

Mikrocontainere: fremtidens vacciner kan være på størrelse med sandkorn

Philip Hassing Ronøe Carlsen, Rolf Bech Kjeldsen og Juliane Fjelrad Christfort, IDUN Centre of Excellence, DTU Sundhedsteknologi

De meget tids- og ressourcerkrævende planer om massevaccination af verdens befolkning mod COVID-19 har vist et stort behov for en teknologi designet til at kunne give vacciner oralt. Dette ville principielt set kunne optimere logistiske aspekter samt give en hurtigere massevaccination, og det ville desuden blandt mange anses som værende meget mere bekvemt end vaccinstik. En lovende teknologi til oral levering af vacciner er såkaldte mikrocontainere, se figur 1. Disse kan fyldes med en given vaccine-formulering (eller andre lægemidler), hvorefter de kan levere indholdet intakt til tyndtarmen. Herudover er det i rotter blevet vist, at de kan forøge retentionstiden af hvor længe vaccinen forbliver i tyndtarmen, hvilket er en ret kritisk faktor ved oral levering af vacciner.



Figur 1. Tomme (venstre) og fyldte (højre) mikrocontainere henholdsvis uden for eller inde i gelatinekapsler til oral dosering. Foto: Jesper Scheel, DTU Sundhedsteknologi.

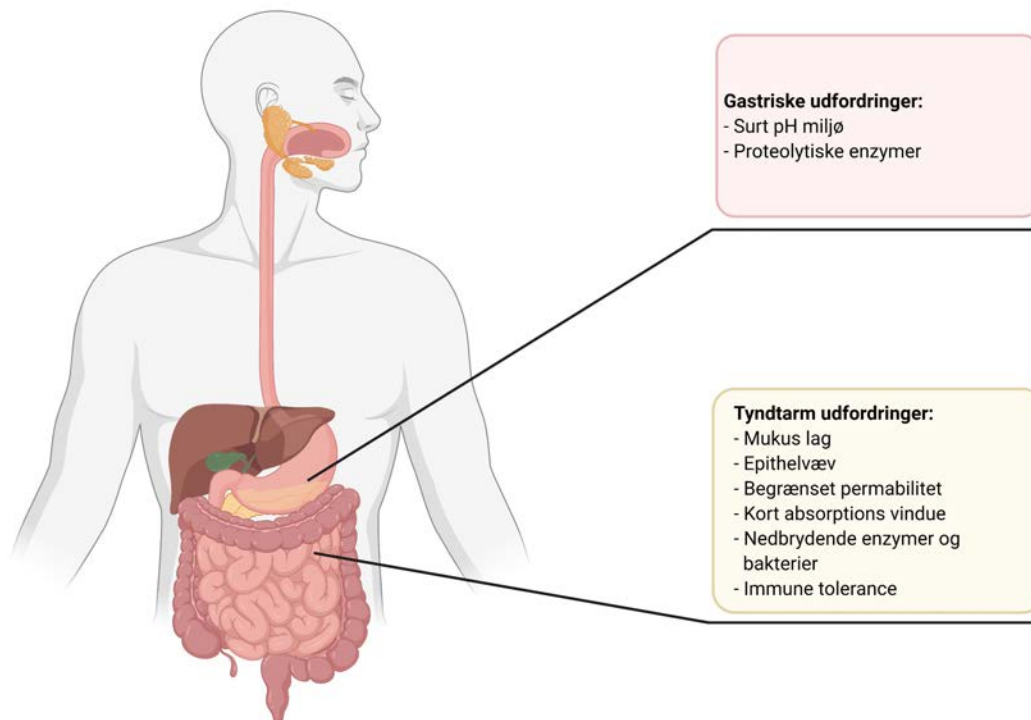
I medicinalindustrien er der meget fokus på begrebet “patient compliance”. Kort sagt betyder dette begreb i hvilken grad patienten overholder den anbefalede behandling. Den doseringsform, som har den højeste “patient compliance”, er orale lægemidler, hvilket vil sige, at mennesker generelt finder det lettest blot at sluge/synke et lægemiddel frem for eksempelvis at inhalere det eller at få en injektion. Udover at det er nemmere for patienten at sluge/synke medicin, så er der også store logistiske fordele ved den orale doseringsform [1].

Coronapandemien viste især, hvor besværligt og tidskrævende det er både at transportere, lagre samt dosere de nyproducerede vacciner til store befolkninger. Alle de producerede vacciner skulle først og fremmest lagres meget koldt, i nogle tilfælde endda helt ned til $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dette er ekstremt energikrævende under selve oplagringen i et varehus, men også under den videre transport til hospitaler og lignende institutioner. Til selve doseringen er der desuden brug for medicinsk personale samt kanyler, sprøjter og andet udstyr til injektion af vaccinerne, hvilket resulterer i en relativ høj udgift. Endvidere skulle folk stå i særdeles lange køer,

som indlysende nok er ret tidskrævende, for at blive stukket i armen, hvilket mange ikke finder særlig behageligt. Disse nævnte problemstillinger kan teoretisk set løses ved at muliggøre oral dosering af vacciner [2].

En sådan proces indebærer dog i sig selv rigtig mange andre problemstillinger. For at kunne gøre en vaccine mere stabil og temperaturbestandig skal den først og fremmest være kompatibel med såkaldte tørringsteknologier. Disse er ikke i fokus for denne artikel, men kort beskrevet er det processer, som fjerner vandet fra vaccine-formuleringerne og erstatter vandmolekylerne med et stabiliserende stof. Alt dette medfører, at formuleringerne bliver til et pulver, der er mindre temperaturløst end den originale opløsning, og desuden har en længere lagringstid. Ulempen med tørringsprocesser er, at ikke alle former for vacciner eller lægemidler er kompatible med dem, hvilket i værste fald kan resultere, i at deres virkning ophører. Derfor er det vigtigt at tjekke og optimere processerne når de tages i brug [3].

Fokus i denne artikel er såkaldte “delivery systems” til oral levering af medicin og vacciner. Når mennesker indtager noget oralt, altså sluger/synker noget, passerer det igennem menneskets fordøjelsessystem. Fordøjelsessystemet er helt specifikt designet til at nedbryde præcis de nøglekomponenter, som en vaccine består af. Det betyder altså, at hvis man doserer en vaccine oralt, som den kommer i en kanyle, så vil den ganske enkelt ikke have nogen gavnlige virkning i sidste ende. Figur 2 opsummerer de processer og barrierer i vores fordøjelsessystem, som i tilfælde af oral vaccine-levering skal overkommes for at opnå et effektivt immunrespons. Hvis det antages at et menneske sluger/synker en vaccine, så vil den først møde mavesækken. Maven indeholder mavesyre, som har en pH-værdi omkring 1–3, samt proteolytiske enzymer, der i synergi kan nedbryde store proteinkomplekser (fx stykker af mad) ned til enkelte proteinstrukturer og molekyler. Herefter vil vaccinen fortsætte ind i tyndtarmen, hvor der i vævet findes en akkumulering af immun-reaktive celler. Ved brug af de rigtige værktøjer og teknologier vil disse celler kunne udnyttes til oral vaccinering.



Figur 2. Afbildning af det menneskelige fordøjelsessystem, med opstilling af udfordringer i henholdsvis maven og tyndtarmen, som findes i relation til oral levering af vacciner.

Tyndtarmen er derfor den placering i fordøjelsessystemet hvor vacciner gerne skal bremses og ultimativt optages over epithelvævet. Derudover ønsker vi at undgå de proteinnedbrydende bakterier og enzymer, som også findes i tyndtarmen [2].

For at opsummere, er der altså brug for et “delivery system”, som effektivt kan beskytte vaccinen gennem det hårde miljø i maven for derefter at levere vaccinen i tyndtarmen over så lang tid som muligt for at øge absorptions-tiden.

Mikrocontainere

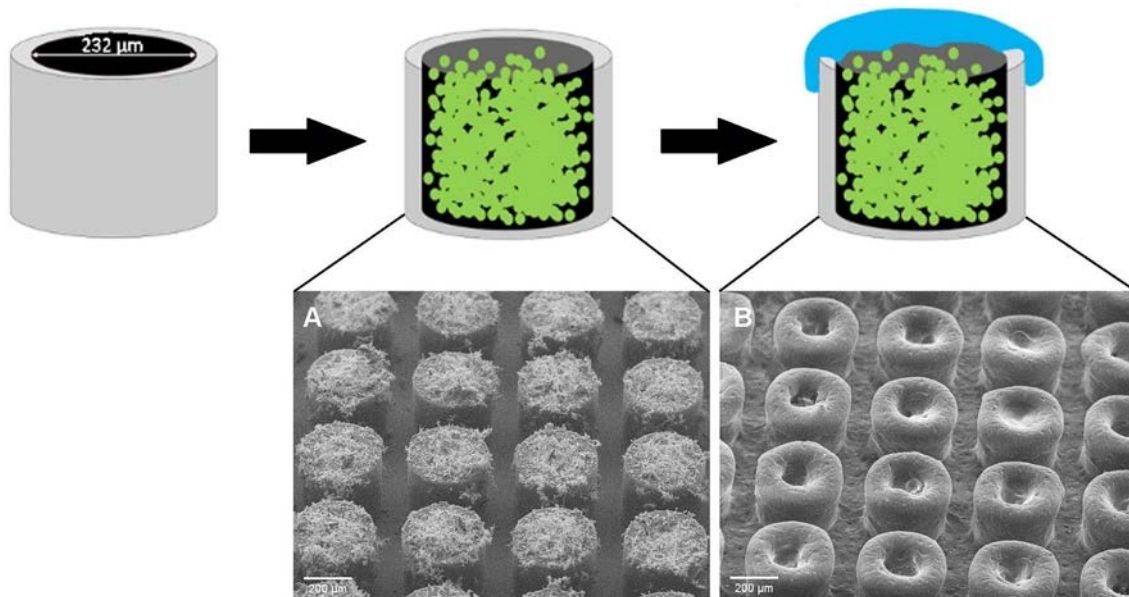
En type “delivery system” til oral levering er mikrocontainere [4]. Mikrocontainere er åbne beholdere i mikrostørrelse, som har et indre hulrum, hvor fx generelle lægemidler og vacciner kan fyldes i. Når mikrocontainerne er blevet fyldt med et givent lægemiddel, kan den åbne overside forsegles med et polymerisk låg. Alt efter typen af lægemiddel, og hvor i kroppen man ønsker at det skal frigives, kan der påføres forskellige typer af polymerer som låg. Polymerens fysisk-kemiske egenskaber vil afgøre, hvornår lægemidlet frigives fra mikrocontainerne. Ofte arbejdes der med låg af pH-følsomme polymerer. Sådanne polymerer vil være intakte ved lave pH-værdier, som det blandt andet er tilfældet i maven, men opløses når den omkringværende pH overstiger en vis værdi. Dette gør det muligt for mikrocontainere at beskytte lægemidlet mod den lave pH-værdi i maven, men derimod frigive det, når mikrocontainerne efterfølgende rammer den højere pH-værdi i tyndtarmen. Efter frigivelse af lægemidlet bliver det optaget gennem tarmvæggen og over i blodbanen. I tilfælde af vacciner, hvor den foretrukne lokation for frigivelsen af formuleringen er i tyndtarmen, vil man da

vælge en polymer som opløses ved $\text{pH} \sim 6$, idet dette omtrent svarer til pH-værdien i tyndtarms-området.

De mikrocontainere, som bruges til at teste nye anvendelser, bliver lavet af den biokompatible fotopolymer SU-8. Mikrocontainerne er cirka $220 \mu\text{m}$ i diameter og $270 \mu\text{m}$ i højden, og de fremstilles ved en to-trins fotolitografi-proces i renrummet på DTU [5]. En af fordelene ved mikrocontainere er, at de kan fremstilles med ensartet størrelse og morfologi. Derved undgår man en meget varierende størrelse, og dermed også en senere varierende lægemiddel-dosis, hvilket er tilfældet ved mikropartikler, som ellers er den mest traditionelle måde at indkapsle lægemidler på [6]. Desuden kan lægemidlet kun frigives i én retning, hvilket er modsat partikler der frigiver til alle sider samtidig. Forskning har vist at netop det, at lægemidlet frigives i én retning tæt på tarmvæggen, kan fremme den efterfølgende absorption. Derudover har studier i vores forskningsgruppe vist, at mikrocontainerne sætter sig fast i mucuslaget i tarmen, hvorfor de kan forventes at have en længere transitid og dermed også en længere samt større absorption af lægemidler. Det har dog indtil nu været svært at undersøge transittider i tarmen nærmere da vi ikke har haft en god procedure til at måle dem præcist.

Fyldning af mikrocontainere og påføring af polymerisk låg

Efter fremstilling af mikrocontainerne skal de fyldes med et lægemiddel. Der er gennem tiden blevet udviklet mange forskellige metoder til at fylde mikrocontainerne [4]. De bedst udviklede metoder til at fylde mikrocontainerne på er ved at fylde dem med lægemidlet i pulverform. Det kan gøres ved at fordele pulveret ud over en chip med 625 mikrocontainere, imens mellem-



Figur 3. Skematisk illustration samt elektron-mikroskopi-billeder af hvordan mikrocontainere først fyldes med paracetamol og derefter overtrækkes med en pH-sensitiv polymer kaldet Eudragit® S100. Genoptrykt fra [6] med tilladelse.

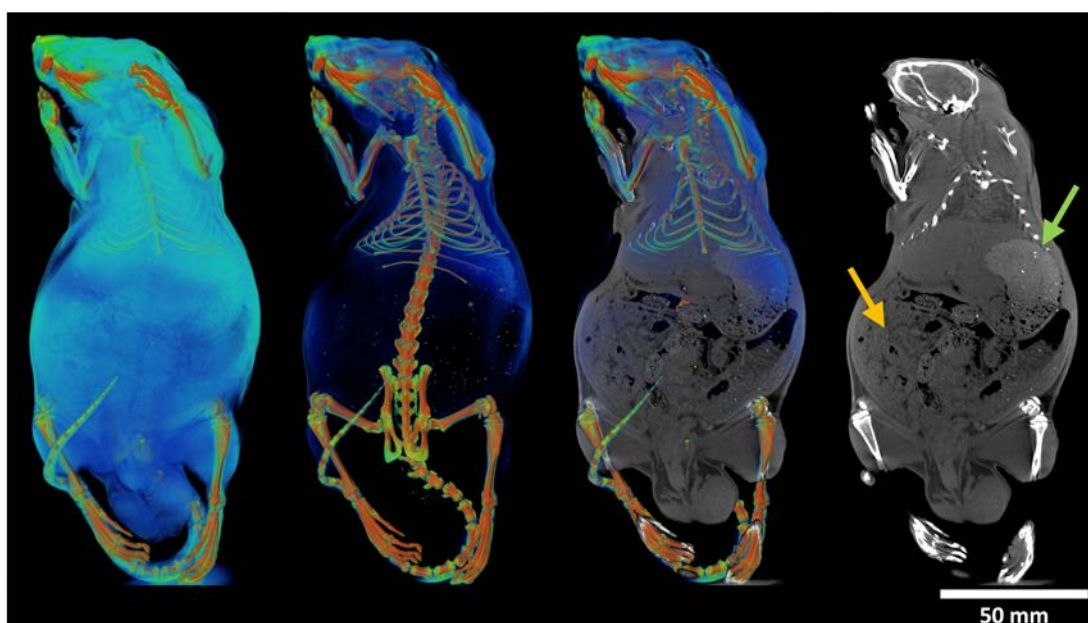
rummet mellem mikrocontainerne dækkes af med en skyggemaske. Derved kan pulveret efterfølgende nemt fyldes ned i mikrocontainerne ved hjælp af en børste. Alternativt kan mikrocontainerne fyldes med en polymer, hvorefter der kan anvendes andre metoder til at fylde mikrocontainerne med lægemiddel. Én af disse metoder er CO₂-imprægnering, hvor lægemidlet først opløses i CO₂ og derefter trænger ind i en given polymer, som på forhånd var fyldt ind i mikrocontainerne. Når mikrocontainerne er blevet fyldt med lægemiddel, påføres deres åbne overside med et polymerisk låg, som på simpel vis sprayes på ved hjælp af en spray-coater. Figur 3 viser et eksempel på hvordan mikrocontainerne først fyldes med paracetamol, for derefter at blive påført med en pH-sensitiv polymer kaldet Eudragit® S100.

Effekten af de pH-følsomme låg undersøges i la-

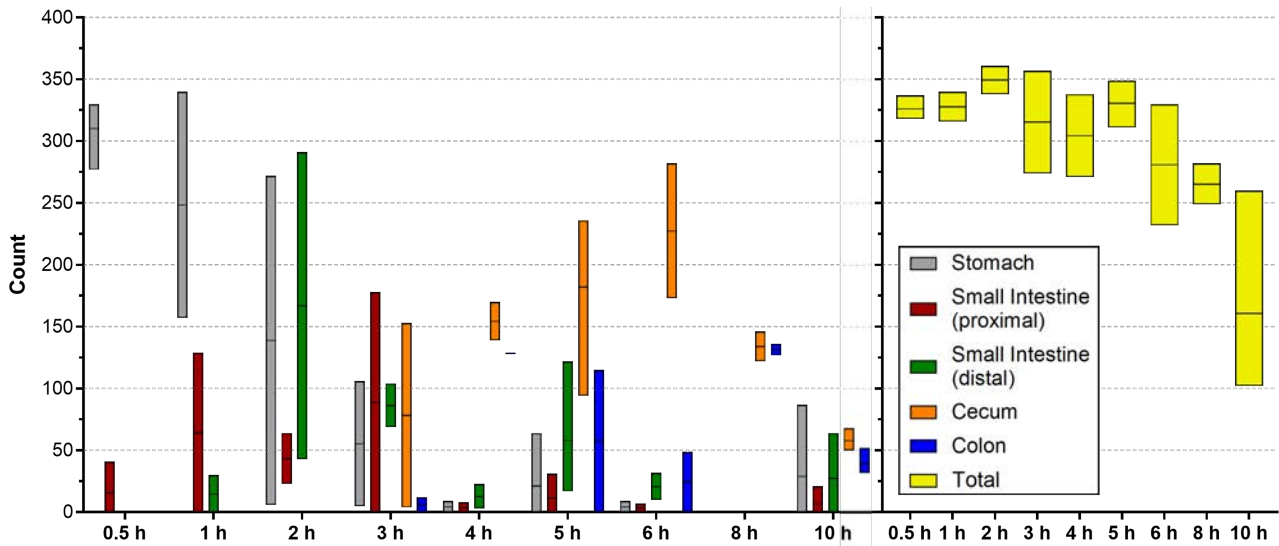
boratoriet ved brug af simulerede mave- og tarmopløsninger. Ved hjælp af sådanne undersøgelser har vi bekræftet, at lægemidlet ikke frigives ved en pH-værdi der svarer til den vi har i maven, men at det i stedet først frigives, når pH-værdien øges til en neutral værdi svarende til den i tarmen. Baseret på disse forsøg kunne det altså konkluderes, at det pH-følsomme låg virker, og at frigivelsen af lægemidlet kun sker i tarmen som ønsket.

Tracking af mikrocontainere til måling af retentions- og transittid

For bedre at kunne undersøge retentions- og transittid af mikrocontainere i tarmene er vi nu begyndt at teste brugen af forskellige typer røntgenbillede-dannelse (både 2D og 3D) til at tracke dem [7]. Mikrocontainere giver



Figur 4. CT-skanningsbillede af en rotte aflivet 5 timer efter oral dosering af mikrocontainere fyldt med bariumsulfat og med synliggørelse af den gastrointestinale tragt ved hjælp af et orthoslice. Pilene indikerer lokationen af henholdsvis maven (grøn) og tyndtarmen (gul). Genoptrykt fra [7] med tilladelse.



Figur 5. Flydende bar plot af mikrocontainerernes placering i mave- og tarmsystemet over tid fra dosering. Grå: mavesækken. Rød og grøn: henholdsvis første og anden halvdel af tyndtarmen. Orange og blå: tyktarmen opdelt. Gul: samlet antal for alle de tidligere lokationer. Genoptrykt fra [7] med tilladelse.

dog i sig selv ikke ret meget kontrast, og den lave kontrast de trods alt giver er nogenlunde på samme niveau som den fra biologisk væv (hud, organer, tarme og lignende). Derfor er mikrocontainerne enten blevet fyldt med bariumsulfat, der er et allerede alment kendt og anvendt røntgenkontraststof, eller det er blevet inkorporeret ind i selve mikrocontainerne. Indtil videre er røntgenbillede-dannelse af doserede mikrocontainer kun foretaget i rotter og mus, men på sigt kan et lignende setup anvendes på større dyr (kaniner og grise) i prækliniske forsøg, og i sidste ende på mennesker i kliniske studier.

Figur 4 viser et CT-skanningsbillede fra en rotte aflivet 5 timer efter oral dosering af mikrocontainer, der på forhånd var blevet fyldt med bariumsulfat. For at lokalisere mikrocontainerernes placering i tarmene er kontrasten i CT-skanningsbilledet først og fremmest justeret således at huden forsvinder, hvorved man kan se "ind" i selve rotten og se mikrocontainerne (de mange små røde pletter). Dernæst kan et såkaldt orthoslice tilføjes og flyttes rundt i forskellige højder samt retninger, hvilket giver en ret tydelig indikation af rottens mavesæk (grøn pil), tarmene (gul pil) og andre organer. I det her tilfælde ses det at mikrocontainerne mere eller mindre har forladt mavesækken, og at de i stedet er helt eller delvist spredt ud i tarmene. Et lignende billede taget 10 timer efter oral dosering viste at mikrocontainerne primært var i den sidste del af tarmene, og at flere af dem faktisk allerede havde forladt tarmene helt.

En endnu mere præcis retentions- og transittid kan efterfølgende bestemmes ved at tage hele tarmen ud af rotten, hvorefter simplere plan-røntgenskanning af tarmstykket foretages. På den måde kan hver enkelt mikrocontainer efterfølgende nemt identificeres, og deres eksakte placering i tarmstykket kan noteres og plottes som funktion af tid fra oral dosering. Figur 5 viser et sådan plot for mikrocontainerne fyldt med bariumsulfat, hvor det ses at de bliver i mavesækken 0,5–2 timer, kommer ned til tyktarmen efter 3–4 timer og mere eller mindre forlader tarmene helt 8–10 timer efter dosering.

Fremtidig levering af vacciner ved brug af mikrocontainer

De beskrevne funktioner af mikrocontainerne gør dem til en stærk kandidat til oral levering af vacciner. Først og fremmest kan de beskytte deres indhold igennem maven, for derefter at øge retentionstiden i tarmen. For en rotte er den normale transit af mad fra maven til cecum (starten af tyktarmen) omkring 1–2 timer, og i tilfældet for mikrocontainer er denne forøget til 3–5 timer [8]. I forhold til vacciner er det ret essentielt at kunne øge retentionstiden så meget som muligt, så kroppens immunsystem får længere tid til at reagere. I tarmen er der en meget høj immuntolerance, hvilket vil sige at kroppen ikke reagerer på alle de fremmede bakterier og molekyler som passerer igennem fordøjelsessystemet. Dette er nødvendigt da det ellers ville overbelaste vores krop ekstremt. For vacciner skal den tolerance overkommes da det er et sammenspil mellem mikrocontainer-teknologien og vaccine-formuleringen der så at sige skal provokere immunsystemet tilstrækkeligt til at lave et immunrespons. To kritiske faktorer i denne process er at vaccine-formuleringen er aktiv ved ankomst til tyndtarmen, og at den har længst muligt tid til at opnå en gavnlige virkning. De næste skridt herfra er at teste mikrocontainerne sammen med en vaccine-formulering i eksempelvis rotter. Valget af vaccine-formulering bør tages på baggrund af data fra andre studier som viser respons fra enten orale studier eller sågar respiratoriske studier, da vævet i lungerne er stort set identisk med det som findes i tarmen [9]. Dette er for at sikre at det er mikrocontainerne evne til at levere vacciner oralt som evalueres. Det er også en mulighed at den øgede retentionstid der opnås i rotter ikke er tilstrækkelig, da de indre organer hos en rotte proportionelt er meget små. Fremadrettet kan det derfor også være nødvendigt at anvende større dyremodeller såsom kaniner eller grise til lignende prækliniske studier.

Litteratur

- [1] M. Shepherd og E. Shepherd (2020) Medicines administration 2: procedure for administration of oral medicines, *Nursing Times*, bind **116**, nr. 7, side 42–44.
- [2] Y. Zhang m.fl. (2021) Advanced oral vaccine delivery strategies for improving the immunity, *Advanced drug delivery review*, bind **177**, side 113928.
- [3] M.Y. Chan m.fl. (2017) Lyophilization of Adjuvanted Vaccines: Methods for Formulation of a Thermostable Freeze-Dried Product, *Methods.Mol.Biol*, bind **1494**, side 215–226.
- [4] L.H. Nielsen m.fl.(2018) Microfabricated devices for oral drug delivery, *Lab on a Chip*, bind **18**, side 2348–2358.
- [5] L.H. Nielsen m.fl. (2012) Spatial confinement can lead to increased stability of amorphous indomethacin, *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, bind **81**, side 418–425.
- [6] J.F. Christfort m.fl. (2021) In vitro and in vivo comparison of microcontainers and microspheres for oral drug delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, bind **600**, side 120516.
- [7] R.B. Kjeldsen m.fl. (2021) X-ray Imaging for Gastrointestinal Tracking of Microscale Oral Drug Delivery Devices, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, bind **7**, side 2538–2547.
- [8] A. Munakata m.fl. (1995) Effects of Dietary Fiber on Gastrointestinal Transit Time, Fecal Properties and Fat Absorption in Rats, *Exp.Med.*, bind **176**, side 227–238.
- [9] E.C. Lavelle m.fl. (2021) Mucosal vaccines – fortifying the frontiers, *Nat.Rev.Immunol.*, side 1–15.



Philip H. R. Carlsen er ph.d.-studerende på DTU. Han er cand.scient. i bioteknologi fra Københavns Universitet med speciale i immunologi og arbejder med vacciner mod infektionssygdomme. I sit ph.d.-projekt arbejder han primært med oral levering af vacciner. Dette sker i tæt samarbejde med adjuvansafdelingen på Statens Serum Institut.



Rolf Bech Kjeldsen er ph.d.-studerende på DTU. Han er cand.scient. i nanoscience fra Aarhus Universitet og arbejder med interdisciplinær forskning inden for områderne “natural science” og “applied science”. I sit PhD-projekt arbejder han primært med røntgenbilleddannelse til gastrointestinal sporing af mikroskala-devices anvendt til oral levering af lægemidler.



Juliane Fjelrad Christfort er cand.pharm. i farmaci fra Københavns Universitet og ph.d fra DTU. I sit ph.d.-projekt arbejdede hun primært med oral levering af probiotika ved hjælp af mikrocontainere og udvikling af *in vitro*- og *in vivo*-modeller til at undersøge brugen af mikrocontainere til oral levering.

Nyt fra Astronomisk Selskab

Foredragsrækken forår 2022

Teamet for Astronomisk Selskabs foredragsrække bliver “Hvad er der ude i rummet?” Mange har hørt om stjerner, men faktisk er det kun en mindre del af det vi kan kalde det “normale stof” som man idag finder i stjerner. Denne foredragsrække handler om stoffet mellem stjernerne og galakserne – om det interstellare, det cirkumgalaktiske og det intergalaktiske stof.

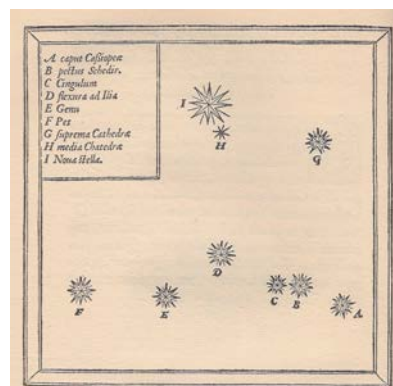
Se mere i foredragskalenderen side 33.

Generalforsamling

Generalforsamlingen er planlagt til at finde sted den 2. april 2022. Nærmere information om tid og sted følger.

Medlemsundersøgelse

Astronomisk Selskab har gennemført en medlemsundersøgelse, som viste, at rigtig mange af medlemmerne sætter stor pris på *Kvant*. Undersøgelsen viste også, at medlemmerne interesserer sig bredt for astronomiske emner, men især for Big Bang og universets udvikling, observationel astronomi, stjerner og supernovaer samt galakser.



Figur 1. Tycho Brahes nye stjerne (I på figuren).

Blandt forslagene til forbedring blev der efterspurgt lidt flere populærfaglige artikler i *Kvant* samt en mulighed for at stille spørgsmål i bladet. *Kvant* redaktion vil arbejde videre med forslagene og planlægger også et temanummer næste år om supernovaer i anledning af, at det er 450 år siden, at Tycho Brahe opdagede sin nye stjerne i 1572.