

Innkapslede celler som legemiddelform

Del 1: Status og utfordringer

TEKST:

Benjamin Endré Larsen og Jan Karlsen, Avdeling for farmasi, seksjon for galenisk farmasi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo, e-post: b.e.larsen@farmasi.uio.no

SAMMENDRAG

HENSIKT

En kartlegging av mulige bruksområder for legemidler og preparater basert på innkapslede celler, og viktige problemstillinger knyttet til slike preparater, med særlig vekt på formulering.

MATERIALER OG METODER

Bakgrunns materialet er innhentet fra bidrag på Tissue Engineering workshop i regi av Den norske legeförening, TERMIS World Conference 2009 i Seoul, samt ved hjelp av databasen ISI Web of Science.

RESULTATER

Preparater basert på innkapslede celler brukes i form av probiotika i veterinær- og humanmedisin. Implantater til human bruk har lenge vært under utvikling.

DISKUSJON

Vi peker på fire viktige utfordringer: Formulering, biokompatibilitet, tilgang til celler og regulatoriske hensyn. Noen av de viktigste utfordringene når det gjelder implanterbare, cellebaserte terapier knytter seg til formulering av egnede gelmatriser. Nøkkelord er næringstilgang, biokompatibilitet og tilpasning til spesifikke celletyper.

KONKLUSJON

Cellebaserte, legemiddelliknende terapier har i dag flere bruksområder innenfor human- og veterinærmedisin. Fremtidige bruksområder vil styres av utvikling i materialteknologi og dyrknings-/differensieringsmetode.

HOVEDBUDSKAP

Innkapslede celler som implanterbare legemidler er en mulig løsning på flere medisinske problemer.

Formulering, biokompatibilitet, tilgang til celler og uavklart regulatorisk status er viktige utfordringer for slike preparater.

HENSIKT

En rekke sykdommer krever langtids- eller kronisk behandling med virkestoffer som er svært labile i et biologisk miljø, som i tilfellet Parkinsons sykdom og dopamin (Yasuhara og Date 2007). I andre tilfeller brukes virkestoffer som har en vanskelig syntese, men kan fremstilles relativt enkelt i cellekultur. Dette gjelder for eksempel veksthormoner ved hypofysesvikt. I noen tilfeller spiller begge deler inn, som for insulin og diabetes 1. Fremtidige behandlingsformer kan bli basert på kombinasjoner av biologiske faktorer som frisettes i et svært avgrenset område. Slik kan man stimulere cellene i vevet rundt til å endre adferd. For eksempel kan celler i skadet ryggmarg gjendanne nerveforbindelser; nytt muskelvev og nye blodkar kan dannes etter et hjerteinfarkt.

Bruk av innkapslede eller immobiliserte celler kan gi mulighet til å nå noen av disse målene. Innkapslede celler og cellebaserte preparater har også blitt fremmet som mulige alternativer i forbindelse med behandling av vevsskader, organsvikt eller medfødte anatomiske defekter.

Slike preparater har vist lovende resultater mot diabetes i *in vivo*- og kliniske studier (Soon-Shiong, Heintz et al. 1994; Orive, Hernández et al. 2003). Det

er også vist effekt mot Parkinsons sykdom (Yasuhara, Shingo et al. 2005) og hemofili B (Wen, Vargas et al. 2006) i *in vivo*-modeller. Et annet anvendelsesområde er sårbehandling, der studier i mus har vist lovende resultater (Weng, Romanov et al. 2008). Prinsippstudier har vist at innkapslede celler kan produsere monoklonale antistoffer. Dette åpner for spennende muligheter blant annet i behandling av autoimmune sykdommer (Shirai, Hashimoto et al. 1987).

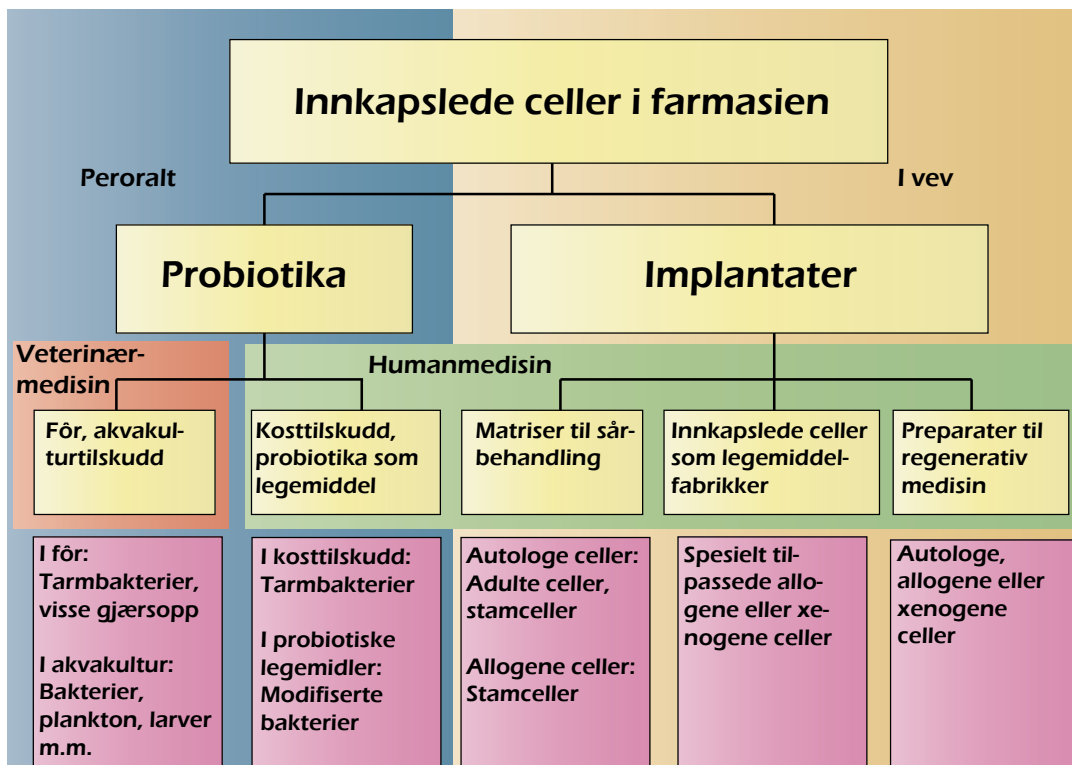
Innkapsling av humane celler til reparasjon av vev har fått mye oppmerksomhet de siste årene. Kombinert med stamcelleforskning knyttes det store håp til slik teknologi. Likevel er ideen om bruk av levende celler som legemiddel temmelig gammel, og ble først formulert av den russiske biologen og legen Metsjnikov i 1908 (Mečnikov 1988 (original 1908)). Han foreslo å bruke bakteriekulturer fra surmelk til stabilisering av tarmfloraen. Dette er det direkte opphavet til dagens probiotika (Vasiljevic og Shah 2008). Nyere forskning har vist at innkapslede *E. coli*-bakterier gitt peroralt gir god effekt i behandling av uremi hos rotter (Prakash og Chang 1996), og det er vist at andre arter, bl.a. *Lactobacillus spp.* kan være egnet (Chow, Liu et al. 2003). Probiotika anvendes også i dyrefôr og i akvakultur (Gillor, Etzion et al. 2008).

Figur 1 illustrerer bruk av innkapslede celler som legemidler. Cellenes funksjon spenner fra utskillelse av enkeltsubstanser til gjendannelse og erstatning av funksjonelt vev. Det er et betimelig spørsmål om implanterbare innretninger med celler bør kalles legemidler. Dette vil vi komme tilbake til nedenfor.

RESULTATER OG DISKUSJON

Vi vil kort gjøre rede for utfordringer knyttet til den nåværende teknologien for celle-

Figur 1. Oversikt over ulike anvendelser av innkapslede celler i farmasien, og hvilke typer celler som er aktuelle til disse formålene. Autologe celler er hentet fra pasienten selv. Allogene celler kommer fra andre individer av samme art. Xenogene celler stammer fra dyr, for eksempel gris.



baserte preparater på fire områder, som vi mener er særlig sentrale: Formulering, biokompatibilitet, tilgang til celler og regulatoriske hensyn. En grafisk fremstilling av prinsippet for innkapsling av celler, med særlig vekt på de utfordringene som opptrer i forbindelse med implantater, finnes i figur 2.

Formulering

Matriser og materialskjeletter må formuleres slik at de styrer cellenes adferd og beskytter cellene mot pasientens immunforsvar og enzymer. Det er viktig at diffusjon av næringsstoffer og virksomme produkter går raskt. Preparatet må brytes ned på en kontrollert måte og ikke avstøtes. Dagens teknologi er i hovedsak knyttet til to ulike konsepter: mikrokapsler og større matriser.

Mikrokapsler er særlig aktuelle der preparatet ikke skal ha en strukturell funksjon, og man bare er ute etter ett bestemt celleprodukt, for eksempel insulin. Slike kapsler fremstilles i hovedsak av alginat. De har en karakteristisk struktur, der høykonsentrert alginat utgjør en ytre, halvt gjennomtrengelig membran, som inneslutter en matrise av alginat i lavere konsentrasjon. Denne strukturen er et resultat av fremstillingsmåten: Alginatløsning dryppes kontrollert i et bad av divalente metallioner, for eksempel Ca^{2+} eller Sr^{2+} . Dette fører til at det dannes en gel. På grunn av entropiske krefter vil alginatkonsentrasjonen

være høyest ved overflaten, slik at man får en slags kapsel (Strand, Mørch et al. 2000).

Mikrokapsler har en diameter på under 1 mm, og inneholder derfor et begrenset antall celler. Hos mennesker overstiger avstanden fra en celle til nærmeste kapillær sjelden 200 μm . Den korte avstanden er direkte knyttet til cellenes behov for næring. Preparatets størrelse er derfor en viktig formuleringsfaktor.

For større preparater er det nødvendig enten å bruke lavere celletetthet, stimulere til dannelsen av blodkar eller på annen måte sikre tilstrekkelig massetransport. I noen tilfeller kan vekslende mekanisk belastning ved bruk være tilstrekkelig. I mange tilfeller må man likevel formulere mer komplekse matriser, der enten struktur eller kjemi reduserer den effektive diffusjonsraten for viktige nærings- og avfallsstoffer. Oksygen er en særlig utfordring, på grunn av den lave vannløseligheten og det store behovet.

Nydannelse av blodkar i implantater er svært komplisert. De beste studiene begrenser seg foreløpig til *in vivo*-modeller uten immunforsvar (Jabbarzadeh, Starnes et al. 2008). Økt oksygentilgang ved hjelp av kjemiske modifikasjoner har vært forsøkt i *in vitro*-studier i form av gelemulsjoner med perfluorkarboner (Malda, Klein et al. 2007). Det er også mulig å tenke seg inkorporering av hem-baserte hjelpestoffer for å lette oksygendiffusjon.

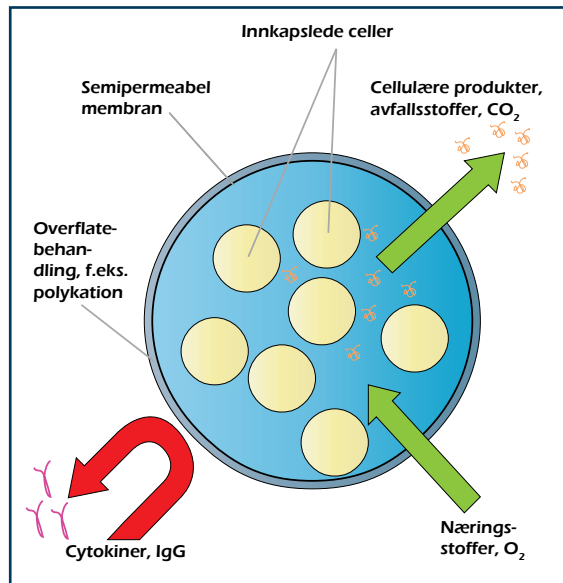
For å øke de innkapslede cellenes levedyktighet bør innkapslingsmaterialets diffusjonsegenskaper, og hvordan ulike formuleringer påvirker disse, være godt kjent. Gode karakteristikk av de innkapslede cellenes metabolisme er åpenbart viktig. Gelmaterialenes porestørrelse må også tilpasses formålet. Liten porestørrelse vil føre til økt effektiv diffusjonslengde og redusert effektiv diffusjonsrate, samt utelukkelse av molekyler over en viss molekylvekt. Større porestørrelse vil gi økt næringstilgang og økt avsetning av cellulære produkter, men også i større grad eksponere cellene for immunsystemet. VEGF, en viktig vekstfaktor i nydanning av blodkar, har for eksempel en molekylradius på omkring 3,2 nm (Stefanini, Wu et al. 2008), mens det tilsvarende tallet for immunmediatoren IgG er 5,2 nm (Ambati, Canakis et al. 2000). For å beskytte mot IgG-medierte angrep på de innkapslede cellene må matrisen utformes slik at substanser med en molekylvekt over ca. 150 kDa eller diffusjonsvernsnitt over ca. 14 nm ikke kan diffundere inn (Striemer, Gaborski et al. 2006). Dette har åpenbart konsekvenser for formulering av matriser der en ønsker at det skal vokse blodkar. Porestørrelsen er en substansspesifikk egenskap og må tilpasses ved hjelp av monomerens molekylvekt, kryssbindingsgrad og eventuelle øvrige gelkomponenter.

For større preparater er de biomekaniske egenskapene viktige: Viskoelastisi-

teten til gelmatrisen må avstemmes mot polymerkonsentrasjon og porestørrelse, samtidig som den påvirker preparatets evne til å motstå mekaniske belastninger på implantasjonsstedet. De innkapslede cellenes differensiering påvirkes også av de rheologiske egenskapene til innkapslingsmaterialet. Når det først påpekes, er det intuitivt lettfattelig at nerveceller trives bedre i myke geler som likner det plastiske nervevevet, mens korrekt differensiering av osteoblaster best foregår i stive geler (Weinand, Gupta et al. 2007). Økt stivhet oppnås ved å tilsette en større mengde kryssbinder per enhet av den geddannende polymeren og dermed øke kryssbindingsfrekvensen. Høyere kryssbindingsfrekvens vil imidlertid føre til sprøere geler. Den dynamiske bindingsmekanismen til alginater, basert på ionebindinger med relativt lav individuell bindingsenergi, gjør at alginater kan formuleres for å tilfredsstille en rekke ulike krav. En metode for å gi større mekanisk styrke som er blitt brukt både for større matriser og mikrokapsler av alginat går ut på å dekke ytersiden av preparatet med polykationiske polymere som poly-L-lysin og poly-L-ornitin (Schmidt, Rowley et al. 2008). Ettersom alginat er et polyanion binder disse seg tett til polymerkjelettet.

Et annet kryssningspunkt mellom formuleringsvitenskap, celleinnkapsling og biokompatibilitet finner vi i bruken av erytrocytter som biologisk stabilisator for innkapslede β -celler (Wiegand, Kroncke et al. 1993). Erytrocyttene fungerer som gatefeiere (*scavengers*) og nøytraliserer cytotoxiske nitrogenoksider som produseres av immunceller. Som analogi til den tradisjonelle formuleringsvitenskapens bruk av tilsatzstoffer eller andre strategier for å beskytte virkestoff ved å innstille optimal pH, hindre oksidasjon og gi økt fotostabilitet, peker denne bruken av cellulære eksipienter i retning av spennende muligheter for tverrfaglig forskning. Saminnkapsling av en eller flere celletyper med den primært terapeutiske kan i mange tilfeller være ønskelig og i visse tilfeller også nødvendig på grunn av for eksempel parakrine reguleringsprosesser. Det finnes imidlertid lite forskning på dette feltet i dag.

Preparater til peroral bruk vil stå overfor andre, men mer velkjente problemstillinger i forbindelse med å bringe levende celler gjennom magesekken og de øvre delene av tynntarmen. Mye av dagens probiotika er formulert uten spesifikk beskyttelse, blant annet er de aktive bakteriestammene i mange probiotiske produkter fritt suspendert i den gelen som utgjør



Figur 2. Prinsippsskisse av et system der innkapslede celler produserer en gift aktiv substans. Cellene er suspendert i en matrise, innesluttet av en semipermeabel membran. Denne kan igjen være overflatebehandlet for å gi økt styrke eller bedre interaksjon med vev.

res av denaturerte melke- eller korn-(lipo-) proteiner. Bakteriestammene som brukes i probiotika er i mange tilfeller anaerobe og doseringsformen må derfor formuleres med henblikk på å utelukke oksygen fra preparatet i størst mulig grad. I et vanlig preparat med høy metabolsk aktivitet er imidlertid dette et trivielt problem.

Formulering av probiotiske preparater følger ellers i grove trekk de samme prinsippene som innkapslede mammalske celler, og de fleste formuleringer hvor det probiotiske agens ikke er direkte suspendert i en matvare eller liknende baserer seg på mikroinnkapsling. Peroralt er tilfanget av polymermaterialer som kan brukes langt større enn for preparater som skal implanteres i vev. En oversiktsartikkel av Anal et al. (Anal og Singh 2007) nevner bl.a. karragenan, kitosan, alginat og ftalsyrederivater. Når perorale preparater i form av matvarer skal formuleres må det også tas hensyn til sanseopplevelsen ved inntak. I mange tilfeller vil dette føre til at større mikrokapsler er lite egnet, i visse tilfeller får man utfordringer når det gjelder smak og lukt.

Formulering av probiotika der bakteriestammen ikke er suspendert i et vandig medium kan være nyttig, ikke minst med tanke på å utvide spekteret av probiotiske doseringsformer utover meieriprodukter og forlenge holdbarheten til probiotiske preparater. Tørre doseringsformer, slik som pulvere, avhenger av at probiotiske agens tørkes på en skånsom måte for å oppnå godt produksjonsutbytte. Anal et al. (Anal og Singh 2007) gir også en oversikt over ulike tørkemethoder.

Frysetørring er den mest skånsomme metoden, men er relativt dyrt. Den krever oppstykket produksjon, i motsetning til spraytørring som kan inngå i en helkontinuerlig produksjonslinje. Riktig valg av suspensjonsmedium øker utbyttet i produksjon av tørkede probiotiske mikroorganismer (Chavez og Ledebøer 2007).

Vaginale probiotika må i likhet med enterale formuleres på en måte som tar hensyn til de aktuelle bakteriestammenes optimale levekår, samtidig som de på lik linje med andre vaginale doseringsformer må unngå sjenerende rester, lukt etc.

Biokompatibilitet og biodegraderbarhet

Gode formuleringer er viktige for å oppnå biokompatible preparater. Det stilles strenge krav til råvarekvaliteten, særlig med tanke på kjemisk renhet. Ettersom preparatene skal være til stede i vev over lang tid er det være svært viktig at substansene som brukes ikke i seg selv er immunstimulerende.

Inflamasjon og fibroser rundt preparatet er en vesentlig utfordring. Immunreaksjoner oppstår ved at proteiner som adsorberes til matrisens overflate rekrutterer immunceller. Disse utskiller cytotoxiner som dreper innkapslede celler direkte. Immunresponsen kan føre til en negativ endring i kjemiske og mekaniske forhold rundt et implantat og redusere levetiden. Fibrotisk innkapsling representerer en alvorlig hindring for massetransport, særlig av makromolekylære produkter. Hovedstrategiene for å unngå dette er: innkapsling av celler i inerte hydrogeler, modifisering av gelmatrisens

overflate med inerte molekyler, forankring av inerte molekyler i cellemembranen og kontrollert formulering av hydrogelens mikrostruktur.

Imidlertid rapporteres det fremdeles om manglende biokompatibilitet *in vivo*. Dette antas først og fremst å ha sammenheng med innkapslingsmaterialets renhet. Flere grupper har rapportert å ha produsert celleholdige preparater som ikke har fremkalt noen negativ reaksjon ved implantering (Zimmermann, Zimmermann et al. 2005). Som en allmenn løsning er det blitt foreslått en standardiseringskomité som overvåker de eksperimentelle prosedyrene på feltet inntil man får bukt med problemet (Orive, Hernández et al. 2003).

Når et celleholdig preparat skal tillate cellene å danne en erstatning for tapt eller manglende vev, er det nødvendig at matrise-/materialskelettdelen av preparatet brytes ned i takt med cellenes vekst. Dette er særlig aktuelt ved sårbehandling eller behandling av brusk- og beindefekter (Peter, Miller et al. 1998). Optimalisering av evnen til slik nedbrytning – biodegraderbarhet – vil avhenge av det mekaniske miljøet et preparat er ment for (da Silva Soares 2008). Preparater der innkapslingsmaterialet skal være romfyllende og ha en viss mekanisk stabilitet vil trolig måtte skreddersys til hvert enkelt brukstilfelle. For preparater der hovedformålet er utskillelse av fysiologisk virksomme stoffer, vil ønsket biodegraderbarhet avhenge av behandlingens varighet, toleransen for de innkapslede cellene og implanteringsstedet. Mikrokapsler med insulinproduserende celler har forblitt intakte i bukhulen på mennesker i mer enn et år (Soon-Shiong, Heintz et al. 1994). Dette er mer enn tilstrekkelig for å sikre et slikt preparats levedyktighet fra et rent praktisk synspunkt.

Tilgang til celler

Tilstrekkelig tilgang til korrekt differensierede eller differensierbare celler er en vesentlig utfordring (Sun, Ma et al. 1996). I et klinisk forsøk der én pasient fikk implantert innkapslede Langerhans' øyer brukte man bukspyttkjertler fra åtte donorer (Soon-Shiong, Heintz et al. 1994). Det er vanskelig å tro at en så donorintensiv behandlingsform kan bli alminnelig utbredt. I artikkelens del 2 vil sannsynlige cellekilder bli drøftet, her vil vi peke på en av de største utfordringene når det gjelder celletilgang: standardiserte og reproduserbare cellekulturer.

I utvikling av legemidler vil fullt ut karakteriserte cellekulturer med kjente og

reproduserbare egenskaper være svært viktig. Dette innebærer en betydelig utfordring dersom celledetallet som skal brukes kommer fra adult mammalsk vev. Det kan tenkes at det er mulig å underkaste donormaterialet en form for standardisert forbehandling, men den enkleste måten å utelukke variabilitet på vil være å basere seg på immortaliserte cellekulturer som dyrkes på strengt standardisert vis og underkastes kontinuerlig kontroll av genekspressionsmønster. I kliniske studier frem til nå har man i hovedsak sett bort fra problemstillingen, for i det hele tatt å utvikle praktiske løsninger på det overordnede medisinske problemet, eller man har basert seg på autologe celler.

Tilgang på celler til probiotiske preparater er ikke en utfordring på samme måte som for andre celleterapi. Det utføres imidlertid noe arbeid når det gjelder å finne og karakterisere nye bakteriestammer til probiotisk bruk, men hoveddelen av probiotika baserer seg på for lengst etablerte kulturer.

Regulatoriske hensyn

Det er mange regulatoriske vanskeligheter ved bruk av innkapslede celler som legemiddelform. Markedsførte probiotika til mennesker regnes i dag som kosttilskudd, og er dermed unntatt de kvalitetskrav som stilles til legemidler. Preparater ment til implantering vil åpenbart måtte vurderes strengere. Hvor skal grensene går mellom legemidler, medisinsk utstyr og transplantasjon? Dersom det er mulig å basere seg på én bestemt cellelinje, vil det være mulig å definere hele preparatet med celler som legemiddel. Dersom matrisen og et eventuelt materialskelett er utformet på en måte som gjør at det påvirker vertens eller pasientens fysiologi, vil preparatet omfattes av den norske legemiddelovens definisjon av legemidler. Hele preparatet kan da karakteriseres som en kombinasjon av legemiddel og en transplantasjon. Om matrisen/materialskelettet ikke i seg selv påvirker pasientens fysiologi er kanskje medisinsk utstyr, på linje med katetre og stenter, en mer dekkende beskrivelse.

Protokoller for fremstilling av alginat i klinisk kvalitet, innkapsling av Langerhanske øyer og implantering av de resulterende celleholdige mikrokapslene er blitt godkjent av det italienske legemiddelverket for fase 1-studier (Calafiore, Basta et al. 2006). Mindre omfattende enkeltstudier er gjennomført en rekke steder. Mangelen på et regulatorisk rammeverk som fremstår som tilstrekkelig enhetlig på

tvers av landegrensene påvirker likevel mulighetene for å utføre studier som tillater sammenlikning av resultater mellom forskergrupper.

EU-reglene om avanserte behandlingsformer utgjør det overordnede regelverket for slike terapier (EU 2007). Preparatgodkjenning i EØS-området er for tiden delt mellom det europeiske legemiddelverket EMEA (bruksferdige preparater) og nasjonale myndigheter (sykehusfremstilte preparater til enkeltpasient) (Sanzenbacher 2009). Probiotika benyttes hovedsakelig til profylakse og stilles overfor svakere regulatoriske krav enn legemidler. Likevel er det vesentlig å ha gode retningslinjer for utvikling og bruk av slike preparater. FAO/WHO utarbeidet slike retningslinjer i 2002 (Reid 2005). Innenfor EØS-området dekkes de av direktivet som populært omtales som Matsminke-direktivet (EU 2006), og Mattilsynet er norsk regulatorisk myndighet.

KONKLUSJON

Cellebaserte preparater har en rekke mulige bruksområder: Som probiotika til forebygging og behandling av særlig mage-tarmproblemer hos mennesker, og for å gi bedre helse og utbytte blant produksjonsdyr i land- og havbruk. Det knyttes store håp til cellebaserte preparater til parenteral bruk hos mennesker. De terapeutiske mulighetene når det gjelder kroniske og medfødte sykdommer som diabetes 1 og Parkinsons sykdom, samt vevsskader som brannskår, ryggmargsbrydd og artrose er svært spennende. Imidlertid står man overfor betydelige utfordringer med hensyn til formulering, biokompatibilitet, tilgang til celler og det regulatoriske rammeverket.

I del 2 av artikkelen vil ulike celle- og materialtyper bli nærmere omtalt. Dessuten vil vi peke på noen av de første mulige kliniske bruksområdene.

Oppgitte interessekonflikter: Ingen

Manuskriptet ble mottatt 3. mars 2009 og godkjent 23. september 2009. Fagredaktør Ingunn Tho.

Referanselisten finnes på: www.farmatid.no/id/3215

Del 2 av artikkelen, «Celler, materialer og muligheter», publiseres i neste utgave av NFT, det vil si nr. 12/2009.