeln zurückgewonnen wurde;

[0066] [Fig. 2](#) Freisetzungsprofile von DNA aus PLG-Mikropartikeln zeigt, die aus einem Polymer mit hohem und oder niedrigem Molekulargewicht hergestellt wurden;

[0067] [Fig. 3a](#), [Fig. 3b](#), [Fig. 4a](#) und [Fig. 4b](#) rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Mikropartikeln nach dem Stand der Technik und nach der Erfindung zeigen;

[0068] [Fig. 5](#) DNA-Freisetzungsprofile von Mikropartikel-Zubereitungen zeigen, die mit PLG verschiedener inhärenter Viskositäten hergestellt wurden.

[0069] [Fig. 1](#) zeigt ein Agarosegel, welches die relativen Anteile und den relativen physischen Zustand von DNA wiedergibt, die aus äquivalenten Gewichtsmengen von PLG-Mikropartikeln zurückgewonnen wurde, die entweder mit Dichlormethan (Stand der Technik: Spur 3) oder Ethylazetat (in Übereinstimmung mit der Erfindung: Spuren 4 (hochmolekulargewichtiges PLG), Spur 5 (niedermolekulargewichtiges PLG)) hergestellt worden sind. Spur 2 ist eine Kontroll-DNA (Lagerware (stock)), die einen grossen Anteil an supergewendelter Form zeigt (unteres Band) und Spur 1&6 sind die Molekulargewichtsmarker. Der Vergleich von Spur 3 mit den Spuren 4&5 legt nahe, dass Ethylazetat nicht nur die Verkapselung von DNA fördert, sondern auch die Beibehaltung eines grösseren Anteils an supergewendelter Form (unteres Band) im Vergleich mit der offen zirkularen Form (oberes Band) zur Folge hat. Es sollte zu Kenntnis genommen werden, dass der geringere Einschluss von DNA in der in Spur 4 (hochmolekulargewichtiges PLG) analysierten Zubereitung ein Ergebnis einer Bildung von Mikropartikeln in Anwesenheit einer limitierenden Menge von Polymer auf Grund dessen geringerer Löslichkeit in Ethylazetat ist.

[0070] [Fig. 2](#) zeigt die in vitro Freisetzungskinetik der PLG-Mikropartikel nach der Erfindung. Die Mikropartikel wurden hergestellt unter Verwendung von hoch (■-■), oder nieder (◇-◇) molekulargewichtigem PLG. DNA Konzentrationen in Aliquots von Supernatants geliefert von sterilen Inkubationen von Mikropartikeln verteilt in einem Puffer gehalten auf 37 Grad C wurden gemessen unter Verwendung von optischer Absorptionsspektroskopie.

[0071] [Fig. 3a](#) zeigt eine Zubereitung von PLG-Mikropartikeln (hergestellt gemäss der vorliegenden Erfindung), welche auf ein EM Probengitter als lyophilisiertes Pulver angewendet wurden. Die Gleichmässigkeit der Struktur deutet darauf hin, dass die Partikel durch Gefriertrocknen nicht negativ beeinflusst werden.

[0072] [Fig. 3b](#) demonstriert die schalenartige Struktur von PLG-Mikropartikeln (gemäss der vorliegenden Erfindung), die unter optimalen Bedingungen hergestellt wurden. Die Probe war durch Gefrieren gebrochen. Die hohlen Innenräume dieser Partikel sind deutlich erkennbar und sind sehr verschieden von im Stand der Technik gegebenen Beispielen.

[0073] [Fig. 4](#) zeigt eine Zubereitung von PLG-Mikropartikeln (hergestellt nach der vorliegenden Erfindung), welche aus einem hydratisierten Slurry auf einem EM Probengitter bei Raumtemperatur getrocknet wurden. Die Belastungen während der Verdampfung des Wassers haben einen strukturellen Kollaps in verschiedenen Ausmassen herbeigeführt, was darauf hinweist, dass die Mikropartikel eine "schalenförmige" Struktur mit einem hohlen Inneren gehabt haben könnten.

[0074] [Fig. 4b](#) zeigt die interne Struktur von Mikropartikeln, die unter Bedingungen mit Lösungsmittel:wässriger Phase im Überschuss (grösser als 4:1) hergestellt worden sind. Die Zubereitungen wurden unter Verwendung von flüssigem Stickstoff eingefroren und Proben wurden während des Gefrierens zerbrochen zum Erhalt

von Partikeln mit unterschiedlich ausgebildeten inneren Strukturen.

[0075] [Fig. 5](#) zeigt den mit der Zeit freigesetzten prozentualen Anteil von DNA aus PLG-Mikropartikeln hergestellt aus PLG Zubereitungen mit variierender inhärenter Viskosität. PLG mit niedriger inhärenter Viskosität ist als RG502 bezeichnet und PLG mit höherer inhärenter Viskosität als RG503. Die Freisetzen von DNA aus Mikropartikeln, die aus Mischungen von 50:50 und 75:25 von RG502 und RG503 hergestellt wurden, sind ebenfalls dargestellt und repräsentieren PLG Zubereitungen mit einer inhärenten Viskosität zwischen derjenigen von RG502 und RG503.

Beispiel 1

Standardverfahren zur Mikroverkapselung

[0076] Es wurden Mikropartikel hergestellt nach dem Verfahren wie nunmehr beschrieben, welches Verfahren als Standardverfahren zur Mikroverkapselung bezeichnet wird:

1. Eine 10%-tige (G/V) 50:50 niederviskose (60kD) PLG Lösung in Ethylazetat (über Natriumcarbonat getrocknet) wird hergestellt durch Erhitzen der Mischung auf um die 37 Grad C und durch Rollen bis die Auflösung vollständig ist.
2. Eine plasmidische DNA Lösung wird hergestellt mit einer Konzentration von 10mg/ml in STE-Puffer (10mM Tris HCl, pH 8.0; 1mM EDTA; 150mM NaCl).
3. Die PLG-Ethylazetat-Lösung (4ml) wird homogenisiert bei 3000 Upm unter Verwendung eines Silverson Homogenisators und die plasmidische DNA (600 Microliter) wird zugegeben. Die resultierende Mischung wird homogenisiert während weiterer 2.5 Minuten.
4. 8%-tige (G/V) wässriger Polyvinylalkohol-Lösung (92ml) wird homogenisiert in einem Rundbodenkolben bei etwa 3000 Upm, die erste Emulsion wird hinzugegeben und die resultierende Mischung wird während weiterer 2.5. Minuten homogenisiert.
5. Die Emulsion wird bei 37 Grad C in doppelt destilliertes Wasser (100 ml – 1l) gegossen und wenigstens 20 Minuten lang gerührt.
6. Die Mikropartikel werden gewonnen durch Zentrifugieren bei 10'000 Upm während 25 Minuten bei 25 Grad C.
7. Die Mikropartikel werden gewaschen durch Wiederaufschlännen in doppelt destilliertem Wasser und Zentrifugieren. Dieser Waschvorgang wird über 5 Durchläufe wiederholt, um die Entfernung des Lösungsmittels und des Emulsions-Stabilisators zu erleichtern.
8. Nach dem 5. Durchgang werden die pelletierten Mikropartikel zurückgewonnen in Form eines Slurry in einer minimalen Menge an doppelt destilliertem Wasser und gefriergetrocknet. Eine typische Zubereitung zeigt [Fig. 3a](#).

Variationen des Standardverfahrens

[0077] Basierend auf dem obigen Standardverfahren wurden eine Anzahl von Variationen bezüglich der Schritte und/oder der Komponenten gemacht, mit folgendem Ergebnis:

1. Lösungen von sowohl 50:50 niedrigem (50kD und darunter) MG und 50:50 hohem (70kD und höher) MG PLG in Ethylazetat wurden untersucht und befunden, Zubereitungen von Mikropartikeln mit einer Grösse von bis zu 10 Mikrometern zu ergeben. Andere PLG-Zusammensetzungen z.B. 75:25 und Polymere mit höherem oder niedrigerem MG sind ebenfalls geeignet für die Mikropartikel und Verfahren nach der Erfindung.
2. Das G/V-Verhältnis von PLG zu EA wurde untersucht. Mit dem hohen MG Polymer führte eine Reduktion auf 0.04 g/ml zu einer markanten Abnahme der Einschlusseffizienz ([Fig. 1](#)). Der maximal getestete Wert war 0.125 g/ml, der die Verkapselung verbesserte, Mikropartikel im Grössenbereich 1 bis 10 Mikrometer erzeugte, jedoch zu trüben Lösungen vor der Verkapselung führte.
3. Die Verwendung von Hilfslösungsmitteln zur Verbesserung der Konzentration von PLG in der organischen Phase wurde untersucht. Hilfslösungsmittel wie z.B. Propylencarbonat und Azeton in Kombination mit Ethylazetat haben die Zubereitung einer anfänglichen Wasser-in-Öl Emulsion ermöglicht mit einem erhöhten Anteil an in der öligen (Lösungsmittel) Phase gelöstem Polymer. Dies wurde mit Vorteil befunden, die Einschlusseffizienz von DNA in Mikropartikel zu verbessern.
4. Das Verhältnis von wässriger Phase zu polymerer Phase im ersten Emulgierungsschritt wurde variiert innerhalb der angegebenen Bereiche und es wurde gefunden, dass wabenförmige Strukturen vermieden werden und die Mikropartikelgrösse kontrolliert werden kann, was zu einer Zubereitung von Teilchen im wesentlichen vollständig in dem gewünschten Bereich und mit den gewünschten Strukturen führt.
5. Die Homogenisierungsgeschwindigkeit für die erste Emulgierung wurde variiert. Durch Verwendung eines Silverson-Mischers ist es möglich, die Homogenisierungsgeschwindigkeit auf 4000 Upm zu erhöhen

und dabei immer noch etwas DNA-Lebensfähigkeit zu erhalten. Allerdings ergeben 2000 Upm eine gute DNA-Lebensfähigkeit und sind in ausreichendem Masse nichtschädigend für eine ausgedehnte Homogenisierung bei dieser Geschwindigkeit, führen nicht zu einer erheblichen DNA-Schädigung und erlauben hingegen die Bildung von Mikropartikeln mit einer engen Grössenverteilung. 3000 Upm können ebenfalls verwendet werden über ausgedehnte Zeitperioden ohne signifikante Beschädigung der DNA.

6. Die Verwendete PVA-Konzentration ist im Überschuss gedacht und Konzentrationen von 2% sind als geeignet angenommen worden. Das hat ebenfalls einen Einfluss auf die Viskosität der Mischung, die ebenfalls die Stabilität und Grösse der Mikropartikel beeinflussen kann.

7. Das kleinste Volumen an Wasser, das in der letzten Stufe erfolgreich verwendet wurde, war 150 ml. Das Rühren wurde ausgeführt bei Raumtemperatur unter Verwendung von Wasser von ursprünglich 37 Grad C bis zu 1.5 Stunden, obwohl es keine theoretische obere Grenze für die Rührzeit zu geben scheint.

8. Die Temperatur bei welcher das Verfahren ausgeführt wird, beeinflusst Parameter wie die Viskosität der Lösungen und die Lösbarkeit von Reagenzien in anderen Phasen. Ein einziges, bei 4 Grad C mit Ethylazetat ausgeführtes Experiment, ergab einen geringeren Einschluss.

Beispiel 2

Vergleich von Lösungsmitteln und hoch und nieder molekulargewichtigem 5050 PLG

[0078] Die nachstehenden Experimente wurden ausgeführt unter Verwendung des Standardverfahrens, bei welchem EA = Ethylazetat und DCM = Dichlormethan. Das PLG Volumen betrug in jedem Fall 4 ml. Kein EtOH wurde in irgendeinem der Experimente verwendet. Die Resultate sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

Tabelle 1

PLG M.Gw.	Konzentration %	Lösungsmittel	Einschluss (ug/mg)	Effizienz (%)
60kD	12.5	DCM	1.4	8.9
90kD	10	DCM	1.4	6.6
60kD	12.5	EA	18.3	74.3
90kD	10	EA	11.8	62.8

Beispiel 3

Physischer Zustand von aus den Mikropartikeln zurückgewonnener DNA

[0079] [Fig. 1](#) zeigt den physischen Zustand von DNA, die aus aus Mikropartikeln zurückgewonnen wurde, welche mit Dichlormethan und Ethylazetat hergestellt wurden. Das unterste Band ist supergewendelte DNA. Je grösser die Intensität dieses Bandes ist, umso mehr ist die Integrität der DNA erhalten geblieben.

Beispiel 4

Transfektionsergebnisse

[0080] Experimente wurden mit Verozellen ausgeführt. DNA wurde zurückgewonnen von Mikrokapseln und Verozellen damit transfiziert unter Verwendung von SUPERFECT REAGENT (registrierte Handelsmarke).

[0081] Weitere Experimente wurden ausgeführt, bei welchen Verozellen mit DNA enthaltenden Mikropartikeln transfiziert wurden, wobei jedoch keine zusätzlichen Reagenzien zur Erhöhung der Transfizierung verwendet wurden. Das Ausmass der Transfizierung wurde ermittelt unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Luciferase-Analyse-Systems und die Ergebnisse sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

Tabelle 2

Muster	Messergebnis
Negative Kontrolle (nur Zellen)	9
Positive Kontrolle (2ug pLuc)	100000 (verdünnt 1:100)
DNA zurückgewonnen aus EA MP (2ug pLuc)	40748 (verdünnt 1:100)
pLuc enthaltend MP zubereitet mit EA	29937

Beispiel 5

Effekt der PLG-Konzentration

[0082] Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse, die erzielt wurden, nachdem die Konzentration von niedrigem MoLG (60kD) PLG reduziert wurde. In diesen vergleichenden Experimenten wurde Ethylazetat als Lösungsmittel verwendet, das Volumen der organischen Phase wurde bei 4 ml gehalten. Homogenisierungsgeschwindigkeiten von 3000 Ups wurden in allen Fällen benutzt.

Tabelle 3

PLG Konzentration	Einschluss (ug/mg)	Effizienz (%)
10.0	18.3	74.3
8.0	12.4	51.1
6.0	12.3	39.1

Beispiel 6

Verwendung von Hilfslösungsmitteln

[0083] Hoch molekulargewichtiges PLG ist nicht vollständig löslich bei oder über 10% G/V in Ethylazetat. Um die PLG-Konzentration zu erhöhen wurde die Anwendung von Mischungen von Lösungsmitteln wie z.B. Ethylazetat und Propylenecarbonat untersucht.

[0084] 80% Ethylazetat : 20 % Propylenecarbonat ergibt eine klare Lösung von 10 % G/V PLG.

Beispiel 7

Freisetzungskinetik

[0085] Proben von Mikropartikeln, die mit Ethylazetat unter Verwendung von hoch und niedrig MG Polymeren hergestellt worden waren, wurden untersucht, um die Freisetzungskinetik zu bestimmen. Die Mikropartikel wurden zu sterilem STE Puffer hinzugegeben und bei 37 Grad C mit einem geeigneten antibakteriellen Wirkstoff gehalten. Proben wurden in Intervallen entfernt und die freigesetzte sowie die zurückgehaltene DNA wurde bestimmt. Die Resultate sind dargestellt in [Fig. 2](#).

Beispiel 8

Mit Polycaprolacton als Polymer hergestellte Mikropartikel

[0086] Mikropartikel wurden hergestellt unter Verwendung von Polycaprolacton-Polymer mit dem folgenden Verfahren:

1. Eine 100 mg/ml Lösung von Polycaprolacton (mittleres MG = 14 kD; Aldrich Chemical Company) in Ethylazetat wird hergestellt durch Verwirbeln bis die Auflösung vollständig ist.
2. Eine plasmidische DNA Lösung wird hergestellt mit einer Konzentration von 9.9 mg/ml in STE-Puffer (10mM Tris HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA; 150mM NaCl).
3. Die Polycaprolacton-Ethylazetat-Lösung (4ml) wird homogenisiert bei niedriger Leistung in einem Waring-Mischer und die plasmidische DNA (400 Microliter) wird zugegeben. Die resultierende Mischung wird homogenisiert während vier Zyklen von jeweils fünfzehn Sekunden unter Zwischenschaltung von jeweils 15 Sekunden dauernden Ruheperioden.
4. 8%-tige (G/V) wässrige Polyvinylalkohol-Lösung (66ml) wird homogenisiert in einem Waring-Mischer bei niedriger Leistung, die erste Emulsion wird hinzugegeben und die resultierende Mischung wird während vier Zyklen von jeweils fünfzehn Sekunden unter Zwischenschaltung von jeweils 15 Sekunden dauernden Ruheperioden homogenisiert.
5. Die Emulsion wird bei 37 Grad C in doppelt destilliertes Wasser (300 ml) gegossen und wenigstens 20 Minuten lang gerührt.
6. Die Mikropartikel werden gewonnen durch Zentrifugieren bei 10'000 Upm während 25 Minuten bei 25 Grad C.
7. Die Mikropartikel werden gewaschen durch Wiederaufschlännen in doppelt destilliertem Wasser und Zentrifugieren. Dieser Waschvorgang wird über 5 Durchläufe wiederholt, um die Entfernung des Lösungsmittels und des Emulsions-Stabilisators zu erleichtern.
8. Nach dem 5. Durchgang werden die pelletierten Mikropartikel zurückgewonnen in Form eines Slurry in einer minimalen Menge an doppelt destilliertem Wasser. Es werden Mikropartikel erhalten vornehmlich im Grössebereich 1 – 10 Mikrometer im Durchmesser und dann zur Lagerung gefriergetrocknet.

Beispiel 9

Modifikation der Freisetzungsprofils von PLG-Mikropartikeln durch Änderung der inhärenten Viskosität der Polymers

[0087] Das Verfahren von Beispiel 8 wurde angewendet unter Verwendung der folgenden PLG-Zubereitungen:

- (a) inhärente Viskosität von 0.19 dl/g (RG502, von Böhrringer Ingelheim)
- (b) inhärente Viskosität von 0.39 dl/g (RG503, von Böhrringer Ingelheim)
- (c) Mischung von 50:50 im Gewichtsverhältnis von PLG mit inhärenten Viskositäten 0.19 und 0.39 dl/g (Mischung von RG502 und RG503).
- (d) Mischung von 75:25 im Gewichtsverhältnis von PLG mit inhärenten Viskositäten 0.19 und 0.39 dl/g (Mischung von RG502 und RG503).

[0088] Mikropartikel mit einer Grösse vornehmlich von 1 bis 10 Mikrometern werden erhalten und die Freisetzungsprofile von DNA aus den Partikeln gemessen und dargestellt in [Fig. 5](#).

Beispiel 10

[0089] Das Protokoll von Beispiel 8 wurde angewendet mit folgenden Variationen: 8 ml polymere Lösung und 0.8 ml plasmidische Lösung wurden verwendet und 132ml PVA wurde eingesetzt zur Stabilisierung der ersten Emulsion.

[0090] Plasmide wurden verkapselt in PLG wie folgt:

- (a) Mischung von 50:50 RG502 und RG503;
- (b) Wiederholen der (a) Mischung;
- (c) Mischung von 70:30 RG502 und RG503;
- (d) Wiederholen der (b) Mischung;

[0091] Mikropartikel mit einer Grösse vornehmlich von 1 bis 10 Mikrometern werden erhalten und getestet bezüglich der Einschlusseffizienz von DNA. Von den Mikropartikeln von (a) und (b) wurden 65% zurückgewonnen als verkapselte DNA und von denen von (c) und (d) 69%. Die % Zahl berücksichtigt nicht die Tatsache, dass ein Anteil der DNA verlorengeht bei der Isolierung der Partikel, z.B. durch Zentrifugieren und das als Konsequenz die Zurückgewinnung nicht 100%-tig effizient sein kann. Die in diesen Beispielen erhaltenen Zahlen repräsentieren somit eine sehr hohe Einschlusseffizienz.

[0092] Die Erfindung stellt somit weitere und verbesserte Verfahren zur Verkapselung von bioaktivem Wirk-

stoff, insbesondere DNA, und weiter verbesserte Zusammensetzungen umfassend bioaktive Wirkstoffe enthaltende Mikropartikel für die Gentherapie und/oder Impfung oder andere Anwendungen zur Verfügung.

Tabelle 4

Zugriffsnummern von als vermeintliche oder schützende Antigene identifizierte Gene gegen spezifische Pathogene

Organismus	Protein/Glycoprotein	Zugriffsnummer	Datenbasis
Bordetella Pertussis	FHA; PT	P12255; M13223	Swiss Prot; Genbank
Bordetella Bronchiseptica	68kD-Pertactin	X54815	Genbank
Clostridium Tetani	Tetanus Toxin	P04958	Genbank
CMV	gp48	A32390	Swiss Prot
Dengue Virus	NS1; Capsid	S37468; Z794047	Swiss Prot
EBV	gp350	A43042; S33008; A03762	Swiss Prot
Flavivirus	NS3	S79821 S79825 S79826; S79830	
Hepatitis B Virus	SA	V00867; X02763	Genbank
Herpes Simplex Virus	I	P06487	Genbank
Influenza Virus	NP	H36754	Swiss Prot
JEV	E; M; gp340	M18370	Swiss Prot
Measles Virus	F; H	D00090; N00090; Z80790	Genbank
Mumps Virus	HN	X93178	Genbank
Mycoacteria Tuberculosis	350kD Protein	M69187	Genbank
Rotavirus	VP1	P35942	Swiss Prot
Rubella Virus	E1:E2	A27505; D00156	Swiss Prot, Genbank

TBE	C, M, E	X07755; M97369	Genbank
Vibrio Cholerae	MSHA	X77217	Genbank

Patentansprüche

1. Verfahren zur Verkapselung eines bioaktiven Wirkstoffes in einem polymeren Mikropartikel, umfassend:
Lösen von Polymer in einem Lösungsmittel zur Herstellung einer polymeren Lösung;
Zubereiten einer wässrigen Lösung eines bioaktiven Wirkstoffes; Zusammengeben der polymeren und wässrigen Lösungen unter Bewegen zur Herstellung einer Wasser-in-Öl Emulsion;
Hinzufügen der Wasser-in Öl Emulsion zu einer weiteren wässrigen Phase unter Bewegen zur Herstellung einer (Wasser-in-Öl)-in-Wasser Emulsion;
Hinzufügen der (Wasser-in-Öl)-in-Wasser Emulsion zum Überschuss einer wässrigen Phase zur Extraktion des Lösungsmittels unter Bildung von polymeren Mikropartikeln mit einer Grösse von bis zu 10 Mikrometern im Durchmesser, wobei die genannten Mikropartikel bioaktiven Wirkstoff in wässriger Lösung enthalten;
wobei das Lösungsmittel Ethylazetat enthält.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Verhältnis Lösungsmittel : wässrige Phase bei der Herstellung der Wasser-in-Öl Emulsion im Bereich von 4 : 1 bis 20 : 1 (Volumen : Volumen) liegt.
3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das Verhältnis Lösungsmittel : wässrige Phase bei der Herstellung der Wasser-in-Öl Emulsion im Bereich von 5 : 1 bis 12 : 1 (Volumen : Volumen) liegt.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das Polymer PLG ist und das Lösungsmittel Ethylazetat und ein Hilfslösungsmittel (co-solvent) enthält, welches die Menge an PLG erhöht, die in dem Lösungsmittel gelöst werden kann.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, umfassend das Aufrechterhalten des Bewegens der polymeren und wässrigen Lösungen zur Herstellung der Wasser-in-Öl Emulsion über einen längeren Zeitraum, um Mikropartikel zu erhalten, welche in ihrer Mehrzahl von einer Grösse von bis zu 10 Mikrometern im Durchmesser sind.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, umfassend das Aufrechterhalten des Bewegens der polymeren und wässrigen Lösungen zur Herstellung der Wasser-in-Öl Emulsion über einen längeren Zeitraum, um Mikropartikel zu erhalten, welche in ihrer Mehrzahl von einer Grösse von bis zu 10 Mikrometern im Durchmesser und von mehr als 1 Mikrometer im Durchmesser sind.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Polymer PLG mit einem Molekulargewicht grösser als 70 kD ist.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Polymer PLG mit einem Molekulargewicht kleiner als 50 kD ist.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei der bioaktive Wirkstoff ausgewählt ist aus RNA, proteinischem Antigen, nicht-proteinischem Antigen, protein-oder-peptidkonjugierten Polyasaccariden, Protein-oder Peptid-DNA Komplexen, synthetischen Peptiden, synthetischen Proteinen, DNA-Viren, Zytokinen, Krebstherapeutika, Mini-Genen und wasserlöslichen Pharmazeutika, optional begleitet durch Hilfsstoffe (Excipienten) und/oder Adjuvanten, wobei ein Beispiel dafür Alaun ist.
10. Verfahren zur Verkapselung von DNA in einem polymeren Mikropartikel, umfassend:
Lösen von Polymer in einem Lösungsmittel zur Herstellung einer polymeren Lösung;
Zubereiten einer wässrigen DNA-Lösung;
Zusammengeben der polymeren und DNA-Lösungen unter Bewegen zur Herstellung einer Wasser-in-Öl Emulsion;
Hinzufügen der Wasser-in-Öl Emulsion zu einer weiteren wässrigen Phase unter Bewegen zur Herstellung einer (Wasser-in-Öl)-in-Wasser Emulsion;
Hinzufügen der (Wasser-in-Öl)-in-Wasser Emulsion zum Überschuss einer wässrigen Phase zur Extraktion des Lösungsmittels unter Bildung von polymeren Mikropartikeln mit einer Grösse von bis zu 10 Mikrometern

im Durchmesser, wobei die genannten Mikropartikel DNA in wässriger Lösung enthalten;
wobei die DNA eine Codierungssequenz enthält und die Expression der Codierungssequenz in einem Empfänger nach oraler Verabreichung induziert, und wobei das Lösungsmittel Ethylazetat enthält.

11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei das Verhältnis Lösungsmittel : wässrige Phase bei der Herstellung der Wasser-in-Öl Emulsion im Bereich von 4 : 1 bis 20 : 1 (Volumen : Volumen) liegt.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei das Verhältnis Lösungsmittel : wässrige Phase bei der Herstellung der Wasser-in-Öl Emulsion im Bereich von 5 : 1 bis 12 : 1 (Volumen : Volumen) liegt.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12, wobei das Lösungsmittel Ethylazetat und ein Hilfslösungsmittel (co-solvent) enthält, welches die Menge an Polymer erhöht, die in dem Lösungsmittel gelöst werden kann.

14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei das Polymer Poly-(DL Lactid-Co-Glycolid) (PLG) und die Konzentration von PLG in der polymeren Lösung wenigstens 10% G/V ist.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 14, umfassend Aufrechterhalten des Bewegens der polymeren und wässrigen Lösungen zur Herstellung der Wasser-in-Öl Emulsion über einen längeren Zeitraum zum Erhalt von Mikropartikeln, welche in ihrer Mehrzahl von einer Grösse von bis zu 10 Mikrometern im Durchmesser sind.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 15, umfassend Aufrechterhalten des Bewegens der polymeren und wässrigen Lösungen zur Herstellung der Wasser-in-Öl Emulsion über einen längeren Zeitraum, um Mikropartikel zu erhalten, welche in ihrer Mehrzahl von einer Grösse von bis zu 10 Mikrometern im Durchmesser und mehr als 0.1 Mikrometer im Durchmesser sind.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 16, wobei das Polymer PLG mit einem Molekulargewicht grösser als 70 kD ist.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Polymer PLG mit einem Molekulargewicht kleiner als 50 kD ist.

19. Zusammensetzung umfassend Mikropartikel mit weniger als 10 Mikrometern im Durchmesser, welche eine äussere Polymerschale und eine innere wässrige Lösung eines bioaktiven Wirkstoffes enthalten, wobei die genannte Zusammensetzung einen Mikropartikel enthält, wobei das Polymer PLG mit einem Molekulargewicht von mehr als 80 kD ist.

20. Zusammensetzung umfassend Mikropartikel mit weniger als 10 Mikrometern im Durchmesser, welche eine äussere Polymerschale und eine innere wässrige Lösung eines bioaktiven Wirkstoffes enthalten, wobei die genannte Zusammensetzung einen Mikropartikel enthält, wobei das Polymer PLG mit einem Molekulargewicht von weniger als 40 kD ist.

21. Zusammensetzung umfassend eine Mischung von Mikropartikeln mit weniger als 10 Mikrometern im Durchmesser, welche eine äussere Polymerschale und eine innere wässrige Lösung eines bioaktiven Wirkstoffes umfassen, wobei die genannte Zusammensetzung einen ersten Mikropartikel enthält, wobei das Polymer PLG mit einem Molekulargewicht von weniger als 40 kD ist, und einen zweiten Mikropartikel enthält, wobei das Polymer PLG mit einem Molekulargewicht von mehr als 80 kD ist.

22. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 19 – 21, wobei der bioaktive Wirkstoff ausgewählt ist aus proteinischem Antigen, nicht-proteinischem Antigen, protein-oder-peptidkonjugierten Polyasaccariden, Protein- oder Peptid-DNA Komplexen, synthetischen Peptiden, synthetischen Proteinen, DNA-Viren, Zytokinen, Krebstherapeutika, Mini-Genen und wasserlöslichen Pharmazeutika.

23. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 10 bis 21, wobei der bioaktive Wirkstoff DNA ist enthaltend eine Codierungssequenz, und wobei das Mikropartikel bei oraler Verabreichung die Expression der Codierungssequenz induziert.

24. Verfahren zur Herstellung eines Mikropartikels zur Verwendung als oder in einer Impf-Zusammensetzung, umfassend Folgen dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 – 18, wobei das Mikropartikel für ein An-

tigen codierende DNA enthält.

25. Zusammensetzung zur Verwendung als oder in einer Impf-Zusammensetzung, umfassend eine Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 19 bis 23, wobei das Mikropartikel für ein Antigen codierende DNA enthält.

26. Verwendung einer Zusammensetzung nach einer der Ansprüche 19 – 23 bei der Herstellung eines Medikaments zum Impfen, wobei das Mikropartikel für ein Immunogen codierende DNA enthält.

27. Verfahren zu Verkapselung eines bioaktiven Wirkstoffes in einem polymeren Mikropartikel, umfassend:
Lösen von Polymer in einem Lösungsmittel zur Herstellung einer polymeren Lösung, wobei das Lösungsmittel Ethylazetat enthält;
Zubereiten einer wässrigen Lösung eines bioaktiven Wirkstoffes;
Zusammengeben der polymeren und wässrigen Lösungen unter Bewegen zur Herstellung einer Wasser-in-Öl Emulsion;
Hinzufügen der Wasser-in-Öl Emulsion zu einer weiteren wässrigen Phase unter Bewegen zur Herstellung einer (Wasser-in-Öl)-in-Wasser Emulsion;
Hinzufügen der (Wasser-in-Öl)-in-Wasser Emulsion zum Überschuss einer wässrigen Phase, zur Extraktion des Lösungsmittels unter Bildung von polymeren Mikropartikeln mit einer Grösse von bis zu 10 Mikrometern im Durchmesser, wobei die genannten Mikropartikel bioaktiven Wirkstoff in wässriger Lösung enthalten;
wobei die das Bewegen umfassenden Schritte ein Bewegen der Lösungen oder Emulsionen in dem Mischsektor eines Mischers und eine Verwendung eines Mischblattes umfassen, welches den Inhalt des Mischsektors sowohl bewegt als auch mischt.

28. Verfahren nach Anspruch 27, wobei das Mischen über für einen längeren Zeitraum weitergeführt wird, um Mikropartikel zu erhalten, welche in ihrer Mehrzahl von einer Grösse von bis zu 10 Mikrometern im Durchmesser und mehr als 1 Mikrometer im Durchmesser sind.

29. Verfahren zur Verkapselung eines bioaktiven Wirkstoffes in einem polymeren Mikropartikel, umfassend:
Lösen von Polymer in einem Lösungsmittel zur Herstellung einer polymeren Lösung, wobei das Lösungsmittel Ethylazetat enthält;
Zubereiten einer wässrigen Lösung eines bioaktiven Wirkstoffes;
Zusammengeben der polymeren und wässrigen Lösungen unter Bewegen zur Herstellung einer Wasser-in-Öl Emulsion;
Hinzufügen der Wasser-in-Öl Emulsion zu einer weiteren wässrigen Phase unter Bewegen zur Herstellung einer (Wasser-in-Öl)-in-Wasser Emulsion;
Hinzufügen der (Wasser-in-Öl)-in-Wasser Emulsion zum Überschuss einer wässrigen Phase, zur Extraktion des Lösungsmittels unter Bildung von polymeren Mikropartikeln mit einer Grösse von bis zu 10 Mikrometern im Durchmesser, wobei die genannten Mikropartikel bioaktiven Wirkstoff in wässriger Lösung enthalten;
wobei das Polymer PLG mit einem Molekulargewicht von 40 kD oder geringer umfasst oder daraus besteht.

30. Verfahren zu Verkapselung eines bioaktiven Wirkstoffes in einem polymeren Mikropartikel, umfassend:
Lösen von Polymer in einem Lösungsmittel zur Herstellung einer polymeren Lösung, wobei das Lösungsmittel Ethylazetat enthält;
Zubereiten einer wässrigen Lösung eines bioaktiven Wirkstoffes;
Zusammengeben der polymeren und wässrigen Lösungen unter Bewegen zur Herstellung einer Wasser-in-Öl Emulsion;
Hinzufügen der Wasser-in-Öl Emulsion zu einer weiteren wässrigen Phase unter Bewegen zur Herstellung einer (Wasser-in-Öl)-in-Wasser Emulsion;
Hinzufügen der (Wasser-in-Öl)-in-Wasser Emulsion zum Überschuss einer wässrigen Phase zur Extraktion des Lösungsmittels unter Bildung von Mikropartikeln mit einer Grösse von bis zu 10 Mikrometern im Durchmesser, wobei die genannten Mikropartikel bioaktiven Wirkstoff in wässriger Lösung enthalten;
wobei das Polymer PLG enthält oder aus PLG besteht mit einem Molekulargewicht von 80 kD oder höher.

31. Mikropartikel, erhältlich nach dem Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1 bis 9.

32. Mikropartikel, erhältlich nach dem Verfahren gemäss einem der Ansprüche 10 bis 18.

33. Mikropartikel, erhältlich nach dem Verfahren gemäss einem der Ansprüche 27 bis 28.

34. Mikropartikel, erhältlich nach dem Verfahren gemäss Anspruch 29.

35. Mikropartikel, erhältlich nach dem Verfahren gemäss Anspruch 30.

36. Polymeres Mikropartikel mit einer Grösse von bis zu 10 Mikrometern im Durchmesser und einen Wirkstoff enthaltend, wobei das Polymer PLG enthält mit einer inhärenten Viskosität von weniger als 0.5 dl/g.

37. Mikropartikel nach Anspruch 36, wobei der bioaktive Wirkstoff eine Codierungssequenz enthaltende DNA ist.

38. Mikropartikel nach den Ansprüchen 36 und 37, wobei die inhärente Viskosität des PLG im Bereich von 0.1 bis 0.4 dl/g ist.

39. Mikropartikel nach einem der Ansprüche 36 bis 38, wobei wenigstens 30% des bioaktiven Wirkstoffes während 20 Tagen nach der Verabreichung freigesetzt wird.

40. Mikropartikel nach einem der Ansprüche 36 bis 38, wobei wenigstens 30% des bioaktiven Wirkstoffes während 10 Tagen nach der Verabreichung freigesetzt wird.

41. Verfahren zur Verkapselung eines bioaktiven Wirkstoffes in einem polymeren Mikropartikel nach einem der Ansprüche 1 bis 9, umfassend Zusammengeben in einem Apparat eine wässrige Lösung des genannten Wirkstoffes mit einer Lösung eines Polymers zur Herstellung einer (Wasser-in-Öl)-in-Wasser Emulsion, wobei der genannte Apparat umfasst:

einen Behälter für eine zu mischende Flüssigkeit;

eine Schaufel zum Mischen von Flüssigkeit im Container;

wobei die Schaufel um eine Rotationsachse rotiert und eine Mischaktion ausübt, welche das Antreiben von Flüssigkeit in einer Richtung im wesentlichen entlang der Rotationsachse einschliesst und dadurch die Bildung einer (Wasser-in-Öl)-in-Wasser Emulsion erleichtert.

42. Verfahren nach Anspruch 41, wobei die Schaufel eine Mehrzahl von Schaufelendspitzen aufweist, die sich aufwärts und abwärts von der Schaufel erstrecken.

43. Verfahren nach Anspruch 42, dadurch gekennzeichnet, dass die Schaufelendspitzen zwischen 30° und 60° gegenüber der Schaufeloberfläche geneigt sind.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

FIG. 1

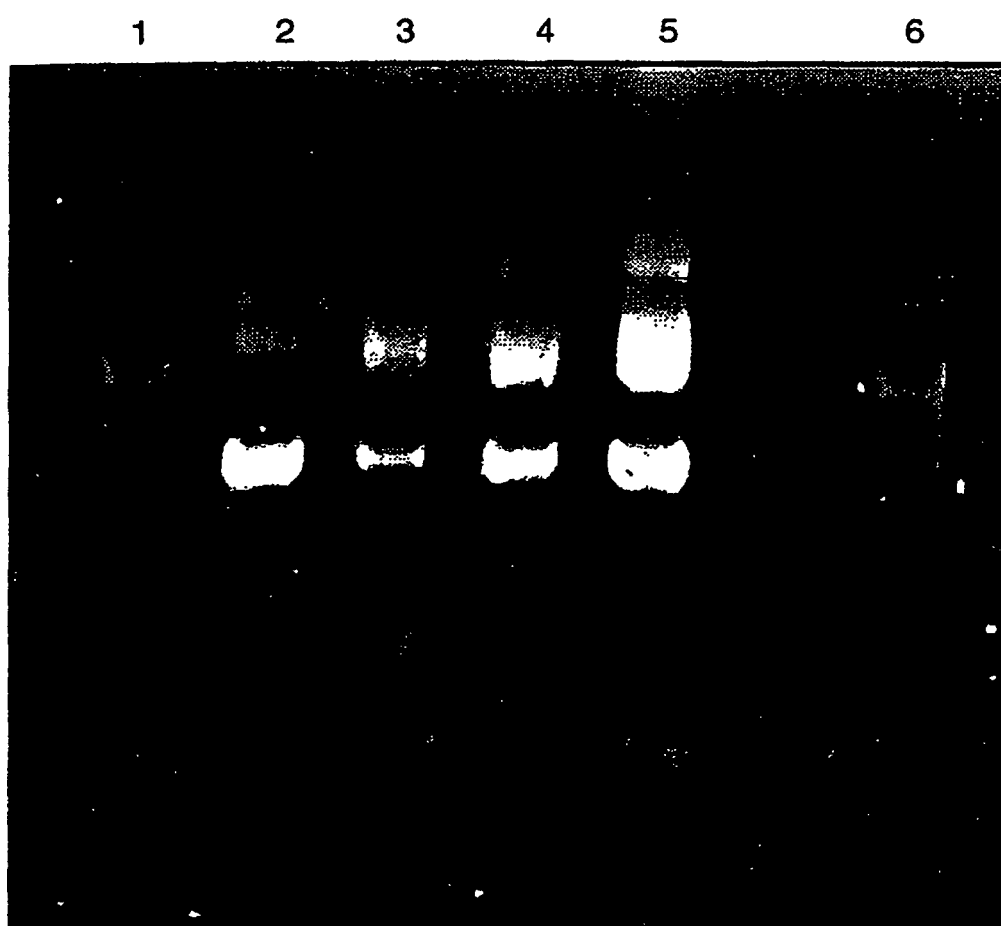


FIG. 2

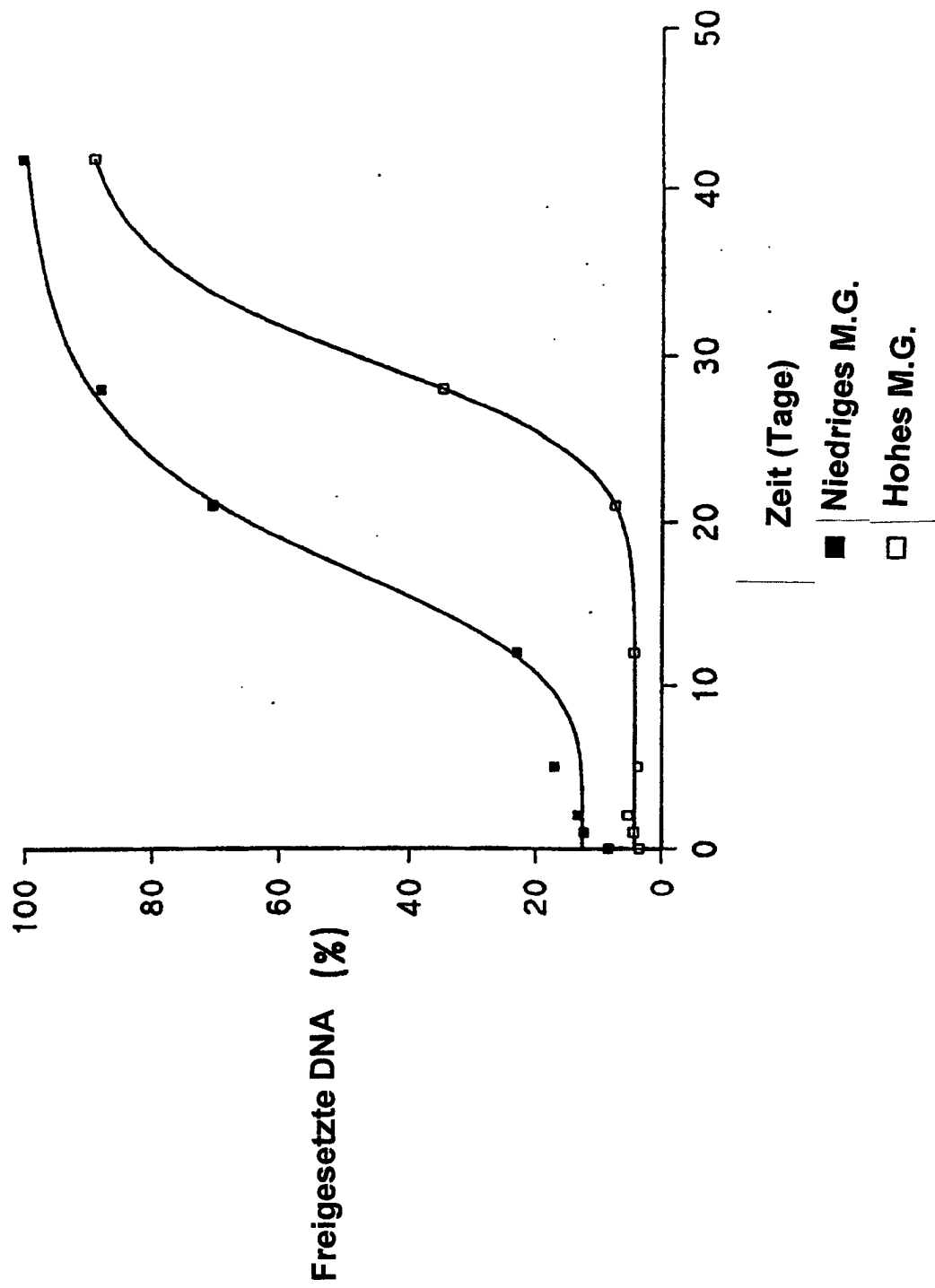


FIG. 3a

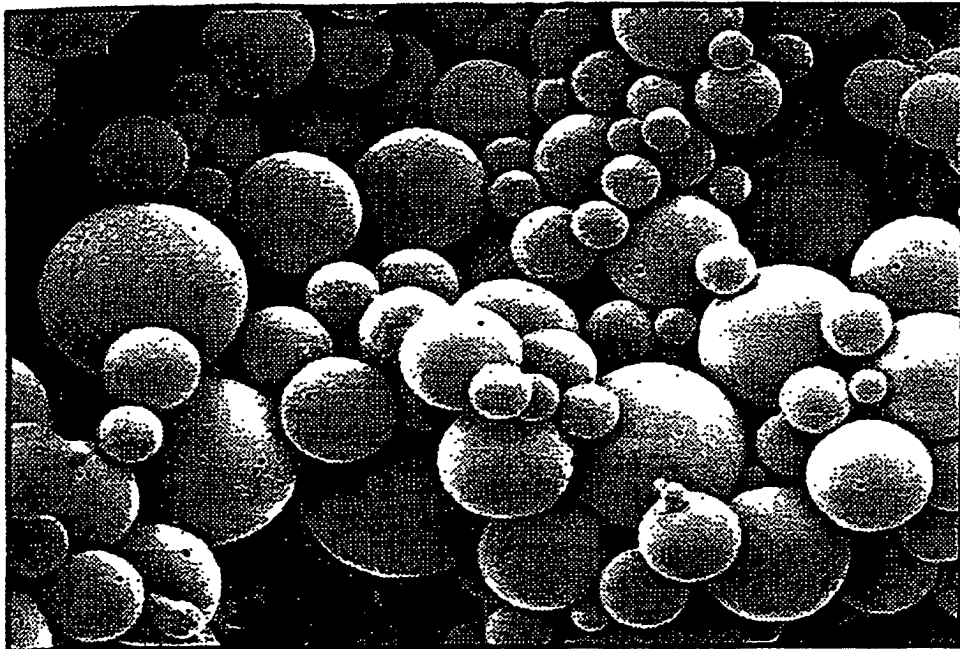


FIG. 3b

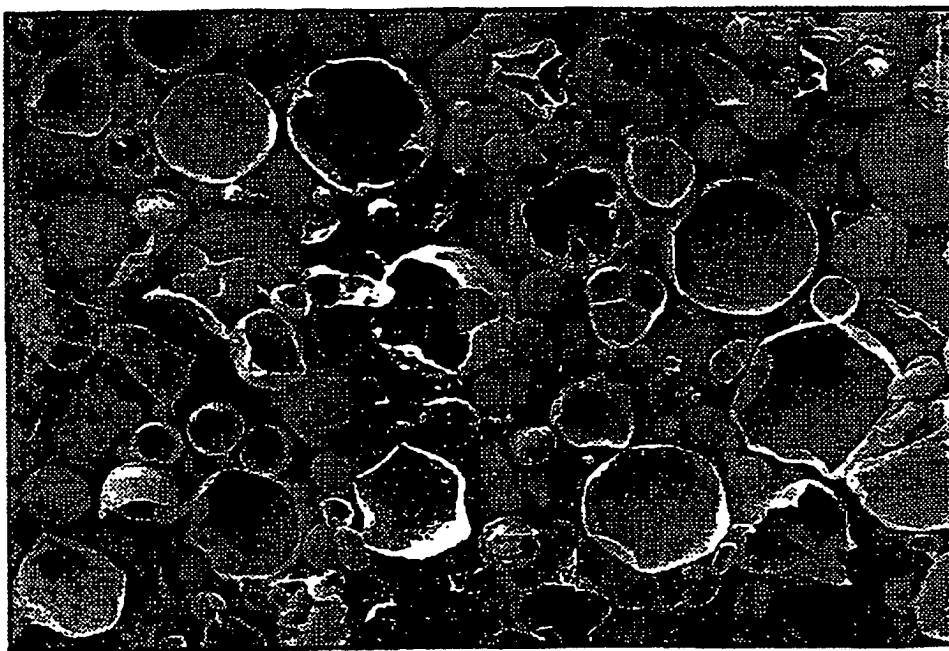


FIG. 4a

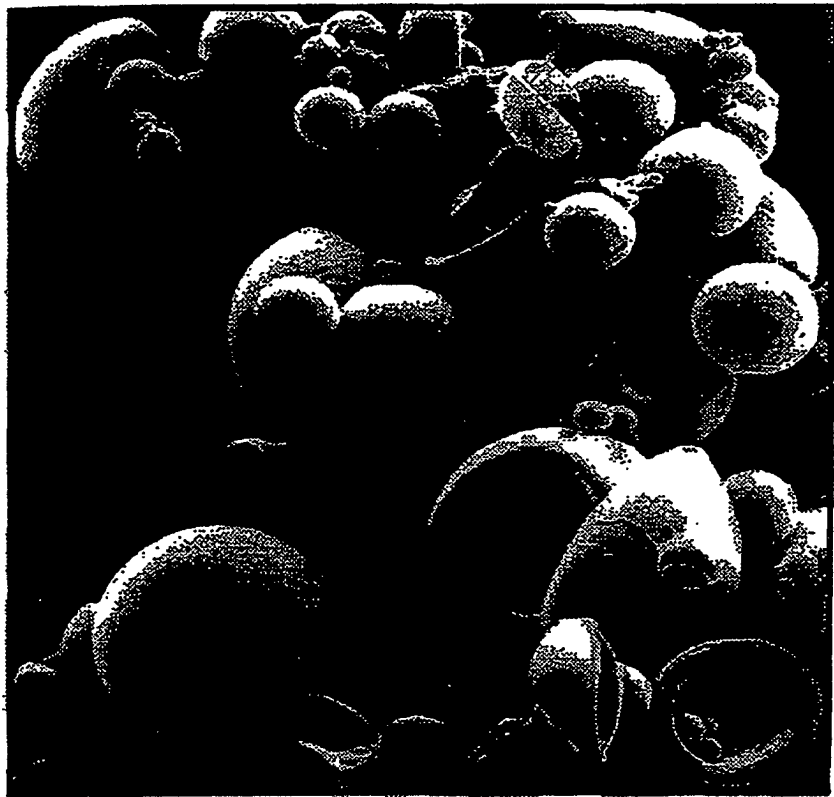


FIG. 4b (Stand der Technik)



FIG. 5

