

Fraunhofer Institut Hannover
Klinische Pharmakologie und Inhalation
Nicolai-Fuchs-Str. 1

D-30625 Hannover

Bestimmung der Aktivität von Interferon- alpha nach nadelloser Applikation mit dem Injex™ –System in vitro und in vivo

Zusammenfassung der Studie

Bestimmung der Aktivität von Interferon-alpha nach nadelloser Applikation mit dem Injex™ –System in vitro und in vivo

1.1. Einführung und Ziel der Studie

Bis vor ca. 10 Jahren standen dem Kliniker zur Behandlung von Neoplasien nur die Chirurgie, Bestrahlung und Chemotherapie zur Verfügung. Als vierte Option etabliert sich mehr und mehr die Immuntherapie, die gegenwärtig zum großen Teil auf der Anwendung von Zytokinen und humanisierten monoklonalen Antikörpern beruht. Die Zytokine, und hier insbesondere die Interferone, stellen die ersten "Biological Response Modifiers" dar, die klinisch ihre Anwendung fanden. Für einige Tumorindikationen und Infektionserkrankungen wie zum Beispiel der chronischen Hepatitis C ist der Stellenwert einer Interferon-Therapie bereits erarbeitet und gilt als Therapie der Wahl.

Interferone werden zur Zeit in den meisten Fällen subkutan im ambulanten Bereich verabreicht. Da die selbst vorzunehmende Injektion nicht selten Anlaß zu psychischen Widerständen und Ängsten gibt, ist eine regelmäßige Applikation und damit ein entsprechender Therapieerfolg in Frage gestellt. Daher wird nach neuen, einfacheren und sicheren Darreichungsformen gesucht.

Mit dem Injex steht ein von der FDA-zugelassenes CE-zertifiziertes System zur Verfügung, um nadelfrei Pharmaka subkutan applizieren zu können. Ziel dieser Studie ist es, die molekulare Identität von Interferon-alpha nach Verwendung des Injex-System zu überprüfen.

1.2. Studiendurchführung

Die Untersuchungen wurden vom Fraunhofer Institut Hannover, Nicolai-Fuchs-Str. 1, D-30625 Hannover in den Laboratorien der Abt. Immunbiologie unter der kommissarischen Leitung von PD Dr. med. A. Emmendorffer und seinem Mitarbeiter Herrn Dr. M. Hecht ausgeführt.

1.3. Zeitplan

Die Untersuchungen zur Bestimmung der Aktivität von Interferon-alpha wurden zwischen dem 20. Februar und 30. September 2000 durchgeführt.

2.2 Material und Methoden

2.1. Testobjekte

Im Rahmen der vom Fraunhofer Institut durchgeführten Studie wurde ein Injex-System mit entsprechenden kommerziell erhältlichen Ampullen untersucht:

Injex™-Standardsystem Serien-Nr. 3 10980 A

Injex™ Ampullen Lot-No. 334

2.2. FPLC-Analyse

Die Analyse erfolgte an einer BioCAD workstation (PerSeptive Biosystems, Heidelberg). Ein Probenvolumen von 200 µl wurde mittels einer Spritze (Hamilton, Reno, NE/USA) auf eine äquilibrierte Trennsäule (Bio-Sil SEC 125 HPLC-Säulen, Bio-Rad, München) aufgetragen. Die Chromatographie wurde durch Detektion der E_{205} , des pH-Wertes, des Druckes und der Leitfähigkeit verfolgt. Vor dem eigentlichen Probenlauf wurde ein Lauf mit einem definierten Größenstandard durchgeführt (Abb. 1 Standard und Größenmarker)

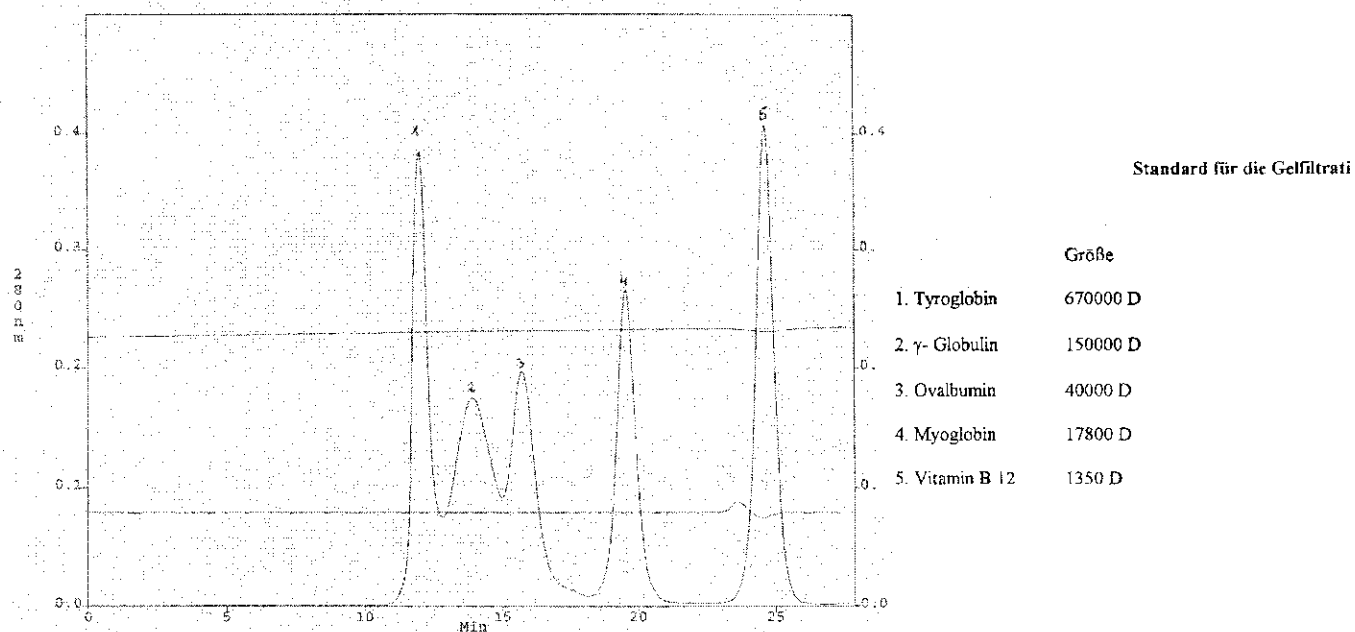


Abb 1.: FPLC-Lauf eines Protein Standard-Gemisches
(rechts sind die Molekulargrößen der Standards aufgetragen)

2.3. Bioassay

Bestimmung von IFN- α mittels des Cytopathischen Inhibitionsassays (Bioassay)

Der biologische Nachweis von IFN erfolgte durch Modifizierung der bereits 1959 beschriebenen Methode von Ho und Enders. Der Cytopathische - Effekt - Inhibitionsassay (CPE) nutzt den Schutzeffekt der Interferone gegenüber humanen Zellen vor einer Viruslyse aus. Als Detektionssystem wird eine humane Lungenkarzinomzelllinie (A549) eingesetzt. Die Zellen werden mit Interferon-haltigen (IFN) Proben in einer Mikrotiterplatte inkubiert und anschließend mit dem Encephalomyocarditis-Virus (EMC) infiziert. Die Quantifizierung des Interferones erfolgt durch Ausverdünnen von unbekanntem Proben, die man mit der gleichen Verdünnungsreihe bekannter Standardkonzentrationen vergleicht.

Die durch Trypsinierung gewonnene Zellsuspension wurde mit RPMI 1640 Medium + 10% FKS auf eine Konzentration von 2×10^5 Zellen pro ml Medium verdünnt. In

jedes Loch einer 96 - Loch - Platte gab man 100 µl der Zellsuspension (20.000 Zellen/ Loch). Während der Inkubation für 24 Stunden bei 37° Celsius bildeten sich in den einzelnen Löchern Monolayer von A549-Zellen aus. Am zweiten Tag des Testes setzte man in neuen Mikrotiterplatten die IFN - Verdünnungen an. In jede Vertiefung der Mikrotiterplatte wurden 125 µl RPMI 1640 Medium + 10% FKS vorgelegt. Die Löcher der ersten Reihe (1A-12A) erhielten das gleiche Volumen an bekannter Interferon - Lösung und der zu bestimmenden Probe. Nach Durchmischung des Ansatzes wurden 125 µl in das zweite Loch vertikal übertragen und von dort nach Durchmischung in die 3. horizontale Reihe pipiert. Diese vertikalen 1:2 Verdünnungsstufen wurden bis zur Reihe F durchgeführt. die aus der Reihe F abgenommenen 125 µl wurden verworfen. Auf jeder Platte wurden die Reihen G und H mit einer Zellkontrolle und einer Viruskontrolle belegt (siehe Abb. 2). Das Verdünnungsmuster wurde mit einem Volumen von je 100 µl auf die Mikrotiterplatte übertragen, die inzwischen einen intakten Zellrasen enthielt. Die Mikrotiterplatte verblieb anschließend für 14 bis 18 Stunden bei 37°Celsius und 5% CO₂. Der Zellrasen wurde nachfolgend 2mal mit je 100 µl RPMI 1640 Medium gewaschen , und jeweils 100 µl von RPMI 1640 Medium + 2% FKS hinzugegeben. Außer der Zellkontrolle erhielten nun alle Ansätze 50 µl einer EMC - Virus - Verdünnung in RPMI 1640 Medium. Die Verdünnung der Virus - Lösung wurde so gewählt, dass die Viruskontrolle nach 24-36 Stunden eine volle Abtötung der Zellen zeigte, und man gleichzeitig bei den IFN - Standardkonzentrationen ein Endpunkt des lytischen Effektes bestimmen konnte. Die Zellkontrollen erhielten an Stelle der Viruslösung 50 µl RPMI 1640 Medium. Nach einer Inkubation von 24 Stunden bei 39°Celsius erfolgte die Lichtmikroskopische Auswertung des Bio - Assays. Die subjektive Beurteilung der Zerstörung des Zellrasens wurde in fünf Bewertungsstufen durchgeführt, wobei «0» einen intakten Monolayer entspricht, während die Bewertung «4» 100% Zerstörung entspricht. Die IFN-Konzentration entspricht dem reziproken Wert der Verdünnungsstufe, bei der man einen Schutz von 50% (Bewertungsstufe «2») beobachten konnte. Die Bestimmung des IFN-Titers erfolgte bei jeder Mikrotiterplatte stets durch Vergleich mit einer bekannten IFN - Standardkonzentration. Das Ausmaß der Abtötung lässt sich auch durch eine Färbung mit Kristallviolett sichtbar machen (siehe Abb. 2). Nach Dekantieren des Überstandes wurden in jedes Loch 100 µl einer Kristallviolett - Färbelösung (0,035% v/v Formaldehyd, 1% v/v abs. Ethanol, 0,005% g/v NaCl, 0,015% g/v Kristallviolett, ad 11 H₂O) gegeben. Nach einer Einwirkzeit von 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Lösung abgegossen. Die Mikrotiter wurden 2 x unter langsam fließendem Wasser gewaschen und konnte nach Lufttrocknung abgelesen werden. Lebende Zellen zeigten sich nach dieser Färbung durch eine violette Färbung aus, während tote Zellen beim Waschvorgang entfernt wurden, so dass die Viruskontrolle durchgehend farblos erschien (siehe Abb. 2). Anhand der Standardlösungen konnten die IFN - Konzentrationen bestimmt werden, wobei 1 I.E./ ml die Menge an IFN ist, die die Zellyse um 50% reduziert. Man erkennt, dass die Proben A, B, und C Standardkonzentrationen sind, und damit die Probe E und F abgelesen werden kann. Probe F enthält demnach ca. 25. I.E./ ml und Probe E ca. 10 I.E./ ml. Die Sensitivitätsgrenze des Bioassays liegt bei 6 I.E./ ml Testflüssigkeit.

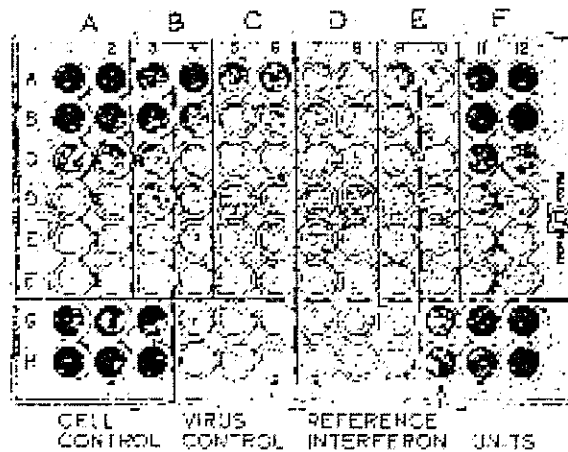


Abb. 2: Bioassay (AVA) in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte
Zellkontrolle: schwarz (G1-G3;H1-H3)
Viruskontrolle: weiß (G4-G6;H4-H6)
IFN-Standard: 25 IE/ml (A1-A2)
12,5 IE/ml (B1-B2)
6 IE/ml (C1-C2)

2.4. ELISA

Der vorliegende Assay ist ein Enzym-Linked-Immunoabsorbent Assay (ELISA) und dient zur quantitativen Bestimmung von Interferon-alpha. Dieser Immunoassay basiert auf dem Sandwich-Prinzip indem zwei immunologische Schritte durchgeführt werden. Der erste Schritt besteht darin, dass frei vorliegendes Interferon-alpha mittels eines monoklonalen Antikörpers, welches sich in den Öffnungen einer Mikrotiterplatte befindet, gebunden wird. Im zweiten Schritt wird mit einem biotinierierten polyklonalen Antikörper, der eine andere Domäne des Interferon-alphas erkennt, zusammen mit einem Streptavidin-Peroxidase Konjugat inkubiert. Nachfolgend bindet der biotinilierte Antikörper den Immunkomplex und das Konjugat. Nach Zugabe von Biotin und nachfolgenden Waschen wird das Substrat bestehend aus einer Peroxidase-Lösung in die Mikrotiterplatte gegeben. Die Intensität – gemessen in OD – ist ein Maß für die Interferon-Konzentration, die mittels gleichzeitiger Inkubation einer IFN-Standardlösung ermittelt werden kann.

2.5. Reagenzien

Interferon-alpha 2b (Intron) Ch.B.: 99C10001
5 Mio. I.E./0,5 ml
Essex Pharma München

3. Ergebnisse

Die Testsubstanz Interferon-alpha 2b (Intron A) wurde in kommerziell erwerblichen Ampullen bezogen. Der Inhalt einer Ampulle wurde mit dem Injektionssystem Injex™ oder mit einer herkömmlichen Spritze jeweils in ein 5 ml Röhrchen gespritzt. Anschließend wurden die Röhrchen kurz abzentrifugiert, um das gesamte Flüssigkeitsvolumen zu sammeln. Hiervon wurde ein Aliquot für die FPLC Analyse

sowie für den Bioassay eingesetzt. Als Referenz wurde Intron A- Lösung einer zweiten Ampulle direkt entnommen.

3.1. Bestimmung von Interferon-alpha nach Gebrauch des Injex mittels FPLC

Die molekulare Stabilität wurde in einer FPLC-Analyse untersucht. Hierfür wurden von den IFN- α Lösungen, die nach Injektion durch das InjexTM oder eine herkömmliche Spritze erhalten wurden, jeweils 200 μ l auf die Säule aufgetragen und eine Analyse über 40 min. durchgeführt. Der peak wurde für beide IFN- α Lösungen bei einer Extinktion von 205 nm nach 17 min. beobachtet (Abb. 3). Durch Übereinanderlegen der Einzelanalysen konnte eine identische Kinetik mit identischen Maxima beider Läufe gezeigt werden (Abb. 4)

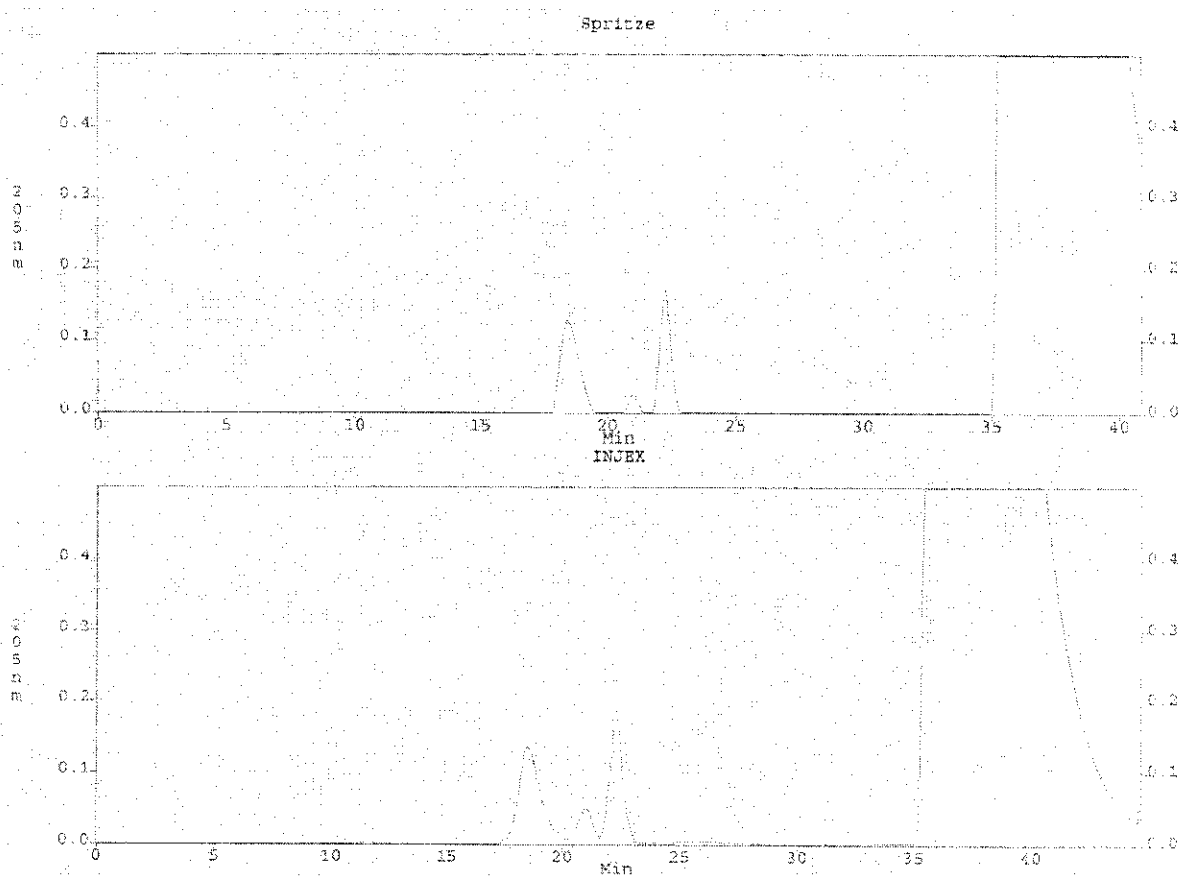


Abb 3: FPLC-Lauf von Interferon nach Verwendung einer herkömmlichen Spritze

(siehe oben) und des nadelfreien Injex™-Systems (siehe unten)

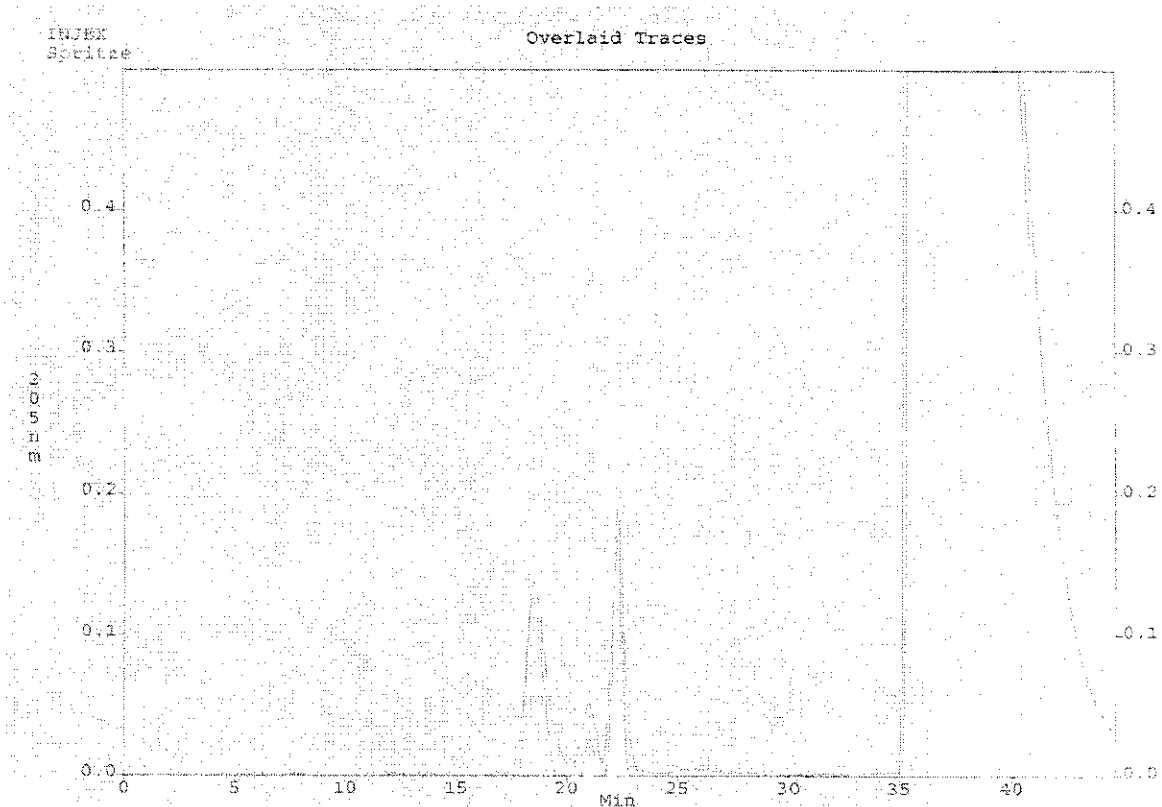


Abb. 4: Überlagerung beider FPLC-Läufe von Interferon-alpha nach Verwendung einer herkömmlichen Spritze und des Injex™-Systemes

3.2. Bestimmung von Interferon-alpha nach Gebrauch des Injex mittels Bioassay

3.2.1. Bestimmung von Interferon-alpha nach Gebrauch des Injex und herkömmlicher Spritze mittels Bioassay

Zur Bestimmung der biologischen Aktivität wurden die in den 5 ml Röhrchen aufgefangenen IFN- Lösungen 1:1000 mit PBS vorverdünnt und anschließend 1:2 im Doppelansatz über die A549 Zellen titriert. Als Kontrolle für das Testsystem und zur Bestimmung der Einheit 1 Unit wurde IFN- α ebenfalls 1:2 im Doppelansatz über die Zellen titriert. 1 Unit entspricht dabei der Konzentration an Interferon, die ausreicht, um eine 50 %ige Hemmung der Lyse durch das Virus zu bewirken. Als weitere Kontrollen wurden Zellen mit Virus und ohne IFN bzw. Zellen ohne IFN und ohne Virus eingesetzt. Die einzusetzende, garantiert lytische Viruskonzentration, wurde in einem separat durchgeführten Test bestimmt. Nach Inkubation der Zellen mit Interferon- α für 1 h wurde das Virus zugegeben und die Platte für weitere 18 h inkubiert. Anschließend wurde der Grad der Zellyse mikroskopisch ausgewertet.

Die Kontrollen in Reihe 12 belegen die korrekte Durchführung des Testes. Die Positivkontrollen mit IFN- α in Reihe 10 und 11 zeigen, daß eine 50 %ige Hemmung der Zellyse in einer Verdünnung von 1:4 erreicht wurde (Reihe C) und diese Verdünnungsstufe somit 1 Unit entspricht. (Abb. 5)

Die IFN- α Lösungen nach Injektion durch das Injex™ oder eine herkömmliche Spritze wiesen dagegen jeweils in der Reihe G eine 50 %ige Hemmung der Zellyse

3.2.2. Bestimmung von Interferon-alpha nach Gebrauch des Injex nach FPLC mittels Bioassay

In einem weiteren Ansatz wurde die biologische Aktivität nach Analyse in der FPLC überprüft. Hierfür wurde das Eluat der IFN- α Lösung nach Injektion durch das InjexTM in 5 Fraktionen aufgefangen und unverdünnt im Antiviralen Assay eingesetzt. Die einzelnen Fraktionen sind in Abbildung 6 (Peaks 1-5) dargestellt. Die Fraktionen 1 und 2 (Reihe 5 und 6) bewirkten einen kompletten Schutz vor der Zellyse (Abb. 5), was darauf hinweist, daß hier intaktes IFN- α eluiert wurde. Dies wird auch die Größe der Proteine in diesem Bereich belegt, die mit einer Größe von 18.000 D bzw. 21.000 D im Bereich des rek. IFN- α mit einer Größe von ca. 17.000 D liegt. Die Fraktion 3 (Reihe 7) zeigte nur noch einen geringen antiviralen Schutz, was den abnehmenden Anteil an intaktem IFN- α belegt. Die Fraktionen 4 und 5 (Reihe 8 und 9) enthielten nur noch marginale Konzentrationen an IFN-alpha zwischen 4 und 12 IE/ml.

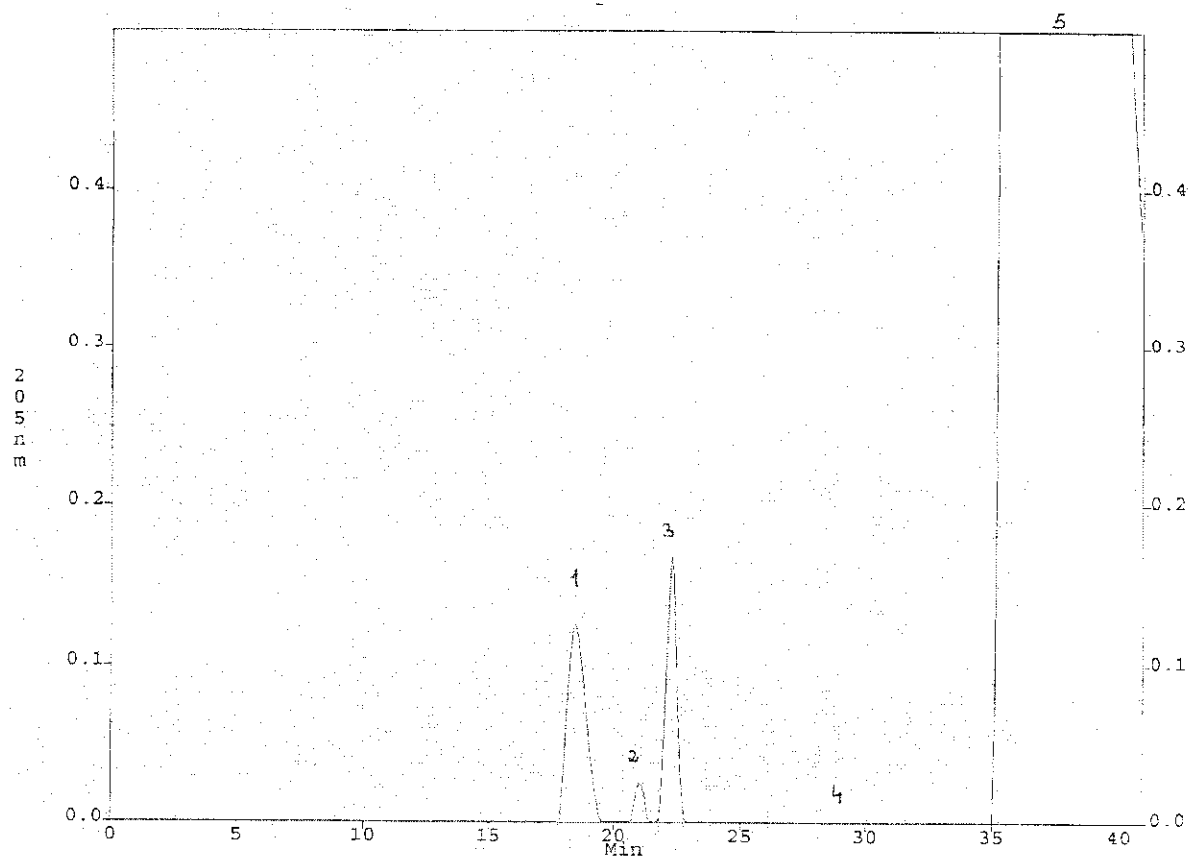


Abb. 6 FPLC-Lauf von Interferon-alpha und Elution von 5 verschiedenen Peaks

3.3. Vergleichende Untersuchung von Interferon-alpha nach Gebrauch des Injex und nach herkömmlicher Nadelinjektion in vivo

In diesem Ansatz wurde die Wiederfindung von rIFN- α im Serum nach subkutaner Injektion von Interferon-alpha mittels des InjexTM im Vergleich zur Injektion mittels einer herkömmlichen Spritze untersucht. Dazu wurde im Abstand von zwei Wochen einem Probanden 0,3 ml (3 Mio. IE) einer Interferon-alpha 2b Lösung (siehe Methoden) einmal mit herkömmlicher Spritze und nachfolgend mit dem InjexTM-System appliziert. Die Blutproben wurden zu Beginn der Applikation und 1, 2, 4, 6, 8 und 24 Stunden nach der Injektion abgenommen. Die Proben wurden bei 1500 g für 15 min. zentrifugiert und das Serum bei -20° C. aufbewahrt. Die Analyse der Serumproben erfolgte dabei in einem IFN spezifischen ELISA der Fa. Beckmann-Coulter (siehe 2.4.)

IFN-Kinetik von 3 Mio. IE IFN-alpha 2b in vivo mit und ohne Nadelapplikation

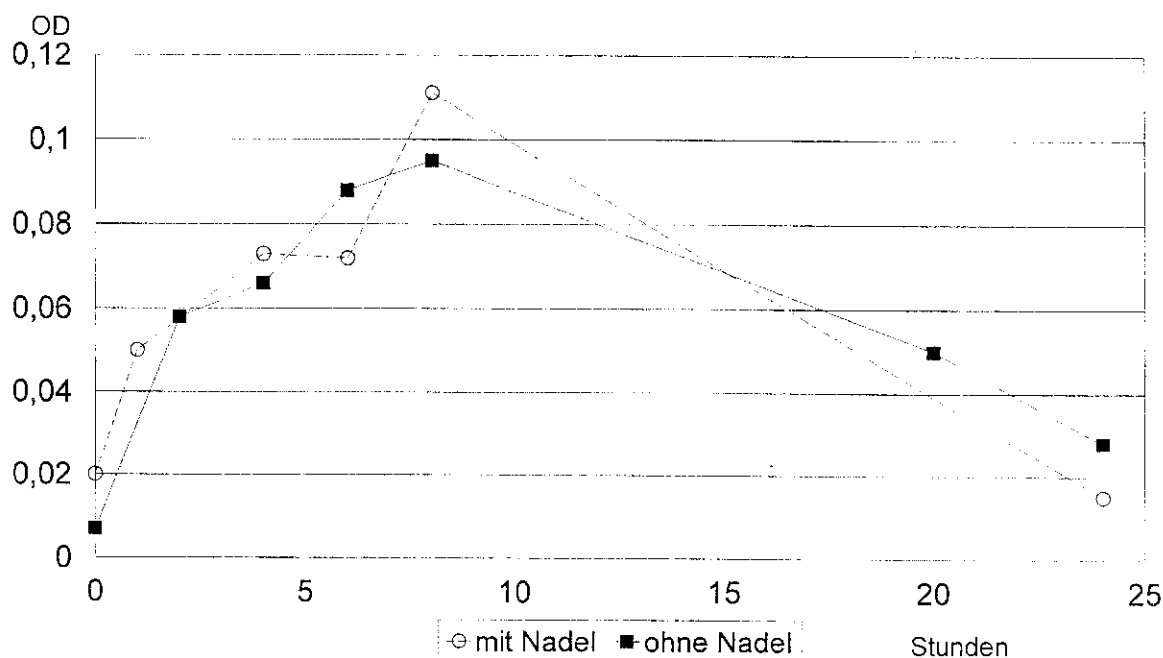


Abb.7 Pharmakinetik von IFN- α nach nadelfreier und Nadel-Injektion

Nach beiden Applikationsarten konnte rIFN-alpha im Serum detektiert werden. Zunächst erfolgte ein Anstieg der Serumkonzentration mit einem Maximum nach 8 h. Danach fiel die Serumkonzentration an rIFN-alpha wieder ab und erreichte nach 24 h fast wieder das Ausgangsniveau. Insgesamt konnte festgestellt werden, dass in diesem Einzelfall sich die Pharmakokinetik von Interferon-alpha (hier 3 Mio. IE) nach Verwendung einer herkömmlichen Nadelinjektion im Vergleich zum InjexTM-System nicht signifikant unterscheidet (Abb. 7).

4. Zusammenfassung

Es wurde untersucht, ob sich die Eigenschaften von rekombinantem Interferon- α (Intron A) durch den Einsatz des Injektionssystems InjexTM im Vergleich zum Einsatz in einer herkömmlichen Spritze verändern. Untersucht wurde die molekulare Stabilität und die biologische Aktivität des Proteins.

Anhand der biologischen Aktivität in einem antiviralen Testsystem konnte nach beiden Applikationsarten dieselbe IFN- α Konzentration ermittelt werden.

Die molekulare Strukturanalyse zeigte nach Injektion durch eine herkömmliche Spritze und das InjexTM in ein 50 ml Röhrchen dasselbe Muster. In beiden Fällen lagen die peaks im selben Größenbereich und entsprachen damit der vom Hersteller angegebenen Größe für rIFN- α . Die Analyse der einzelnen Fraktionen nach Injektion durch das InjexTM in der FPLC zeigte ferner, daß der Hauptanteil des Proteins in seiner Struktur und damit auch seiner biologischen Wirkung erhalten bleibt.

Es konnte daher gezeigt werden, daß die molekulare Stabilität sowie die biologische Aktivität von rIFN- α nach Applikation durch das Injektionssystem InjexTM nicht beeinflußt werden.