



Københavns Universitet



Nedfrysning af immunceller kan overflødiggøre forsøgskaniner i lægemiddelkontrol

Timm, Michael; Moesby, Lise; Hansen, Erik Wind

Published in:
Lægemiddelforskning

Publication date:
2008

Document version
Også kaldet Forlagets PDF

Citation for published version (APA):
Timm, M., Moesby, L., & Hansen, E. W. (2008). Nedfrysning af immunceller kan overflødiggøre forsøgskaniner i lægemiddelkontrol. *Lægemiddelforskning*, 43-45.

Nedfrysning af immunceller kan overflødiggøre forsøgskaniner i lægemiddelkontrol

200.000 kaniner anvendes hvert år i EU til rutinemæssig kontrol af injektionslægemidler for at sikre, at medicinen ikke indeholder feberfremkaldende bakterier eller bakterierester. En ny celledest kan erstatte brugen af forsøgskaniner. Cellerne kan nedfryses, og det gør testen let anvendelig overalt i medicinalindustrien.

Af Michael Timm, Lise Moesby og Erik Wind Hansen

Alle lægemidler til indsprøjtning skal rutinemæssigt kontrolleres for deres mikrobielle renhed, fordi det er vigtigt, at medicinen er fri for forurening med fx bakterier og vira. Nogle bakteriers cellevægge indeholder giftstoffet endotoksin, som er farligt for mennesker, og hvis stoffet injiceres direkte i blodbanen, kan det forårsage kraftig feber, organsvigt og i værste tilfælde døden.

For at sikre renheden af injektionslægemidler, har myndighederne stillet krav om, at lægemiddelindustrien skal gennem-

føre en grundig produktkontrol for forurening med bakterier og bakterierester, som med et fælles navn kaldes pyrogener. Kontrollen udføres ved hjælp af en af to godkendte metoder, som begge er baseret på brug af dyr.

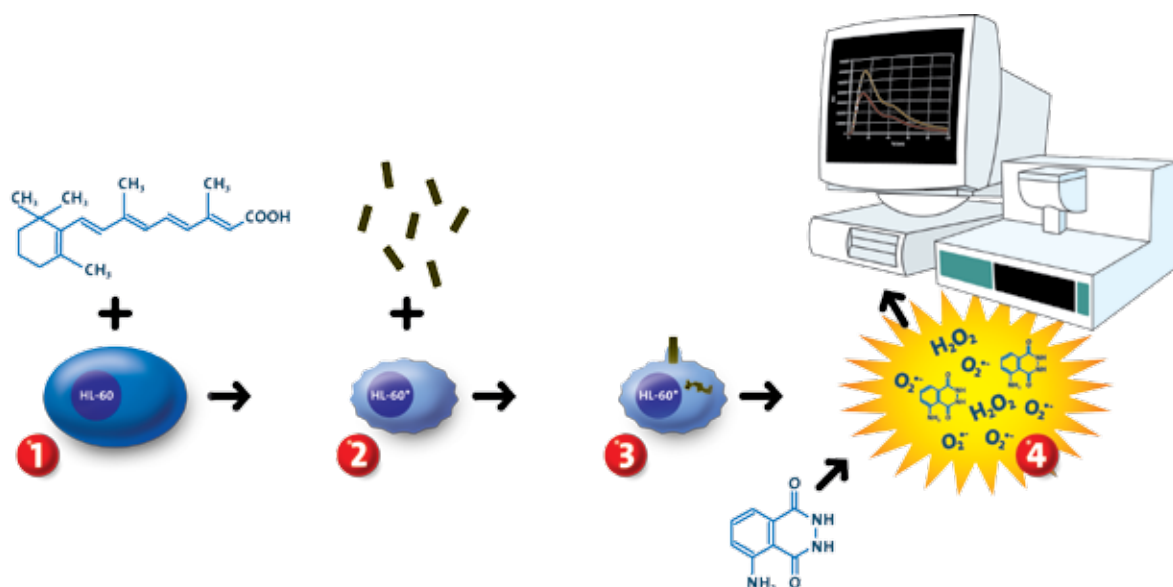
Den mest omdiskuterede af metoderne er kanin-pyrogentesten. Under testen sidder kaninerne fastspændt i over fem timer og får indsprøjet lægemidlet i en ørevene. Derefter registreres kaninens kropstemperatur, og hvis tre kaniners samlede temperaturstigning er over 2,65°C, anses lægemidlet for at være forurenet og bliver dermed ikke frigivet til brug for mennesker. Industrien i EU anvender hvert år over 200.000 kaniner til kontrol af lægemidler.

Alternativ til kanin-pyrogentesten

På Institut for Farmakologi og Farmakoterapi har vi udviklet en ny pyrogentest, som er baseret på en human cellelinie, hvor cellerne er optimeret til at minde om kroppens egne immunceller. Fordelen ved at anvende cellelinien er, at cellerne



Kanin-pyrogentesten udført som beskrevet i den europæiske farmakopé: Kaninen sidder fastspændt i over fem timer og får lægemidlet indsprøjet i en ørevene. Hvis medicinen er forurenet med pyrogener, får kaninen feber.



Celler fra den humane cellelinie, HL-60, kan udvikles til aktive immunceller i laboratoriet. Når en opløsning med cellerne udsættes for et lægemiddel, som indeholder pyrogener, frigiver cellerne reaktive iltforbindelser, der reagerer med stoffet luminol, som så udsender lys. Hvis prøven ikke lyser, er lægemidlet rent.

stammer fra et menneske, hvorfor deres reaktionsmønster i meget høj grad afspejler menneskers reaktion på pyrogener. Testen er hurtigere og mere præcis end den eksisterende kanin-pyrogentest.

Inden testen udføres, behandles den humane cellelinie HL-60 med A-vitaminsyre, hvorved cellerne kan udvikle sig – differentiere – til aktive immunceller. Hvis man derpå tilsætter et forurenede lægemiddel, vil de reagere på samme måde som immunforsvarets celler og forsøge at ødelægge og nedbryde bakterier og bakterielle bestanddele. I denne proces anvender cellerne et arsenal af aktive og toksiske stoffer, herunder reaktive iltforbindelser.

Frigivelsen af reaktive iltforbindelser fra en celleduspension kan nemt måles, fordi de reagerer med stoffet luminol, som udsender lys. Prøven vil derfor lyse, hvis der er pyrogener i den, og lyset registreres af et måleinstrument, der kaldes et luminometer. Hvis lægemidlet er fri for pyrogener, udsender prøven intet lys.

Krævende celledyrkning

HL-60-pyrogentesten, som er opfundet på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi, er mere følsom end kanin-pyrogentesten og er samtidig mere præcis. Derfor virker den som et oplagt alternativ. Desværre er dyrkning af celler kompliceret, og derfor har testen indtil videre kun været anvendelig for medicinalvirksomheder, som har passende faciliteter til celledyrkning og særligt uddannet personale. Det har begrænset anvendeligheden betragteligt, hvilket er uheldigt, ikke mindst fordi det ydermere er ønskeligt at kunne anvende pyrogentests i forbindelse med råvarekontrol, proceskontrol og færdigvarekontrol.

Der er med andre ord brug for, at man også kan benytte pyrogentesten på steder, hvor der ikke er celledyrkningsfaciliteter til rådighed. Hvis den cellebaserede test skal anvendes bredt, er det derfor nødvendigt at kunne transportere cel-

lerne hen til det sted, hvor de skal bruges.

Nedfrysning muliggør transport og lagring

Nedfrysning er en meget anvendt metode, når man skal lagre eller transportere celler. I lighed med sædceller og ægceller er det også muligt at nedfryse cellelinier, uden at cellerne tager nævneværdigt skade. Men nogle celler er meget svære at nedfryse. Dette gælder for immunceller, der indeholder og producerer toksiske stoffer såsom reaktive iltforbindelser. Disse stoffer opbevares inde i cellen i små hulrum kaldet granula. Det er inde i disse granula, at immuncellerne dræber og nedbryder bakterier, og på den måde sørger immuncellerne for, at de toksiske stoffer kun i meget ringe grad kommer udenfor cellen. Imidlertid kan nedfrysning være så hård for immuncellerne, at deres granula går i stykker, hvorved cellerne ødelægges sig selv.

Let at anvende nedfrosne celler

Selvom det er svært at nedfryse immunceller, så de overlever frysning og optøning, er det lykkedes at nedfryse differentierede HL-60-celler. Cellerne er testet over for flere pyrogener, og de er stadig i stand til at detektere disse forureninger i koncentrationer, der er lavere end de koncentrationer, som kanin-pyrogentesten er i stand til at påvise. Vore undersøgelser viser, at cellerne kan nedfryses og lagres i flydende nitrogen i over to måneder uden tab af følsomhed.

Det er derfor muligt at udføre en pyrogentest baseret på nedfrosne celler. Med denne nye test er det ikke længere nødvendigt at have celledyrkningsfaciliteter til rådighed. Ved test af lægemidler for pyrogener kan man optø en ampul med celler og tilsætte sit lægemiddel, hvorefter man blot skal måle udsendelsen af lys. Det er med andre ord blevet så simpelt at anvende den nye test, at den bør have potentiale til at erstatte den omstridte brug af forsøgskaniner i den rutinemæssige kontrol af lægemidler til injektion.

STYR PÅ NEDFRYSNINGSHASTIGHEDEN

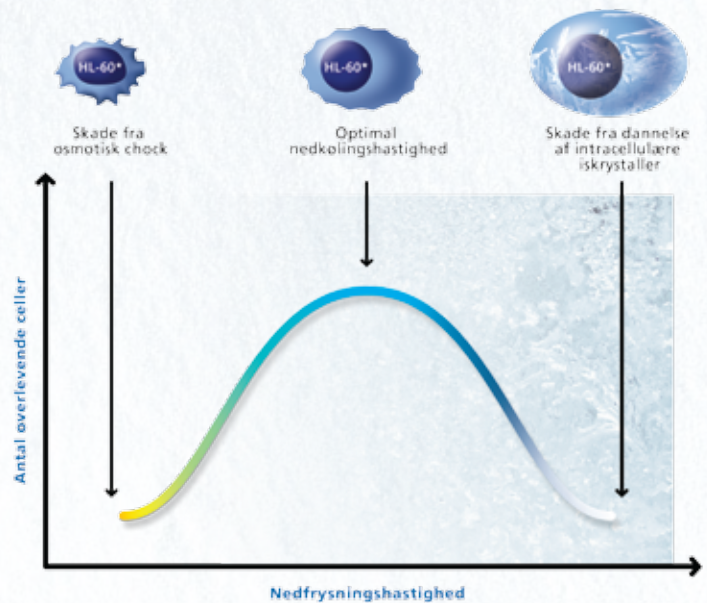
Når immunceller nedfryses, er nedfrysningshastigheden meget vigtig for cellernes overlevelse. Hvis cellerne fryses for langsomt, vil der opstå en ubalance i saltkoncentrationen inde i cellen, og det kan ødelægge cellernes funktionalitet. Desuden medfører langsom nedfrysning dannelse af meget store iskrystaller i den omgivende væske, som fysisk kan skade cellerne. Omvendt – hvis der fryses for hurtigt, dannes der iskrystaller inde i cellen, som vil få cellen til at svulme op, hvorved den ødelægges. Nedfrysningshastigheden må derfor hverken være for hurtig eller langsom.

For at kunne styre nedfrysningproceduren i mindste detalje benytter vi en fryser, som anvender flydende nitrogen til en temperaturkontrolleret nedfrysning. Fryseren kan meget præcist programmeres til at nedfryse cellerne med en optimal hastighed.

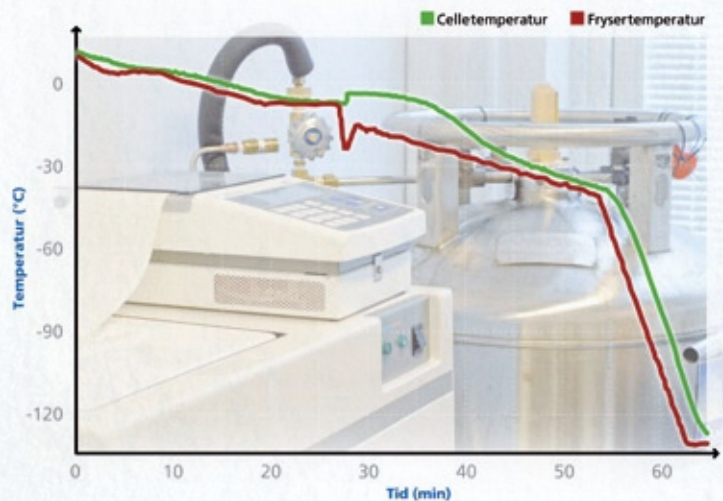
Inden frysningen underafkøles væsken, der omgiver cellerne, hvilket medfører, at faseovergangen mellem vand og is sker meget hurtigt. På denne måde dannes der meget små iskrystaller både udenfor cellen og inde i cellen samtidig. Dette giver de bedste forudsætninger for, at cellerne overlever nedfrysningen.

Før den egentlige start på nedfrysningen underafkøles opløsningen med celler derfor til -7°C . Når væsken er underafkølet, vil de fryse øjeblikkeligt, hvis de påvirkes – enten mekanisk ved omrøring eller berøring eller ved et brat temperaturfald. Vi initierer faseovergangen mellem en vandig fase og is ved at sænke temperaturen fra -7°C til -25°C på under et minut. Resultatet er paradoksalt nok, at temperaturen i prøven stiger! Denne temperaturstigning skyldes, at faseovergangen mellem vand og is frigiver energi, som medfører dannelse af varme. Det indikerer, at faseovergangen er sket, og at prøven er frosset.

Herefter udføres resten af nedfrysningen efter et nøje planlagt skema til -130°C med ca. 1 grad pr. minut, hvorefter prøverne anbringes direkte i flydende nitrogen med en temperatur på ca. -190°C .



For at sikre cellernes overlevelse, skal nedfrysningshastigheden kontrolleres nøje – den må hverken være for hurtig eller for langsom.



Grafen viser forløbet af nedfrysningen. Cellerne suspenderes i en frysevæske, der fordeles i små ampuller og anbringes i nitrogenfryseren. Herefter startes den kontrollerede nedfrysning af cellerne. Den røde kurve viser temperaturen inde i fryseren, mens den grønne viser temperaturen inde i celled suspensionen.

Cand.pharm. Michael Timm er ph.d.-studerende på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.
Ph.d. (pharm) Lise Moesby er lektor på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.
Ph.d. (pharm) Erik Wind Hansen er lektor på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.