

Förderung von Ersatzmethoden durch das EDQM und das Biologische Standardisierungs-Programm

Karl-Heinz Buchheit

European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM), Council of Europe, F-Strasbourg

Zusammenfassung

Die Qualitätsprüfung von Biologika (z.B. Impfstoffe und Seren) wird, wegen der Komplexität der Zusammensetzung und Wirkungsweise, aber auch wegen des Fehlens geeigneter Charakterisierungsmethoden, noch immer in vielen Fällen im Tierversuch durchgeführt. Die Prüfung erfolgt meistens im Vergleich mit einer Referenzpräparation. In Europa sind die Prüfvorschriften für Biologika in der Europäischen Pharmakopöe zusammengefasst, welche im Auftrag der Mitgliedsstaaten durch das European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM) in Strassburg herausgegeben wird. Daneben ist das EDQM auch für die Organisation des Biologischen Standardisierungs-Programms und des Netzes der nationalen Kontrolllaboratorien (Official Medicines Control Laboratories, OMCL) zuständig. Das Biologische Standardisierungs-Programm hat die Zielsetzung, europa-weit anerkannte, biologische Referenzpräparationen zu erarbeiten und die Standardisierung der Prüfmethoden voranzutreiben, mit dem expliziten Ziel, wann immer möglich, Ersatzmethoden zu etablieren. Diese Zusammenfassung beschreibt, was das EDQM über die Europäische Pharmakopöe, das Biologische Standardisierungs-Programm und das OMCL-Netz zum 3R-Konzept beitragen kann, und gibt Beispiele für die erfolgreiche Umsetzung des Konzeptes.

Summary: Development of alternative methods by the EDQM and the Biological Standardisation Programme

Due to the complexity of their composition and mode of action and because of the absence of adequate alternative methods the quality control of biologicals (e.g. vaccines, sera) continues to be performed to a large extent in animal experiments. In most cases, the properties of the compounds are compared to those of a reference preparation. For Europe, the specifications for the biologicals are listed in the European Pharmacopoeia, which is published by the European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM) in Strasbourg, on behalf of the member states. The EDQM is also in charge of the organisation of the Biological Standardisation Programme and the network of the national control laboratories (Official Medicines Control Laboratories, OMCL). The Biological Standardisation Programme pursues the goal to establish common European reference preparations and to standardise the methods used for the quality control of biologicals with the explicit goal to develop alternative methods whenever possible. This survey describes how the EDQM via the European Pharmacopoeia, the Biological Standardisation Programme and the OMCL network, supports the 3R concept and shows examples of its successful application.

Keywords: 3R, Reduction, Refinement, EDQM, Biological Standardisation Programme, OMCL Network, European Pharmacopoeia, Biological Reference Preparations

1 Einleitung

Die sogenannten Biologika, z.B. Seren, Impfstoffe oder Blutprodukte, sind Arzneimittel mit oft komplexer Struktur, die unter Beteiligung von menschlichen oder tierischen Zellen oder aus menschlichen oder tierischen Bestandteilen produziert werden. Sie werfen hinsichtlich ihrer Qualitätskontrolle eine Reihe von Problemen auf, die bei niedermolekularen Arzneimitteln nicht auftreten. So kann z.B. meistens nicht unbedingt aus der Konzentration eines Impfstoffes in einer Präparation auf dessen Wirkungsstärke geschlossen werden. Aus diesem Grund werden noch immer wichtige Qualitäts-

parameter (z.B. Wirksamkeit oder Sicherheit) im Tierversuch überprüft. Bei den Impfstoffen geht das oft mit einer Infektion des Tieres durch den Erreger, gegen den der Impfstoff schützen soll, einher, ein Versuch, der für das Tier sehr belastend ist. Auch im Hinblick auf den breiten Einsatz dieser Biologika und der daraus resultierenden Häufigkeit dieser Prüfungen besteht dringend Handlungsbedarf zur konsequenten Umsetzung des 3R-Konzeptes bei der Qualitätskontrolle von Biologika.

In der Regel sind die Vorschriften und Methoden für die Qualitätskontrolle in den Arzneibüchern (Pharmakopöen) zusammengefasst. Somit ist es geboten, zu

überprüfen wo und wie in diesen das 3R-Konzept realisiert werden kann. Für Europa ist das Europäische Arzneibuch (Europäische Pharmakopöe, *Ph. Eur.*) massgebend. Die *Ph. Eur.* wird vom EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines) publiziert. Da dem EDQM auch noch andere wichtige Aufgaben zufallen, die auf dem Gebiet der Qualitätskontrolle von Arzneimitteln wesentlich zur Umsetzung des 3R-Konzeptes beitragen können, spielen die *Ph. Eur.* und das EDQM in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle. In dieser Übersicht soll deshalb die Arbeit des EDQM und seiner Teile sowie ihre Bedeutung für das 3R-Konzept beleuchtet werden.

Diese Zusammenfassung betrachtet daher

- 1) Status, Organisation und Aufgaben des EDQM,
- 2) die Möglichkeiten des EDQM im Hinblick auf das 3R-Konzept, und
- 3) die Ergebnisse der Arbeit des EDQM in diesem Rahmen.

2 EDQM

2.1 Status, Organisation, Aufgaben

Das EDQM stellt ein Direktorat des Europarates dar, der ältesten europäischen Institution; es hat seinen Sitz in Strassburg. Das EDQM ist somit eine zwischenstaatliche Organisation, die 1964 auf der Basis der Europäischen Pharmakopöe Konvention gegründet wurde. Der zwischenstaatliche Charakter der Organisation hat eine wichtige Konsequenz, das Prinzip der Einstimmigkeit bei den Entscheidungen. Es bedeutet, dass alle Entschiede bezüglich der Pharmakopöe einstimmig gefasst werden müssen, was einerseits Kompromisslösungen erfordert, andererseits aber für die Akzeptanz und Umsetzung der Entscheidungen von grösster Bedeutung ist.

Gegenwärtig haben 28 europäische Staaten (darunter alle Staaten der Europäischen Union) sowie die Europäische Kommission die Pharmakopöe-Konvention unterzeichnet und haben als Vollmitglieder alle Rechte und Pflichten, die sich daraus ergeben. Siebzehn Länder, darunter auch wichtige aussereuropäische Staaten wie Australien, China, Kanada sowie einige Mittelmeer-Anrainerstaaten und die Weltgesundheitsorganisation (WHO) haben Beobachterstatus. Das bedeutet, dass sie an der *Ph. Eur.* mitarbeiten und die *Ph. Eur.* als offizielles Arzneibuch anerkennen können, aber nicht müssen.

Die Hauptaufgabe des EDQM besteht:

- a) in der Harmonisierung der Qualitätsstandards für Arzneimittel in Europa, b) im Schutz der öffentlichen Gesundheit und c) in der Förderung des freien Verkehrs von Arzneimitteln in Europa. Diesen Aufgaben kommt das EDQM durch die Herausgabe der *Ph. Eur.* sowie durch die Organisation des Biologischen Standardisierungs-Programms und des OMCL-Netzes nach. Die beiden letztgenannten Aufgaben stellen eine Erweiterung des ursprünglichen Aufgabenbereiches dar.

2.2 Die Europäische Pharmakopöe (*Ph. Eur.*)

Die *Ph. Eur.* ist die einzige offizielle Pharmakopöe im Bereich der Europäischen Union; die Europäische Kommission erkennt nur die *Ph. Eur.* nicht aber die nationalen Arzneibücher an, sofern es um europäische Belange geht. In den Mitgliedsstaaten ersetzt die *Ph. Eur.* die nationalen Normen. In der *Ph. Eur.* sind zur Zeit etwa 1500 Qualitätsstandards in den sogenannten Monographien zusammengefasst. Daneben enthält die *Ph. Eur.* allgemeine Analysenmethoden sowie chemische und biologische Referenzmaterialien. Die *Ph. Eur.* ist offizieller Standard in den EU Mitgliedsländern. Sie erscheint alle 5 Jahre in vollständiger Form; jedes Jahr wird ein kumulativer Ergänzungsband mit allen Neuerungen seit der letzten Auflage veröffentlicht. Die vierte, vollständige Ausgabe wird 2001 publiziert und wird am 1.1.2002 rechtskräftig.

Die Monographien der *Ph. Eur.* spiegeln die breite Palette von Materialien wider, die auf dem Arzneimittelmarkt benötigt werden: z.B. Wirkstoffe, soweit es sich um chemisch definierte Substanzen handelt, Hilfsstoffe, Arzneimittel pflanzlicher Herkunft, Seren und Impfstoffe für Menschen und Tiere, Blutprodukte, Biotechnologieprodukte (z.B. Erythropoetin), Radiopharmazeutika. Die *Ph. Eur.* ist damit von fundamentaler Bedeutung für alle, die in die Herstellung oder Prüfung von Arzneimitteln involviert sind, z.B. Arzneimittelhersteller, Lizenzierungsbehörden, nationale Kontrollbehörden und -labors oder Zulieferer der pharmazeutischen Industrie.

Die Arbeitsmethoden für die Erarbeitung der Monographien sind genau definiert. Die Europäische Pharmakopöe Kommission, das oberste Gremium der *Ph. Eur.*, bestehend aus den nationalen Delegationen, legt einstimmig Arbeitsprogramm und Arbeitsmethoden fest und entscheidet über die Annahme von Monographien oder Standards. Daneben gibt es die Expertengruppen, die die Monographien und Methoden erarbeiten und auch überprüfen. Für die Belange der biologischen Standardisierung sind die Experten-Gruppen 6 (Biologika, z.B. Insulin), 6B (Blutprodukte), 15 (Humansen und -Impfstoffe) und 15V (Seren und Impfstoffe für Tiere) zuständig. Das EDQM begleitet und koordiniert die Aktivitäten als Sekretariat der *Ph. Eur.* Kommission.

2.3. Zusätzliche Aufgaben des EDQM

Seit 1992 besteht das Biologische Standardisierungs-Programm (BSP), das auf einem Vertrag zwischen der Europäischen Kommission und dem Europarat basiert und von beiden Institutionen finanziert wird. Daneben wurde 1995 das OMCL (*Official Medicines Control Laboratories*)-Netz ins Leben gerufen und ständig ausgebaut. In beiden Fällen ist das EDQM für die Koordination und Umsetzung der Aufgaben verantwortlich.

2.3.1 Das Biologische Standardisierungs-Programm (BSP)

Das BSP hat die Aufgabe, europäische Standards für Biologika auszuarbeiten, sowie die Standardisierung von Methoden zur Qualitätsprüfung von Biologika voranzutreiben. Insbesondere ist es die Aufgabe des BSP, in diesem Rahmen das 3R-Konzept umzusetzen. Zu diesem Zweck werden auch Referenzmaterialien für Ersatzmethoden (z.B. Antiseren) entwickelt.

Es gehört zu den Prinzipien des BSP - wann immer möglich - die Arbeit nicht nur auf Europa zu beschränken, sondern mit der WHO (*World Health Organisation*) sowie der amerikanischen FDA (*Food and Drug Administration*) und japanischen Gesundheitsbehörden zusammenzuarbeiten, um gemeinsame Standards und Methoden zu entwickeln. Auf diese Weise wirken alle Bemühungen zur Umsetzung des 3R-Konzeptes in der Qualitätssicherung von Biologika über die Grenzen von Europa hinaus, was angesichts der fortschreitenden Globalisierung des Arzneimittelmarktes auch sinnvoll ist.

Das Arbeitsprogramm des BSP wird von einem international besetzten *Steering Committee* festgelegt. Dieses bestimmt, welche Methoden und Standards in Angriff genommen werden, wo die grösste Notwendigkeit besteht und wo es berechnete Aussichten auf Erfolg gibt. Vorschläge für die Entwicklung von Ersatzmethoden von externen Partnern, z.B. OMCLs oder akademischen Institutionen, werden vom EDQM auf ihre Durchführbarkeit geprüft. Das *Steering Committee* entscheidet schliesslich über die Aufnahme ins Arbeitsprogramm. Daraufhin organisiert das EDQM mit einem meist externen *Project Leader* eine Ring-Studie, zu der alle relevanten Partner ein-

geladen werden. Die Ergebnisse der Studie werden in einem wissenschaftlichen Bericht zusammengefasst und der zuständigen Expertengruppe sowie anschließend der *Ph. Eur.* Kommission vorgelegt. Letztlich führen diese Ergebnisse zu der Annahme eines Standards oder der Änderung der betreffenden Monographie und damit zur Umsetzung des 3R-Konzepts.

2.3.2. Das OMCL-Netz

Eine weitere Aufgabe des EDQM besteht in der Organisation des OMCL-Netzes, dessen einzelne Glieder die nationalen OMCLs sind, die – zumindest im Bereich der EU – die Chargenfreigabe für Biologika durchführen. Das EDQM unterstützt in diesem Netz die Massnahmen zur Qualitätssicherung und führt z.B. *Proficiency Testing Scheme* (PTS) Studien durch, bei denen die einzelnen OMCLs die fachgerechte Durchführung von Qualitätsprüfungen dokumentieren. Diese Massnahmen sind von ausserordentlicher Bedeutung für die gegenseitige Anerkennung von Prüfergebnissen innerhalb des OMCL-Netzes. Daneben organisiert das EDQM den Informationsaustausch in diesem Netz und – zusammen mit der europäischen Zulassungsbehörde EMEA - *Market Surveillance* Studien, um für Arzneimittel, die von EMEA zentral für Europa zugelassen wurden, die Qualität auf dem Markt zu überwachen.

3 Umsetzung des 3R-Konzepts durch das EDQM

In diesem Abschnitt wird beleuchtet, wie das EDQM in den drei Aufgabengebieten, der *Ph. Eur.*, dem BSP und dem OMCL-Netz, das 3R-Konzept umsetzt. Der Europarat, zu dem das EDQM gehört, hat im Bereich des Tierschutzes mit der „*European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes*“ (1986) einen wichtigen Beitrag zum Tierschutz geleistet. Auf dieser Grundlage basieren alle diesbezüglichen Bemühungen des EDQM.

3.1. Umsetzung des 3R-Konzepts durch die *Ph. Eur.*

Prinzipiell birgt eine Sammlung von Standards, wie sie auch die *Ph. Eur.* darstellt, wenn sie nicht ständig überarbeitet und auf

den Stand der Technik gebracht wird, die Gefahr, den *Status quo* festzuschreiben und rechtlich zu zementieren. Dies kann den Fortschritt auf dem Gebiet der Ersatzmethoden verhindern. Deshalb hat sich die *Ph. Eur.* Kommission das Ziel gesetzt, das 3R-Konzept immer anzuwenden, ausser wenn es für die öffentliche Gesundheit mit einem Risiko verbunden wäre.

Es gibt eine Reihe von Monographien der *Ph. Eur.*, die unter dieser Zielvorgabe geändert wurden: So wurde bei den Impfstoffen – in den meisten Fällen zumindest – die Prüfung auf anomale Toxizität gestrichen. Diese Prüfung wurde an Mäusen oder Meerschweinchen durchgeführt. Anomale Toxizität wurde beim Tod der Tiere konstatiert. Weiterhin wurde der Test auf Pyrogene am Kaninchen in vielen Monographien durch den Limulustest auf Endotoxine ersetzt. Die Prüfung auf lebende Mykobakterien an Meerschweinchen wurde durch einen *in vitro* Test ersetzt. Die Gehaltsbestimmung für Hormone (z.B. Insulin, Oxytozin, Kalzitronin, Somatropin) am Tier wurde durch physikochemische Methoden ersetzt.

3.2. Beitrag der Standardisierung von Biologika zum 3R-Konzept

Der Vorteil der europaweiten Gültigkeit von Standards für das Konzept des Tierschutzes ist bedeutend; das gilt sowohl für die Standardisierung von Methoden als auch für die Festlegung von Referenzpräparationen. Gäbe es diese Standards nicht, so würde jedes Land und jeder Arzneimittel-Hersteller seine eigenen Standards wählen, und die Qualitätsprüfung müsste beim Export eines betreffenden Arzneimittels in ein anderes Land wiederholt werden. Noch sinnvoller ist unter diesem Gesichtspunkt die Entwicklung überregionaler Standards und Methoden, was das EDQM zu realisieren versucht, wann immer es möglich ist. So wird momentan im Rahmen des BSP mit der FDA ein Standard für den Gerinnungs-Faktor VIII entwickelt. Dieser Standard wird dann nicht nur in Europa, sondern auch in den USA, Südamerika und in vielen asiatischen Staaten gültig sein. Viele dieser Bemühungen zur Schaffung überregionaler Standards werden im Rahmen der internationalen Harmonisierungsmassnahmen ICH und VICH zwischen Europa, USA und Japan durchgeführt.

3.3. Ersatzmethoden

Die Entwicklung von Ersatzmethoden nimmt einen zentralen Platz im Arbeitsprogramm des BSP ein. Dies ist der schwierigste Teil der Aufgaben, insbesondere, wenn eine *in vivo* durch eine *in vitro* Methode ersetzt werden soll. In jedem Fall muss die Sicherheit der Produkte gewährleistet sein, was eine sorgfältige Validierung der Ersatzmethoden bedingt.

Ein Beispiel kann das verdeutlichen. Bei der Inaktivierung von Virus-Impfstoffen durch Formaldehyd entstehen zuweilen Impfstoffe, die durch *in vitro* Methoden (z.B. immunochemische Methoden) noch als wirksam detektiert werden, aber tatsächlich keinen Schutz vor dem Erreger mehr gewährleisten. Es muss also in jedem Fall sichergestellt werden, dass solche Stoffe von einem *in vitro* Testsystem auch als nicht wirksam erkannt werden.

Beispiele für Ersatzmethoden im Bereich der Impfstoffe, die zur Zeit im Rahmen des BSP erarbeitet werden, sind ein Test zur Bestimmung der Wirkungsstärke von Diphtherie-Impfstoffen an Vero-Zellen und eine immunochemische Methode für adsorbierte Human-Tetanus Impfstoffe.

3.4. Beiträge des OMCL-Netzes zum 3R-Konzept

Innerhalb des OMCL-Netzes werden gegenseitig anerkannte Richtlinien für die Chargen-Freigabe erstellt. Bei den Prüfungen zur Chargenfreigabe von Biologika werden noch immer sehr viele Tiere verwendet, und folglich kann durch Modifikation dieser Richtlinien sehr viel zur Einsparung von Tierversuchen beigetragen werden. So versucht man momentan innerhalb des OMCL-Netzes eine einheitliche Richtlinie für die Chargenfreigabe der immer beliebter werdenden Kombinationsimpfstoffe zu erarbeiten, um zu vermeiden, dass bei jeder neuen Kombination der Bestandteile alle Komponenten neu geprüft werden müssen.

Darüber hinaus wird im OMCL-Netz die Freigabe der Chargen gegenseitig anerkannt. Was in einem Land geprüft worden ist, darf nicht in einem anderen Land nochmals untersucht werden, was viele Tierversuche erspart. Schliesslich werden alle relevanten Ergebnisse und Informationen ausgetauscht, und die Notwendigkeit jedes Tests wird ständig überprüft. Auch dadurch werden viele Tierversuche vermieden.

4 Ergebnisse der Arbeit des BSP

In diesem Abschnitt soll auszugsweise über die Ergebnisse der Arbeit des BSP berichtet werden, d.h. über die laufenden Projekte sowie die bereits etablierten Standards und Methoden.

Momentan laufen Projekte zur Etablierung von Standards für Pertussis Toxin und Human-Tetanus Impfstoff. In einem weiteren Projekt wird ein ELISA *Coating* Antigen etabliert, das für die immunochemische Bestimmung von Rotlauf-Antikörpern im Rahmen der Chargenprüfung von Rotlauf-Impfstoffen dienen wird. Des weiteren wird zur Zeit versucht, verschiedene Mycoplasma Referenz-Stämme und – zusammen mit der FDA - einen neuen Standard für Gerinnungsfaktor VIII zu etablieren.

Auf dem Gebiet der Ersatzmethoden werden Projekte zur Etablierung einer Methode in Vero-Zellen zur Bestimmung von Diphtherie-Impfstoffen und eines serologischen Tests für Tetanus-Impfstoffe vorangetrieben. Weiterhin wird versucht, eine HPLC-Methode (*High Pressure Liquid Chromatography*) für die Chargenfreigabe von INF-alpha-Präparationen aufzubauen.

Seit seiner Gründung im Jahr 1992 wurden im Rahmen des BSP gemeinsam mit den nationalen OMCLs 30 Standards für Biologika etabliert, und zwar für die

Kategorien Seren und Impfstoffe (für den human- und veterinär-medizinischen Einsatz), Blutprodukte, Hormone, rekombinante Produkte und Erreger (z.B. Rotlauf und *Brucella melitensis*). Die vollständige Liste wird auf der EDQM-Homepage (www.pheur.org) veröffentlicht.

Seit 1992 wurden ebenfalls mit experimenteller Zuarbeit verschiedener nationaler OMCLs Methoden für die Chargenprüfung folgender Biologika entwickelt: Somatotropin, Gerinnungs-Faktor VIII, Mumps-Lebend-Impfstoff (Rubini Stamm), Hepatitis A Impfstoff (Ersatz einer *in vivo* Methode durch einen *in vitro* ELISA-Test), inaktivierter Polio-Impfstoff und adsorbierter Tetanus Impfstoff. Die Methoden wurden in dem vom EDQM herausgegebenen Journal „*Pharmeuropa-Bio*“ publiziert.

5 Ausblick

Prinzipiell gibt es auf dem Gebiet der Qualitätskontrolle von Biologika noch immer ein enormes Einsparungspotential für Tierversuche. Allerdings muss bei allen Schritten zur Umsetzung des 3R-Konzeptes die Sicherheit von Mensch und Tier im Auge behalten werden, umso mehr als z.B. Impfstoffe bei Gesunden und vorwiegend bei Kindern und Säuglingen sowie in der Veterinärmedizin in grossem Umfang zur Prophylaxe eingesetzt werden.

Abstriche an der Sicherheit dieser Arzneimittel darf es somit nicht geben.

Insgesamt, ist jedoch die Notwendigkeit zur Umsetzung des 3R-Konzeptes im Bewusstsein der verantwortlichen Personen und Behörden fest verankert, und es gibt eine Reihe von Schritten in die richtige Richtung. So versucht man z.B. für Impfstoffe, wo immer es möglich ist, von den Belastungstests zu immunochemischen Methoden zu gelangen, was einem „*refinement*“ der Versuche entspricht.

Generell kann erwartet werden, dass mit der Entwicklung neuer physikochemischer Methoden (z.B. NMR – *Nuclear Magnetic Resonance*) oder dem Einsatz neuer molekular-biologischer Arbeitsmethoden und mit der Entwicklung von hochspezifischen und hochreinen Biologika auch auf dem Gebiet dieser komplexen Arzneimittel in nicht allzu ferner Zukunft ein vollständiger Ersatz von Tierversuchen für die Qualitätskontrolle möglich sein wird.

Korrespondenzadresse

Dr. Karl-Heinz Buchheit
Division IV, European Directorate for the
Quality of Medicines (EDQM)
Council of Europe
B.P. 907
F-67029 Strasbourg Cedex 1
Tel.: +33-390-21 48 55
Fax: +33-388-41 27 71
E-mail: karl.buchheit@pheur.org