

# Die Entwicklung und behördliche Akzeptanz von Alternativ-Methoden zu Bioassays bei der Qualitätskontrolle von Arzneimitteln

## Eine Herausforderung für Industrie und Zulassungsbehörden

Gundel Miethe und Gisbert Sponer

Stiftung zur Förderung der Erforschung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zur Einschränkung von Tierversuchen (SET), D-Mainz

### Zusammenfassung

*Bioassays werden zur Qualitätssicherung biologisch gewonnener Arzneimittel gemäß den Monographien durchgeführt, die im Deutschen oder Europäischen Arzneibuch festgelegt sind. Sie haben ihre Berechtigung, weil physiko-chemische oder andere analytische Methoden nicht in der Lage sind, die Wirksamkeit (potency) der Chargen zu definieren oder beim Herstellungsprozess entstehende geringe Mengen an biologisch wirksamen Verunreinigungen zu entdecken.*

*Neuere Bestimmungen (z.B. GMP), mit denen eine intensive Kontrolle aller Produktionsschritte ermöglicht wird, sowie technologische Fortschritte der letzten Jahre bei Herstellungsverfahren und analytischen Methoden lassen die Frage aufkommen, ob und gegebenenfalls welche Bioassays durch alternative Methoden ersetzt werden können. Hierzu werden in der vorliegenden Untersuchung alle in den Monographien enthaltenen Tests an biologischem Material einer kritischen Durchsicht unterzogen. Es werden Vorschläge für den Ersatz von Bioassays gemacht, die allerdings nur realisiert werden können, wenn sich alle Beteiligten – pharmazeutische Industrie, Zulassungsbehörde und andere Institutionen wie die Arzneibuch-Kommissionen – gemeinsam dieser Aufgabe stellen und, wo immer möglich, weitere Bioassays durch alternative Methoden ersetzen.*

**Summary:** The development and approval of alternative methods to bioassays used for quality assurance, a challenge for the pharmaceutical industry and the authorities

*Bioassays are performed to ensure a constant quality of medicines derived from biological sources. These tests are stipulated for some drugs in the German and European Pharmacopoeias. They are justified because physico-chemical or other analytical methods may not be appropriate to define exactly the potency of the drug in each individual batch and/or to detect any biologically relevant impurities. However, the implementation of good manufacturing practice and the technological progress in manufacturing and in analytical methods in the last few years raise the question whether some traditional bioassays can be replaced by new alternative methods which do not require biological tissues or animals. With respect to this topic the pharmacopoeias were reviewed and some proposals are presented in this paper. However, these approaches can only be realised when all parties involved – pharmaceutical industry, regulatory authorities and others – co-operate in the challenge to replace – wherever possible – bioassays by appropriate alternative methods.*

**Keywords:** 3R-methods, bioassays, biologicals, monographs, pharmacopoeia, safety tests

### 1 Einleitung und Standortbestimmung

Die maßgeblichen Standards für die Qualitätssicherung von Arzneimitteln sind im Deutschen Arzneibuch (2000) und in der Europäischen Pharmacopoeia (1997) festgelegt. Danach wird für eine Reihe von Substanzen biologischen Ursprungs eine konstante Qualität des Arzneimittels dadurch gewährleistet, dass Wertbestimmungen und Sicherheitsprüfungen mittels biologischer Methoden (insbesondere Tierversuche, aber

auch Zellkulturmethoden) erfolgen. Auf der anderen Seite kann der laufende Fortschritt in Wissenschaft und Forschung neue Möglichkeiten eröffnen, Bioassays durch andere, z.B. chemisch-analytische Verfahren zu ersetzen, insbesondere dann, wenn diese neuen Methoden eine gleichwertige oder sogar höhere Präzision und Richtigkeit erreichen als die entsprechenden Bioassays. Neue technische Möglichkeiten sollten deshalb zu Überlegungen und Neubewertungen der geltenden Vorschriften führen, ob die für die Qualitätskontrolle vorgeschriebenen Tier-

versuche noch wissenschaftlich und ethisch vertretbar sind. In den genannten Fällen sind alle Beteiligten, also die pharmazeutischen Firmen ebenso wie die Zulassungsbehörden und die Kommissionen, welche die Arzneibücher überarbeiten, aufgerufen, die neuen Erkenntnisse in validierte Methoden umzusetzen, sie angemessen zu publizieren und sie zu geltendem Recht zu machen. Damit trüge man dem 3R-Prinzip (*reduction, replacement, refinement*) Rechnung und könnte die Anzahl der Tierversuche – wo immer möglich – reduzieren, wozu

sich die politischen Parteien und viele Institutionen in Deutschland, in vielen anderen Ländern und in der Europäischen Gemeinschaft bekannt haben (EU-Beschluss 1999/575/EG).

In der Tat sind in den letzten Jahren durch die Europäische Arzneibuchbehörde (EDQM, *European Directorate for the Quality of Medicines*) eine beträchtliche Anzahl von Monographien geändert worden. Eine Reihe von Bioassays sind durch physiko-chemische Methoden ersetzt worden oder Tierversuche sind als Routinetests bei Sicherheitsuntersuchungen gestrichen worden. So wurde für Oxytocin und Calcitonin die Bestimmung des Hormongehalts durch Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) in die Monographien aufgenommen. Bei einzelnen Substanzen wurde die Prüfung auf Histamin und blutdrucksenkende Substanzen sowie auf anomale Toxizität als Routineprüfung eliminiert und in den Abschnitt „Produktion“ überführt, was bedeutet, dass der Test entfallen kann, wenn der Nachweis eines validierten Herstellungsverfahrens erbracht wird, der entsprechende Verunreinigungen ausschließt (Spielmann et al., 1998; Charton, 1999; Charton and Castle, 2001). Aufgrund einer kooperativen Studie des Paul-Ehrlich-Instituts (D-Langen) und der Medizinischen Hochschule Hannover konnte die Prüfung auf anomale Toxizität bei einer Vielzahl von Impfstoffen bzw. Sera entfallen (Schwa-

nig et al., 1997; BMBF Publikation, 2001). Dies wurde im Jahr 2002 auch von der EDQM beschlossen. Schließlich sei auch darauf hingewiesen, dass der Kaninchen-Test auf pyrogene Substanzen in Lösungen weitgehend durch den Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test, ein *in vitro* Verfahren, ersetzt worden ist, bzw. durch den noch potenteren Human-Vollblut-Test ersetzt werden wird (Hartung et al., 2001). Dennoch sind Bioassays in vielen Monographien des Arzneibuchs für die Qualitätskontrolle von Arzneien biologischen Ursprungs verblieben.

Die Stiftung zur Förderung und Erforschung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zur Einschränkung von Tierversuchen (SET) hat es sich zur Aufgabe gemacht, Möglichkeiten zu eruieren, aufgrund neuerer Erkenntnisse weitere Tierversuche im Rahmen der Qualitätskontrolle von Arzneimitteln biologischen Ursprungs zu reduzieren oder zu ersetzen und damit dem 3R-Konzept weiter Rechnung zu tragen. Dabei blieben Sera oder Vakzinen in unserer Untersuchung unberücksichtigt, weil für diesen Teilbereich bereits umfangreiche Untersuchungen vorliegen (Schwanig et al., 1997).

## 2 Vorgehen

Eine intensive Durchsicht der Monographien erlaubte eine Übersicht, bei

welchen Arzneimitteln noch Bioassays vorgesehen sind. Die Hersteller solcher Arzneimittel in Deutschland, der Schweiz, Österreich und den Niederlanden wurden daraufhin angeschrieben und um Auskunft ersucht, ob die in den Monographien angegebenen Bioassays weiterhin durchgeführt werden oder ob alternative Methoden dazu erarbeitet und validiert oder gar schon in der Routine angewandt werden. Auch wurde den Firmen Diskussion und gegebenenfalls Hilfe angeboten mit dem Ziel, Bioassays durch alternative Methoden zu ersetzen. Um dieses erreichen zu können, wurde umfangreiche relevante Literatur, die neuere immunologische und chemisch-analytische Methoden beschreibt, studiert sowie selbständige Ideen aufgrund eigener Erfahrung auf chemisch-analytischem Gebiet generiert.

Im Hinblick auf die Anwendung von sicherheitsrelevanten Tests, insbesondere der Test auf anomale Toxizität, interessierte die Frage, wie häufig Chargen allein aufgrund der Ergebnisse aus den Bioassays verworfen werden mussten.

Den Befragten war natürlich zugesichert worden, ihre Angaben vertraulich zu behandeln.

Schließlich hat die Europäische Arzneibuchbehörde (EDQM) auf Anfrage von SET über die derzeit laufenden Aktivitäten zum Ersatz von Tierversuchen informiert. Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse geben den

**Tab. 1: In den Monographien für folgende Substanzen ist zur Zeit noch eine Quantifizierung des Wirkstoffgehaltes mit einem Bioassay (Tierversuch) vorgesehen:**

| Monographie          | Bioassay   | mögliche Ersatzmethode                       |
|----------------------|--|--|
| Tetracosactid*       | Kortikosteroid-Biosynthese in Nebennierenzellen von Ratten   | HPLC (wird z.Zt. geprüft)                    |
| Lypressin*           | Anstieg des Blutdrucks bei narkotisierten Ratten   | HPLC   |
| Glukagon*            | Quantitative Bestimmung des hyperglykämischen Effekts in Kaninchen (Glukosekonzentration im Blut)              | HPLC   |
| Erythropoietin**     | Einbau von Eisen in Erythrozyten polyzythämischer Mäuse oder Anstieg der Retikulozyten normozythämischer Mäuse | CZE Isoformen*** (wird z.Zt. geprüft)        |
| Choriogonadotropin** | Gewichtszunahme der Samenbläschen junger männl. Ratten   | CZE Isoformen***                             |
| Urofollitropin**     | Gewichtszunahme der Ovarien jugendlicher weiblicher Ratten   | CZE Isoformen***                             |
| Digitalisglykosid    | Infusion der Testpräparate in Meerschweinchen bis zum Herzstillstand   | Test an embryonalen Herzmuskelzellen (Küken) |

Bei allen Bioassays werden mehrere Dosen bzw. Konzentrationen Prüfchargen gegen einen vorgegebenen Standard getestet, dessen Biopotenz bekannt ist.

\* Peptide ohne Glykosylierung im Molekül

\*\* Peptide mit Glykosylierungen im Molekül

\*\*\* CZE Isoformen: Prädiktionsmodelle mittels *potency* der Isoformen in der *capillary zone electrophoresis* (siehe auch Mieth, 2002)

Stand vom September 2001 wieder. Die Rücklaufquote betrug nach mehreren Erinnerungssaktionen schließlich ca. 65%.

### 3 Bioassays im Rahmen der quantitativen Bestimmung der Wirkung von Peptiden und herzwirksamen Glykosiden

In den Monographien sind für die in Tabelle 1 aufgeführten Substanzen eine Quantifizierung des Wirkstoffgehaltes der Chargen mittels Bioassays vorgesehen.

Die Produktion von Peptiden kann durch Vollsynthese oder durch gentechnologische Verfahren erfolgen. Dabei können Verunreinigungen und, besonders bei rekombinanter DNA-Technologie, Variationen entstehen, die den Wirkgehalt quantitativ beeinflussen können. Dies soll durch Bioassays erkannt werden. In vielen Fällen ist es bisher heute nicht möglich, den Wirkstoffgehalt der produzierten Charge selbst mit modernsten physiko-chemischen Methoden exakt anzugeben.

Ein Teil der Bioassays beinhaltet *in vitro* Methoden, andere *in vivo* Methoden. Für Tetracosactid, den 24 Aminosäuren enthaltenden wirksamen Teil von Corticotropin, wird ein Bioassay angegeben, bei dem an Ratten-Nebennieren-Zellen die konzentrationsabhängige Corticoid-Biosynthese durch die Testsubstanz im Vergleich zu einem Standard quantitativ gemessen wird. Offensichtlich wird Tetracosactid volla synthetisch hergestellt, sodass der Bioassay durch die bei gentechnologischen Verfahren möglichen Heterogenität nicht begründet werden kann. Unter Anwendung einer geeigneten HPLC-Technologie (Storring et al., 1984; Inouye et al., 1985) sollte es möglich sein, nicht nur die Identität, sondern auch den quantitativen Gehalt exakt zu erfassen, sodass nach unserer Ansicht auf den Bioassay verzichtet werden könnte. In der Tat laufen hierzu bereits Diskussionen bei einer EDQM-Expertengruppe.

Lypressin ist ein Peptid, bestehend aus neun Aminosäuren. Es ist mit Vasopressin und Oxytocin verwandt. Es wird synthetisch hergestellt. Die biologische Wertbestimmung erfolgt laut Monographie über seine blutdrucksteigernde Wirkung an narkotisierten Ratten. Auch

hier ist stattdessen eine chromatographische Bestimmung (HPLC) auf Identität und Reinheit denkbar (Maxl und Siehr, 1989; Krummen und Frei, 1977; Rao et al., 1991; Buck et al., 1991). Es gibt Hinweise darauf, dass in den produzierenden Firmen bereits solche Verfahren praktiziert werden. Inwieweit diese analytischen Methoden bereits *lege artis* gegen den Bioassay validiert worden sind, konnte nicht eruiert werden. Die EDQM ist offensichtlich noch nicht damit befasst, diesen Bioassay durch andere Methoden zu ersetzen. Dies erscheint aber sehr empfehlenswert, zumal in der US Pharmacopoeia bereits 2000 der Bioassay durch eine HPLC-Methode ersetzt worden ist (USP, 2000).

Glucagon ist ein Peptid aus 29 Aminosäuren, das durch Isolierung aus biologischem Material oder durch Vollsynthese und schließlich durch gentechnologische Verfahren gewonnen werden kann. Die letztere Methode gewinnt offenbar zunehmend an Bedeutung. Der in den Monographien beschriebene Bioassay sieht die Bestimmung der hyperglykämischen Wirkung an Kaninchen vor. Eine HPLC-Methode zur Prüfung auf Identität und Reinheit ist nicht vorgeschrieben. Immerhin ist aber eine HPLC-Methode zur Bestimmung von Glucagon publiziert (O'Hare and Nice, 1979). Selbstverständlich wäre eine HPLC-Methode nicht nur im Sinne der 3R-Konzeption vorzuziehen, sondern auch deshalb, weil sie eine zusätzliche Überprüfung auf Reinheit ermöglichen könnte. Allerdings müssten gegebenenfalls bei der Produktion entstehende Nebenprodukte mit biologischer Wirkung in die Kalkulation einbezogen werden. Ergänzend sollten auch Aussagen über die Zusammensetzung/Aminosäuresequenz und damit über ihre Identität mit modernen Massenspektrometriemethoden gemacht werden. Für den Fall der Neufassung der Monographie für gentechnologisch hergestelltes Glucagon durch die EDQM sollte jedenfalls auch die Frage des Bioassays einer kritischen Neubewertung unterzogen werden.

Der Ersatz der Bioassays, die zur Bestimmung der biologischen Wirkung von Glykoproteinen benutzt werden, gestaltet sich weitaus schwieriger.

Glykoproteine sind aus Isoformen mit unterschiedlichem Glykosilierungsgrad und Sialinsäuregehalt zusammengesetzt. Die einzelnen Isoformen besitzen in Abhängigkeit von ihrer Struktur unterschiedliche Biopotenz (Wirksamkeit und Nebenwirkungen), im Wesentlichen aufgrund unterschiedlicher pharmakokinetischer Kriterien. Die Heterogenität kann zu unterschiedlichen Wirkstärken der produzierten Chargen in Abhängigkeit ihrer Isoformenmuster führen. Zwar eröffnen gentechnologische Verfahren im Vergleich zur Gewinnung aus biologischem Material eine homogenere Produktion, aber gewisse Variationen müssen weiterhin in Kauf genommen werden. Als Beispiel sei hier Erythropoietin vorgestellt. Es ist ein Glykoprotein (MG ca. 30.000) mit schwankendem Kohlehydratanteil (Hirth et al., 1988). Es wird gentechnologisch hergestellt, wodurch ein sehr gut definiertes Produkt erhalten wird. Im Arzneibuch sind zur Bestimmung der Identität und Reinheit die isoelektrische Fokussierung vorgeschrieben, allerdings ist deren Ersatz durch Kapillarzonenelektrophorese (CZE) in Diskussion. Damit wird eine effiziente Auftrennung und Quantifizierung der Isoformen möglich (Bristow and Charton, 1999; Watson and Yao, 1993; Takeuchi et al., 1989). Die Chargenprüfung auf Biopotenz für die Rohware und für die fertige Formulierung erfolgt mittels eines Bioassays, bei dem an polyzythämischen oder normozythämischen Mäusen der dosisabhängige Eiseneinbau in die Erythrozyten oder die Retikulozyten-Bildung im Vergleich zu einem Standard bestimmt wird. Die Möglichkeit, diesen Bioassay durch andere Methoden zu ersetzen, besteht darin, eine Korrelation zwischen den erhaltenen Isoformenmuster und der biologischen Wirkung zu errechnen. Daraus ließe sich dann ein Prädiktionsmodell ableiten. Solche Möglichkeiten werden offenbar in industriellen und behördlichen Fachkreisen ausgelotet, also experimentell bearbeitet und diskutiert. Eine behördliche Akzeptanz und Aufnahme einer neuen Methode in die Monographie der Arzneibücher steht allerdings aus, solange Untersuchungen im Rahmen der Validierung noch nicht abgeschlossen sind. Immerhin könnte das Vorgehen bei Erythro-

prietin als Beispiel für andere Glykoproteine herangezogen werden, bei denen die Probleme ähnlich gelagert sind. Das trifft zum Beispiel für Urofollitropin und die Gonadotropine zu, die zurzeit noch – wenigstens überwiegend – aus biologischem Material gewonnen werden und bei denen in Bioassays die Massen Zunahme der Samenblase von juvenilen männlichen bzw. der Ovarien von juvenilen weiblichen Ratten bestimmt wird. Auch hier sollte es möglich werden, die Wirkstoffe durch gentechnologische Verfahren zu produzieren. Durch Einsatz moderner analytischer Methoden könnte dann ebenfalls eine Bestimmung einer Korrelation zwischen den Isoformen und der biologischen Wirksamkeit möglich werden, woraus ebenfalls durch einen Algorithmus ein Prädiktionsmodell entstehen könnte. Der endgültige Ersatz der Bioassays durch moderne analytische Methoden kann selbstverständlich erst dann erfolgen, wenn eine behördliche Akzeptanz erreicht wird, welche die Tauglichkeit der Methode und die intensive Validierung gegenüber dem bisherigen Verfahren beinhaltet.

Monographien für herzwirksame Drogenextrakte aus verschiedenen Pflanzen (*Adonis vernalis*, *Digitalis purpurea*, *Convallaria majalis* und *Urginea maritima*) finden sich nur im deutschen Arzneibuch, nicht jedoch in der Europäischen Pharmacopoeia. Im Gegensatz zu den Reinglykosiden (z.B. Digoxin mit seinen Derivaten) wird die Wirkwertbestimmung bei den Extrakten gemäß Monographie mittels Bioassay am Meerschweinchen durchgeführt, wobei die Kardiotoxizität als Kriterium gilt. Ob ein beschriebener *in vitro* Assay (Lehmann et al., 1993) sich als Alternative eignet oder lediglich die Validierung noch nicht abgeschlossen ist, die eine Voraussetzung für den Einsatz in der Qualitätskontrolle darstellt, konnte nicht in Erfahrung gebracht werden. Wünschenswert wäre es, den Tierversuch durch eine schonendere Methode abzulösen.

#### 4 Bioassays als Sicherheitstests

Als Prüfung auf Verunreinigungen für Chargen von biologisch gewonnenen Arzneimitteln werden in den Monogra-

phien der Arzneibücher folgende Tests genannt:

- Prüfung auf anomale Toxizität
- Prüfung auf Histamin
- Prüfung auf blutdrucksenkende Substanzen

Die Prüfungen haben ihren Ursprung vor ca. 50 Jahren und leiten ihre Sinnfälligkeit aus Risiken her, als man die Prozesse der Gewinnung von Wirkstoffen aus biologischem Material noch nicht so gut beherrschte wie heute und gentechnologische Verfahren noch nicht mit den technologischen Möglichkeiten wie heute existierten. Daraus ergaben sich früher immer wieder Verunreinigungen bei der Produktion von Wirkstoffen aus biologischem Material, die für den Patienten Nebenwirkungen und Risiken mit sich brachten. Heutzutage kann das Vorkommen von Verunreinigungen durch den inzwischen eingetretenen Fortschritt in der Technologie einschließlich verbesserter Verfahren zur Aufreinigung der gewonnenen Materialien sowie durch die Festlegung und Einhaltung von GMP (*Good Manufacturing Practice*)-Standards weitgehend ausgeschlossen werden (Ronneberger, 1993; Spielmann et al., 1998; Schwanig et al., 1997).

Für viele Substanzen, insbesondere für Sera und Vakzine ist die Prüfung auf anomale Toxizität in den letzten Jahren aus den Monographien gestrichen worden (Stöcker, 1996; BMBF-Publikation, 2001). Die Prüfung bleibt allerdings weiterhin uneingeschränkt vorgeschrieben für Griseofulvin, Streptokinase und für Allergenzubereitungen aus Schimmelpilzen. Für Aprotinin und deren Lösung, Kanamycinsulfat, Nystatin, Protamin (als Sulfat oder Hydrochlorid), Streptomycin und Dihydrostreptomycin wurde der Test in den Abschnitt Produktion verlegt, sodass bei Nachweis eines entsprechend validierten Herstellungsverfahrens, den der Hersteller gegenüber der Behörde zu erbringen hat, auf den Test verzichtet werden kann.

Wie viele Tests auf anomale Toxizität im Rahmen der Produktion dieser Wirkstoffe tatsächlich noch durchgeführt werden, konnte nicht exakt in Erfahrung gebracht werden. Auch konnte aufgrund unvollständigen Rücklaufes der Frage-

bogen von den Herstellern der betreffenden Arzneimittel nicht eindeutig geklärt werden, wie oft allein aufgrund der Prüfung auf anomale Toxizität Produktionschargen auffällig geworden sind oder gar verworfen werden mussten. Die erhaltenen Antworten deuten aber an, dass eine Beanstandung der Chargen nur aufgrund der Befunde dieses Testes – wenn überhaupt – wohl äußerst selten vorkommt. Darüber hinaus ist die Anzahl der positiven Testergebnisse äußerst selten und diese werden fast nie im Wiederholungstest bestätigt. Es gibt Hinweise darauf, dass der Test von den Produzenten der betreffenden Arzneimitteln nicht mehr für sinnvoll angesehen wird, er aber trotzdem weiterhin durchgeführt wird, um die Anforderungen an die Sicherheitskriterien in allen Ländern erfüllen zu können.

Die Prüfung auf Histamin ist bei den Wirkstoffen in den Monographien vorgesehen, die aus Histidin- oder Histaminreichen Geweben gewonnen werden. Dies trifft für Aprotinin, Trypsin und Chymotrypsin zu. Seit 2001 ist der Test in den Abschnitt „Produktion“ überführt worden. Das bedeutet, wie zuvor bei der „anormalen Toxizität“ beschrieben, dass auf den Test verzichtet werden kann, wenn ein validiertes, behördlich akzeptiertes Herstellungsverfahren genutzt wird. Dies muss die Verunreinigung mit Histamin ausschließen bzw. begrenzen oder ein Verfahren enthalten, bei dem die Verunreinigung erkannt wird. Der Test selbst wird als *ex vivo* Untersuchung am isolierten Meerschweinchen-Darm durchgeführt. Dabei wird auf konzentrationsabhängige glatt-muskuläre Kontraktion der Prüfchargen im Vergleich zu einem Histamin-Standard geprüft. Anzumerken ist, dass dieser Test keineswegs Histamin-spezifisch ist. Für den Fall, dass die Untersuchung unklare Ergebnisse liefert (z.B. ungenügende Konzentrations-Wirkungs-Beziehung des Standards), muss der Test auf blutdrucksenkende Verunreinigungen an der narkotisierten Katze durchgeführt werden, der auf die Entdeckung von biogenen Aminen, einschließlich Histamin, als Verunreinigungen ausgelegt ist. Diese Prüfung war in den Monographien generell für Heparine, Kanamycin und Streptomycin vorgeschrieben und ist mittlerweile eben-

falls in den Abschnitt „Produktion“ überführt worden mit den oben beschriebenen Auflagen.

Die Antworten auf die Befragung der Hersteller hat ergeben, dass beide Tests noch durchgeführt werden. Andererseits sind Beanstandungen von Chargen, wenn sie überhaupt vorkommen, extrem selten. Dies ist durch die Einführung von „*Good Manufacturing Practice*“ (GMP) und deren zwingende Einhaltung durch die Hersteller pharmazeutischer Produkte auch nicht überraschend. Es fragt sich daher, ob die Bioassays aus heutiger Sicht noch befürwortet werden können, zumal sie keineswegs als spezifisch angesehen werden können. Immerhin wird in der Lebensmittelchemie auf Spuren von Fremdstoffen analysiert, wobei Histamin mittels Kapillarzonenelektrophorese (CZE) oder HPLC in Kombination mit Fluoreszenz- oder UV-Detektion in äußerst niedrigen Konzentrationen nachgewiesen werden kann. Auch andere spezifische und sensitive immunologische Techniken könnten sich für die Chargenprüfungen eignen (Stockemer, 1982; Busto et al., 1994; Liao et al., 1999; Mahendradatta et al., 1996; Serrar et al., 1995; Aygün et al., 1999; Draisci et al., 1998; Thomas und Wittmann, 2000). In eigenen Untersuchungen ist gezeigt worden, dass mittels CZE Histamin und Trypsin voneinander abgetrennt und in Konzentrationen detektiert werden können, die den Anforderungen der Monographien entsprechen (Miethe und Surmann, 2001). Ähnliches ließe sich sicher auch für die anderen biogenen Amine erarbeiten. Daraus ergibt sich, dass ein Ersatz der Tests auf Histamin und blutdrucksenkende Substanzen wissenschaftlich und technisch möglich erscheint und durch die herstellenden Firmen im Verbund mit den nationalen und internationalen Zulassungsbehörden und Arzneibuch-Kommissionen angestrebt werden sollte.

## 5 Diskussion

In dem Problemkreis Tierversuche im Rahmen der Qualitätssicherung von Arzneimitteln biologischen Ursprungs sind sowohl die Sicherheit der Anwendung als auch tierschutzrelevante Überlegun-

gen einzubeziehen. Es ist einleuchtend, dass aus ethischen und juristischen Gründen dem erstgenannten Aspekt höhere Priorität einzuräumen ist. Dies ist insbesondere dann unabweislich, wenn es keine Alternative gibt, welche die gleiche Sicherheit für den Patienten gewährleistet. Andererseits ist zu bedenken, dass die Einführung und die behördlich überwachte Einhaltung von Regeln des GMP die Qualität und die Konsistenz der Produktion entscheidend verbessert haben, sodass sich allein daraus neue Überlegungen ergeben können. Neuere technologische Möglichkeiten bei der Produktion von biologisch gewonnenen Arzneimitteln und in den physikalisch-chemischen Analysemethoden können in jedem Einzelfall Anlass geben, die Sinnfälligkeit der Bioassays zu überprüfen.

Tatsächlich ist die Anzahl der biologischen Tests, die für die Qualitätssicherung biologisch gewonnener Arzneimittel eingesetzt werden, in den letzten Jahren zurückgegangen. Bioassays werden jedoch noch weiterhin durchgeführt, soweit sie in den Monographien der Arzneibücher erwähnt sind. Dies haben auch unsere eigenen Recherchen ergeben. Welche konkreten Auswirkungen aber zum Beispiel die Verlegung von bestimmten Bioassays in den Abschnitt „Produktion“ hatte, ließ sich nicht mit genügender Genauigkeit aus Antworten unserer Befragungen ermitteln. Überhaupt war der Rücklauf von den Herstellern zu unseren Anfragen nicht so erschöpfend, wie wir uns dies erhofft hatten. Dadurch mag manche Aussage – zum Beispiel hinsichtlich der Häufigkeit der noch durchgeführten Bioassays für die Sicherheitsuntersuchung – etwas eingeschränkt sein. Andererseits konnten doch klare Tendenzen erkannt werden. Die Tatsache, dass unsere Anfragen manchmal überhaupt nicht oder recht zögerlich – zum Beispiel nach mehrmaligem Anschreiben oder Rückfragen – beantwortet wurden, kann mehrere Gründe haben. Man muss sich darüber im Klaren sein, dass eine nicht-behördliche Anfrage unsanktioniert ohne Resonanz bleiben oder ausweichend beantwortet werden kann. Obwohl Vertraulichkeit zugesichert war, mögen manche Hersteller Anfragen mit Miss-

trauen begegnet sein, weil die Firmen möglicherweise unkalkulierbare Auswirkungen befürchteten. Auffallend war jedenfalls, dass manche Firma, welche die betreffenden Arzneimittel (produziert und) vertreibt, zunächst nicht korrekt erklärte, dass in ihrem Unternehmen keine Bioassays oder Tierversuche im Rahmen der Qualitätssicherung durchgeführt würden. Es mag sein, dass die Antworten nicht immer dem Stand der Dinge entsprachen, weil die Produktion und deren Kontrollinstrumente an verschiedenen Standorten lokalisiert sein können oder durch Auftragsvergabe an andere Dienstleister die Gesamtsituation nicht übersehen werden konnte. Diverse Gespräche haben allerdings manches klarer werden lassen. Man könnte erwarten, dass eine behördliche Anfrage mehr erschöpfend und repräsentative Antworten ergeben würde, zum Beispiel in welchem Umfang noch Bioassays auf anomale Toxizität, Histamin und/oder blutdrucksenkende Substanzen durchgeführt werden, nachdem diese Tests weitgehend in die Abteilung „Produktion“ der Monographie verlagert worden sind. Auch könnte erwartet werden, dass durch solche offiziellen Anfragen eindeutiger Antworten zu erlangen sind, ob allein durch den Bioassay Verunreinigungen in den Produktionschargen identifiziert werden konnten.

Der Ersatz von Bioassays stellt ein komplexes Thema dar, bei welchem eine Reihe von Aspekten zu berücksichtigen sind, unter anderem ethische und juristische, die sich durchaus nicht immer gleichsinnig auswirken. Zudem sind mehrere Parteien involviert, nämlich die Hersteller pharmazeutischer Produkte, Zulassungsbehörden und diverse Kommissionen, zum Beispiel diejenigen, welche für die Verfassung der Monographien in den Arzneibüchern zuständig sind. Dabei stellt sich die Frage, welche Institution die Initiative ergreifen sollte. Möglicherweise wird eher auf Bioassays verzichtet werden, wenn die Initiative hierzu von behördlichen Stellen oder von den Herstellern pharmazeutischer Produkte. Die entsprechenden Aktivitäten müssen dann aber in eine konzertierte Aktion aller beteiligten Institutionen münden, um Konsens von allen Seiten zu erhalten.

Ein Erfolg im Sinne einer Reduzierung von Tierversuchen im Rahmen der Qualitätskontrolle kann zudem nur erwartet werden, wenn für die betreffenden Wirkstoffe neue, international akzeptierte, Prüfmethode gefunden werden.

Durch Kontakte, die sich im Rahmen unserer Recherchen ergeben haben, ist uns bewusst geworden, dass zwar in einigen Fällen das Beharren auf geltenden Regelungen nicht zu unterschätzen ist, weil möglicherweise jede angestrebte Veränderung gerade in dem komplexen Umfeld schwierig zu erreichen ist und zumindest am Anfang einer solchen Aktivität der Erfolg nicht sicher vorauszusehen ist. Andererseits gibt es bei allen beteiligten Institutionen Personen, die Verständnis dafür haben, Bioassays abzulösen, und die sogar aktiv an diesem Problem arbeiten. Sicher wird ein Verzicht auf Bioassays nur zu erreichen sein, soweit dieser wissenschaftlich vertretbar ist und die Bioassays dann aus den Monographien der Arzneibücher – und zwar international – gestrichen werden. Durch den Handel von Produkten über nationale Grenzen hinweg, würden nationale Alleingänge nur begrenzten Erfolg haben, deswegen müssen international akzeptierte Regelungen gefunden werden. Aus diesem Grund wäre der Problembereich durchaus ein Thema, welches die *International Conference on Harmonization (ICH)* aufgreifen könnte.

## Literatur

- Anonymus (1999). Beschluss (1999/575/EG) des Rates vom 23. März 1998 über den Anschluss des Europäischen Übereinkommens zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Wirbeltiere durch die Gemeinschaft (ABI. Nr. L 222 vom 24.8.1999, S. 37).
- Anonymus (2000). *Deutsches Arzneibuch*. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag.
- Anonymus (2001). Streichung des Tests auf anomale Toxizität für Impfstoffe. In Bundesministerium für Bildung und Forschung, Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft, Bundesministerium für Gesundheit, Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (Hrsg.), *Hightech statt Tiere* (40-42). Germany: BMBF Publik.
- Aygün, Q., Schneider, E., Scheuer R. et al. (1990). Comparison of ELISA and HPLC for the determination of histamine in cheese. *Journal of Agriculture, Food and Chemistry* 47, 1961-1964.
- Bristow, A. and Charton, E. (1999). Assessment of the suitability of a capillary zone electrophoresis method for determining isoform distribution of erythropoietin. *Pharmeuropa* 11, 290-300.
- Buck, R. H., Cholewinski, M. and Maxl, F. (1991). Animal test or chromatography? Validated high-performance liquid chromatographic assays as an alternative to the biological assay for ornipressin. *Journal of Chromatography* 548, 335-341.
- Busto, O., Valero, Y., Guasch, J. and Borrull, F. (1994). Solid phase extraction applied to the determination of biogenic amines in wines by HPLC. *Chromatographia* 38, 571-578.
- Charton, E. (1999). Annual report of activities. *Pharmeuropa* 11, 197-199.
- Charton, E. and Castle, P. (2001). Reduction, replacement and refinement of animal tests in the European Pharmacopoeia: recent developments for the monographs on biological substances and preparations. *Pharmaeuropa* 13, 94-96.
- Council of Europe (1997). *European Pharmacopoeia*, 3<sup>rd</sup> edition, inclusive Suppl. 1998-2001. Strasbourg: Council of Europe.
- Draisci, R., Volpe, G., Lucentini, L. et al. (1998). Determination of biogenic amines with an electrochemical biosensor and its application to salted anchovies. *Food Chemistry* 61, 225-232.
- Hartung, T., Aaberge, I., Berthold, S. et al. (2001). Novel pyrogen tests based on the human fever reaction. The report and recommendations of ECVAM workshop 43. *ATLA* 29, 99-123.
- Hirth, P., Wieczorek, L. and Scigalla, P. (1988). Molecular biology of erythropoietin. *Contributions to Nephrology* 66, 38-53.
- Inouye, K., Watanabe, K. and Konaka, R. (1985). Separation of synthetic analogs of peptide hormones. In W. S. Hancock (ed.), *CRC Handbook of HPLC for the Separation of Amino Acids, Peptides and Proteins* (Vol. 2, 111-123). Boca Raton: CRC Press.
- Krummen, K. and Frei, R. W. (1977). Quantitative analysis of nonapeptides in pharmaceutical dosage forms by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 132, 429-436.
- Lehmann, H. D., Hupe, J. and Seemann, D. (1993). Wege zum Ersatz von Tierversuchen für die Wirkwertbestimmung von Herzglycosid-Gemischen. In H. Schöffl, H. Spielmann, F. P. Gruber, B. Koidl und Ch. Reinhardt (Hrsg.), *Alternativen zu Tierversuchen in Ausbildung, Qualitätskontrolle und Herz-Kreislauf-Forschung* (121-125). Wien: Springer Verlag.
- Liao, W., Paek, H., Mabuni, C. et al. (1990). Use of capillary electrophoresis with UV detection as a screening method to determine histamine in fish samples. *Journal of Chromatography A* 853, 541-544.
- Mahendradatta, M. und Schwedt, G. (1996). Histaminbestimmung in Lebensmitteln mittels Kapillarelektrophorese und HPLC im Vergleich. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 92, 218-221.
- Maxl, F. and Siehr, W. (1989). The use of high-performance liquid chromatography in the quality control of oxytocin, vasopressin and synthetic analogues. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 7, 211-216.
- Miethe, G. and Surmann, J. P. (2001). Determination of histamine in trypsin by capillary zone electrophoresis: a possible alternative to the bioassay? *Die Pharmazie* 6, 461-464.
- Miethe, G. (2002). Possibilities of replacing and reducing animal tests in the pharmacopoeias: an evaluation of unused methods and proposals for change. *ATLA* 30, 229-240.
- O'Hare, M. J. and Nice, E. C. (1979). Hydrophobic high-performance liquid chromatography of hormonal polypeptides and proteins on alkylsilane-bonded silica. *Journal of Chromatography* 171, 209-226.
- Rao, P. S., Weinstein, G. S., Wilson, D. W. et al. (1991). Isocratic high-perfor-



- mance liquid chromatography-photodiodearray detection method for determination of lysine- and arginine-vasopressins and oxytocin in biological samples. *Journal of Chromatography* 536, 137-142.
- Ronneberger, R. (1993). Methoden zur Reduktion des Tierversuchs bei der Entwicklung und Qualitätskontrolle von biologischen Arzneimitteln. In H. Schöffl, H. Spielmann, F. P. Gruber, B. Koidl und Ch. Reinhardt (Hrsg.), *Alternativen zu Tierversuchen in Ausbildung, Qualitätskontrolle und Herz-Kreislauf-Forschung* (169-173). Wien: Springer Verlag.
- Schwaning, M., Nagel, M., Duchow, K. and Krämer, B. (1997). Elimination of abnormal toxicity test for sera and certain vaccines in the European Pharmacopoeia. *Vaccine* 15, 1047-1048.
- Serrar, D., Brebant, R., Bruneau, S. and Denoyel, G. A. (1995). The development of a monoclonal antibody-based ELISA for the determination of histamine in food: application to fishery products and comparison with the HPLC assay. *Food Chemistry* 54, 85-91.
- Spielmann, H., Grune, B., Ott, T. et al. (1998). Möglichkeiten des Einsatzes von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch bei der Entwicklung und Zulassung von Arzneimitteln. *Bundesgesundheitsblatt Sonderdruck* 41, 422-429.
- Stockemer, J. (1982). Bestimmung der Aminosäuren und biogenen Amine in der dunklen und hellen Muskulatur des Thunfisches mittels Aminosäureanalyser und Hochdruckflüssigkeitschromatographie. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 174, 108-113.
- Stöcker, S. (1996). *Pressemitteilung PEI* (Referat A/1). Langen: Paul-Ehrlich Institute. Website [http://www.pei.de/pm/19962/2\\_96.htm](http://www.pei.de/pm/19962/2_96.htm). (Accessed 2.2.02).
- Storring, P. L., Witthaus, G., Gaines Das, R. E. and Stamm, W. (1984). The international reference preparation of tetracosactide for bioassay: characterisation and estimation of its (1-24)-corticotrophin-tetracosapeptide content by physicochemical and biological methods. *Journal of Endocrinology* 100, 51-60.
- Takeuchi, M., Inoue, N., Strickland, T. W. et al. (1989). Relationship between sugar chain structure and biological activity of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 86, 7819-7822.
- Thomas, K. und Wittmann, C. (2000). Schnelltest zur Bestimmung biogener Amine in Lebensmitteln. *Bioforum* 4, 219.
- USP (2000). United States Pharmacopoeial Convention NF 14, Rockville, MD, USA.
- Watson, E. and Yao, F. (1993). Capillary electrophoretic separation of human recombinant erythropoietin (r-HuEPO) glycoforms. *Analytical Biochemistry* 210, 389-393.

### Danksagung

Die Autoren bedanken sich für mannigfaltige Hilfe und Unterstützung, die sie im Rahmen der beschriebenen Untersuchungen erfahren haben bei Prof. H. Spielmann, Dr. B. Grune-Wolff, A. Dörendahl, S. Skolik (alle ZEBET); Dr. E. Charton, Dr. A. Artiges (alle EDQM); der Abteilung Biotechnologie der Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, diversen pharmazeutischen Firmen sowie M. Hillenbrand (Verband der Chemischen Industrie) und Dr. A. Schlitt (SET).

### Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Gisbert Sponer  
c/o Stiftung SET  
Kaiserstraße 60  
D-55116 Mainz  
Tel.: +49-6131-237789  
Fax: +41-6131-235698  
<http://www.tierversuche-ersatz.de/home.html>