

Entwicklung eines neuen, aus permanenten Zellen gewonnenen Grippe-Impfstoffs

Otfried Kistner, Noel Barrett, Wolfgang Mundt, Manfred Reiter, Susanne Schober-Bendixen, Gerald Eder und Friedrich Dörner

Biomedical Research Center, Baxter Vaccine AG, A-Orth/Donau

Zusammenfassung

Die Vermehrung von Inflenzaviren für die Impfstoff-Produktion erfolgt normalerweise in bebrüteten Hühnereiern. Dieses Verfahren ist sehr aufwendig und mühsam; Millionen von Hühnereiern müssen einzeln infiziert und geerntet werden. Die Reinigung erfordert eine Reihe arbeitsintensiver Verfahrensschritte, um den Gehalt an kontaminierenden Ei-Proteinen gering zu halten. Der Mangel an bebrüteten Hühnereiern im Falle einer Pandemie, die Selektion von spezifischen Ei-Varianten und die Gefahr von kontaminierenden Viren zeigen die Notwendigkeit auf, Influenza-Impfstoffe in einer stabilen, gut charakterisierten Säugetier-Zelllinie herzustellen. Die von uns entwickelte absolute serumfreie Vero-Zelltechnologie konnte erfolgreich zur Vermehrung einer großen Anzahl von Influenzaviren adaptiert werden. Die Vermehrung von Influenza-Impfstämmen in 1200 Liter-Fermenterkulturen unter serumfreien Bedingungen führte zu Antigen-Ausbeuten, die mit denen aus bebrüteten Hühnereiern vergleichbar sind. Die Entwicklung eines schnellen und effizienten Reinigungsverfahrens resultierte in einem sicheren und sehr reinen Impfstoff, der in Mäusen mindestens genauso immunogen ist wie konventionelle Ei-Impfstoffe. Klinische Studien in Großbritannien, Polen und Österreich zeigten eine sehr hohe Immunogenität des Verozell-Influenza-Impfstoffs bei einer sehr guten Verträglichkeit.

Summary: Development of a novel influenza vaccine derived from a continuous cell line

Influenza viruses for production are presently produced in embryonated hen's eggs. This conventional standard methodology is extremely cumbersome; it requires millions of eggs and an extensive purification to reduce the amount of contaminating egg proteins. The shortage of eggs in a pandemic situation, the selection of egg-adapted variants and the presence of adventitious viruses has emphasised the necessity for production of Influenza vaccines on a well characterised stable cell line. Our established absolutely serum free Vero cell technology has been successfully adapted to large scale production of a huge variety of Influenza virus strains. The production in 1200 liter fermenter cultures under serum free conditions gave antigen yields comparable to the conventional embryonated egg technology. The development of a rapid and efficient purification scheme resulted in a safe high purity vaccine which was at least as immunogenic as conventional egg-derived vaccines in a mouse model. Clinical trials in the UK, Poland and Austria demonstrated that the Vero cell derived influenza vaccine is well tolerated, safe and highly immunogenic in humans.

Keywords: 3R, alternatives, continuous cell line, Vero, influenza vaccine, serum free

1 Einleitung

Die Vermehrung von Inflenzaviren für die Impfstoff-Produktion erfolgt normalerweise in bebrüteten Hühnereiern. Dieses Verfahren ist sehr aufwendig und mühsam: Millionen von Hühnereiern werden einzeln infiziert und nach einer Inkubationszeit von 2-3 Tagen werden die Influenzavirus-haltigen Allantoisflüssigkeiten der einzelnen Eier geerntet und gepoolt. Die Reinigung erfordert, um den Gehalt an Ei-Verunreinigungen möglichst gering zu halten, eine Reihe von Zentrifugations- und Filtrations-Schritten. Dieses Verfahren benötigt eine große Anzahl an arbeitsintensiven Schritten, die nicht oder nur schwer automatisierbar sind. Es ist nicht nur zeitaufwendig und kontaminationsanfällig, sondern hinterläßt auch sehr große Mengen an infektiösem Abfall. Die Beschaffung dieser riesigen Mengen an be-

brüteten Hühnereiern erfordert eine lange Vorplanung und große logistische Anstrengungen, verbunden mit der Gefahr von Engpässen bei der Versorgung, besonders im Falle einer Pandemie (Rowe 1995). Darüber hinaus gibt es eine wachsende Besorgnis über mögliche Kontaminationen mit Fremderregern, vor allem aviären Retroviren (Pettricciani, 1991).

Die Suche nach Alternativen zur konventionellen Vermehrung in bebrüteten Hühnereiern war bis jetzt wenig erfolgreich, da sich, im Gegensatz zum Ei, eine Reihe von Inflenzaviren nicht oder nur sehr schlecht in Zellkulturen vermehren ließen. In diesem Beitrag wird die erfolgreiche Adaptation und Umsetzung der im Forschungszentrum Orth/Donau entwickelten absoluten serum freien Vero-Zelltechnologie zur Vermehrung von Inflenzaviren beschrieben, die die Herstellung von sicheren Influenza-Impf-

stoffen im groß-industriellen Maßstab ermöglicht und somit eine echte Alternative zur konventionellen Herstellung in bebrüteten Hühnereiern darstellt.

2 Material und Methoden

Die Methoden sind hier nur kurz beschrieben; für eine detaillierte Beschreibung der Methoden wird auf Kistner et al. (1998) verwiesen.

2.1 Vermehrung von Inflenzaviren in Vero-Zellen

Die von der Weltgesundheits-Organisation (WHO) zertifizierte Vero Zell-Linie wurde zur Vermehrung einer Reihe von Inflenzaviren benutzt. Diese Zell-Linie ist voll charakterisiert und erfüllt alle regulatorisch vorgeschriebenen Anforderungen zur Herstellung von biologischen Produkten. Die

Vero-Zellen werden unter absolut serumfreien Bedingungen kultiviert, entweder als „Monolayer“-Kulturen in Roux- und Rollen-Flaschen oder als „Microcarrier“-Kulturen in Fermentern. Nach der Infektion der Kulturen mit Influenzaviren und einer Stunde Absorption werden 20mU/ml porcines Trypsin zur Aktivierung der Viren hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 2-3 Tagen bei 32°C wird der virushaltige Zellkultur-Überstand geerntet und der Virus-Titer mittels Hämagglutinations (HA)-Test bestimmt (Hirst, 1941).

2.2 Produktion von Influenzaviren im industriellen Groß-Maßstab

Eine einzelne Ampulle absolut serumfrei gezüchteter Vero-Zellen mit einer definierten Passage-Zahl wird aufgetaut und in Roux- und Roller-Flaschen passagiert, um eine ausreichende Anzahl von Zellen zur In-

okulation eines 12 Liter-Fermenters mit *Microcarriern* zu erhalten. Nach Erreichen von $1-3 \times 10^9$ Zellen pro Liter werden die Zellen abtrypsinisiert und zur Inokulation eines 150 Liter-Fermenters verwendet, dessen Zellen im nächsten Schritt für die Inokulation eines 1200 Liter-Fermenters verwendet werden. Nach Erreichen der optimalen Zelldichte wird die Fermenterkultur mit 1,2 Liter einer Influenzavirus-Suspension infiziert und wie in Kapitel 2.1. beschrieben inkubiert und geerntet.

2.3 Vermehrung von Influenzaviren in Eiern

Elf Tage alte embryonierte Hühnereier werden mit 0,2ml einer Influenzavirus-Suspension infiziert und 3 Tage bei 33°C inkubiert. Anschließend werden die Eier über Nacht bei 4°C abgekühlt und die virushaltige Allantoisflüssigkeit geerntet. Der Virus-Ti-

ter wird mittels HA-Test bestimmt (Hirst, 1941).

2.4 Bestimmung des spezifischen Hämagglutinin-Antigengehalts

Die Konzentration des Hämagglutinin-Antigengehalts in den verschiedenen Influenzaviren-Antigenpräparationen wird mittels „Single Radial Immunodiffusion“- (SRD)-Test bestimmt (Wood et al., 1977).

2.5 Serologische Analyse von Humanseren

Die Seren der Probanden der verschiedenen klinischen Studien wurden mittels Hämagglutinations-Inhibitions-(HAI)-Test gegen die korrespondierenden Influenzavirus-Impfstämme ausgetestet, wie in den CPMP (*Committee for Proprietary Medicinal Products*)-Guidelines beschrieben (CPMP, 1997).

2.6 Zusammensetzung des Impfstoffs

Trivalenter Impfstoff mit 0,5ml einer Suspension aus formalin-inaktivierten Influenzaviren mit je 15 µg Hämagglutinin zweier Influenza A- (Subtyp H1N1 und H3N2) und eines Influenza B-Stammes entsprechend den Empfehlungen der WHO für die jeweilige Influenza-Saison. Der Impfstoff ist wie die meisten lizenzierten Ei-Impfstoffe nicht adjuvantiert. Der Impfstoff wird ab der Saison 1999/2000 ohne Verwendung von Thiomersal hergestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Virusvermehrung in serumfreien Vero-Zellkulturen

Eine Reihe von Influenza A und B Virus-Stämmen wurden auf ihre Vermehrungsfähigkeit in serumfreien Vero-Zellkulturen untersucht. Vero-Zellkulturen wurden mit verschiedenen Influenzaviren infiziert, mit 100-ml serum- und proteinfreien Medium und 20mU/ml porcines Trypsin bei 32°C inkubiert und, wie in Kapitel 2.1. beschrieben, geerntet. Parallel wurden bebrütete Hühnereier mit den gleichen Viren infiziert (siehe Kapitel 2.3.) Die HA-Titer in serumfreien Vero-Zellkulturen und aus bebrüteten Hühnereiern sind in Tabelle 1 dargestellt. Alle untersuchten Influenzavirus-Stämme der Typen A, Subtypen H1N1, H2N2 und H3N2, und B einschließlich der Impfstämme der letzten Jahre erreichten einheitlich hohe HA-Titer zwischen 128 und 256 hämagglutinierenden Einheiten (HAU). Die

Tab. 1: Hämagglutinations-Titer verschiedener Influenzaviren in Serumfreien Vero Zellkulturen und bebrüteten Hühnereiern

Typ / Subtyp	Stamm	Hämagglutinierende Einheiten (HAU)		
		Vero	Ei	
A/H1N1	A/PR/8/34	256	1024	
	A/Brazil/11/78	128	1024	
	A/California/10/78	128	256	
	A/USSR/90/77	256	1024	
	A/Singapore/6/86	128	128	
	A/Taiwan/1/86	128	512	
	A/Texas/36/91	128	256	
	A/Bayern/7/95	256	128	
	A/Johannesburg/82/96	256	1024	
	A/Beijing/262/95	256	1024	
A/H2N2	A/New Caledonia/20/99	256	1024	
	A/Singapore/1/57	128	512	
	A/Hongkong/1/68	128	1024	
	A/Hongkong/5/83	128	256	
	A/Texas/1/77	128	256	
	A/Shanghai/16/85	256	128	
	A/Guizho/54/89	128	128	
	A/Beijing/535/89	256	256	
	A/Johannesburg/33/94	256	128	
	A/Wuhan/359/95	256	512	
A/H3N2	A/Nanchang/933/95	256	512	
	A/Sydney/5/97	256	1024	
	A/Moscow/10/99	128	128	
	A/Panama/2007/99	256	256	
	B	B/Massachusetts/71	128	512
		B/Yamataga/16/88	128	256
		B/Panama/45/90	128	256
		B/Harbin/7/94	256	512
		B/Shangdong/7/97	128	256
		B/Yamanashi/166/98	256	512

HA-Titer der Allantoisflüssigkeiten erreichten oft höhere Werte, schwankten aber je nach Stamm zwischen 128 und 1024 HAU. Die Ausbeuten in Vero-Zellkulturen waren aber in jedem Fall höher: 100 ml Zellkulturüberstand stehen 5–10 ml Allantoisflüssigkeit aus einem infizierten Ei gegenüber.

3.2 Entwicklung eines Herstellungsschemas für die Produktion im groß-industriellen Maßstab

Aufbauend auf der Adaption der serum- und proteinfreien Vero-Zelltechnologie für die erfolgreiche Vermehrung von Influenzaviren im 1200 Liter-Maßstab wurde ein Herstellungsschema zur Herstellung eines inaktivierten Ganzvirus-Influenza-Impfstoffs entwickelt, der die regulatorischen Anforderungen, die von verschiedenen Institutionen gefordert werden (FDA, 1993; Pharm Eur., 1997; WHO, 1998), erfüllen kann. Das Herstellungsschema ist wie folgt: Der virushaltige Zellkultur-Überstand wird durch die Abtrennung von *Microcarriern* und Zelltrümmern mittels Separator geklärt, mit Benzonase (1000 U/l) behandelt, um zelluläre DNA abzubauen, und anschließend mit Formalin (0,025% w/v Endkonzentration) für 24 Stunden bei 32°C inaktiviert. Die inaktive Ernte wird dann mittels Durchfluß-Ultrazentrifugation über einen Saccharose-Gradienten (0–50%) gereinigt. Die virushaltige Hauptfraktion wird anschließend verdünnt, erneut mit Benzonase behandelt und mittels Ultrafiltration konzentriert. Nach der Bestimmung des Hämagglutinin-Antigengehaltes erfolgt die Endformulierung des Impfstoffs durch Zusammenmischung, Verdünnung und Sterilfiltration der Präparationen der 3 Impfstämme.

3.3 Impfstoff-Ausbeuten von 1200 Liter Fermenterkulturen

Die Influenza-Impfstämme der Saisons 1995/96, 1996/97 und 1997/98 wurden im groß-industriellen Maßstab in serumfreien 1200 Liter Vero-Zell-Fermenterkulturen vermehrt und, wie in Kapitel 3.2. beschrieben, gereinigt. Alle 5 Stämme erreichten HA-Titer von 256 HAU, und die Ausbeuten an gereinigtem Hämagglutinin-Antigen reichten von 3,08–4,95 g. Diese Ausbeuten entsprechen 205.000–330.000 Impfstoff-Dosen pro 1200 Liter-Fermenterlauf oder dem Äquivalent von etwa der gleichen Anzahl von Eiern, da normalerweise 1 bebrütetes Ei pro Impfstoff-Dosis benötigt wird (Tab. 2).

Tab. 2: Influenza-Impfstoff-Ausbeute aus 1200 Liter Vero-Zell-Fermenterkulturen

Virus-Stamm	HA-Titer der Virus-Ernte	Gesamt-Ausbeute an gereinigtem Hämagglutinin-Antigen	Impfstoff-Dosen (=Ei-Äquivalente)
A/Texas 36 (H1N1)	256	3.75 g	250.000
A/Johannesburg 82 (H1N1)	256	3.12 g	208.000
A/Johannesburg (H3N2)	256	3.08 g	205.000
A/Nanchang (H3N2)	256	3.36 g	224.000
B/Harbin	256	4.95 g	330.000

3.4 Serologische Analyse von Seren der Probanden der klinischen Studien

Mehr als 1200 Probanden wurden in verschiedenen klinischen Studien über die letzten Saisons (1996/97, 1997/98, 1998/99 und 1999/2000) mit den jeweiligen Influenza-Impfstoffen immunisiert (siehe Kapitel 2.6). Die Austestung der Seren erfolgte mittels HAI-Test gegen die jeweiligen Impfstämme, und die Auswertung erfolgte entsprechend der CPMP-*Guidelines* (CPMP, 1997). Entsprechend dieser *Guidelines* ist der Impfstoff effizient, wenn mindestens eines der folgenden 3 Kriterien erfüllt wird: 40% der geimpften Personen unter 60 Jahren (30% bei über 60 Jahren) müssen eine Serokonversion (4-facher Anstieg des HAI-Titers) zeigen; oder, der Anstieg des geometrischen Mittelwertes (GMT-Titer) muß mindestens 2,5 betragen (2,0 bei über 60 Jahren); oder, der Schutztiter (HAI-Titer größer oder gleich 40) muß nach der Impfung von mindestens 70% der geimpften Personen unter 60 Jahren (60% bei über 60 Jahren) erreicht werden. Die Darstellung der Ergebnisse der einzelnen klinischen Studien ist im Rahmen dieses Beitrags nicht möglich, wird aber an anderer Stelle nachgeholt (Kistner et al., Manuskript in Vorbereitung). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden daher die Mittelwerte und die Standardabweichungen der serologischen Ergebnisse aller klinischer Studien für die einzelnen Stämme (A/H1N1, A/H3N2 und B) berechnet. Die Zusammenfassung dieser Ergebnisse zeigt, daß in beiden Alters-Gruppen nicht nur eines, sondern alle 3 Kriterien erfüllt werden (Tab. 3). Die erreichten Werte liegen zudem weit über den geforderten und zeigen eindrucksvoll eine sehr hohe Immunogenität der Influenza-Impfstoffe aus Vero-Zellen. Die ermittelten Standardabweichungen demonstrieren darüber hinaus eine sehr gute Konsistenz in der Immuno-

genität der Impfstoffe der verschiedenen Saisons (4 Saisons) mit unterschiedlichen Viren (3 verschiedene A/H1N1-Stämme, 2 verschiedene A/H3N2-Stämme und 2 verschiedene B-Stämme) in 7 klinische Prüfungen mit 9 verschiedenen Impfstoff-Lots.

4 Diskussion

Die Vermehrung von Influenzaviren für die Impfstoffproduktion erfolgt normalerweise in bebrüteten Hühnereiern. Dieses Verfahren ist nicht nur sehr alt (es wurde bereits in den 40ziger Jahren unseres Jahrhunderts etabliert), es hat auch einige Nachteile, unter anderem, daß eine ausreichende Versorgung mit bebrüteten Hühnereiern nicht immer gewährleistet ist, und es daher zu einem Engpaß bei der Impfstoff-Herstellung kommen kann, was besonders im Falle einer Pandemie verheerende Folgen haben könnte. Deshalb forderte die WHO schon im Jahre 1995 in einem Memorandum (WHO, 1995), daß ein dringender Bedarf für die Entwicklung alternativer Zellkultur-Systeme für die Herstellung von Influenza-Impfstoffen besteht. Die Suche nach Alternativen war bis jetzt wenig erfolgreich, da sich, im Gegensatz zum Ei, eine Reihe von Influenzaviren nicht oder nur schlecht in Zellkulturen vermehren ließen. Darüber hinaus gibt es derzeit nur 2 kontinuierliche Zell-Linien, die für eine Produktion von Influenzaviren im Großstab geeignet sind, nämlich MDCK und Vero-Zellen. Im Gegensatz zu MDCK-Zellen gibt es viele Erfahrungen mit zugelassenen Human-Impfstoffen (Polio- und Tollwut) aus Verozellen (Montagnon et al., 1981), vor allem im Falle von Polio mit der dokumentierten sicheren Verabreichung von mehr als 100 Millionen Dosen über mehr als 15 Jahre in fast 60 Ländern (Vidor et al., 1997). Anfängliche Versuche, Influenzaviren in Vero-Zellen zu vermehren, waren erfolglos (Nakamura and

Tab. 3: Zusammenfassung der serologischen Ergebnisse der klinischen Studien entsprechend der CPMP Guidelines
1. Serokonversion (% mit 4-fachem HAI-Titer-Anstieg und HAI-Titer ≥ 40)

Alters-Gruppe	N	H1N1	H3N2	B
18 – 60 Jahre	535	78% \pm 8	65% \pm 13	63% \pm 9
CPMP Kriterium für Wirksamkeit		> 40%	> 40%	> 40%
> 60 Jahre	737	61% \pm 8	62% \pm 13	52% \pm 8
CPMP Kriterium für Wirksamkeit		> 30%	> 30%	> 30%

2. GMT Anstieg (vor/nach Impfung)

Alters-Gruppe	N	H1N1	H3N2	B
18 – 60 Jahre	535	8,2 \pm 2,6	6,3 \pm 2,4	5,6 \pm 1,8
CPMP Kriterium für Wirksamkeit		> 2,5	> 2,5	> 2,5
> 60 Jahre	737	5,6 \pm 1,6	8,1 \pm 4,2	3,9 \pm 0,7
CPMP Kriterium für Wirksamkeit		> 2,0	> 2,0	> 2,0

3. Schutz-Titer (% mit HAI-Titer ≥ 40)

Alters-Gruppe	N	H1N1	H3N2	B
18 – 60 Jahre	535	97% \pm 4	94% \pm 6	83% \pm 11
CPMP Kriterium für Wirksamkeit		> 70%	> 70%	> 70%
> 60 Jahre	737	89% \pm 7	94% \pm 5	80% \pm 13
CPMP Kriterium für Wirksamkeit		> 60%	> 60%	> 60%

Homma, 1981; Lau and Scholtissek, 1995). Kaverin und Webster (1995) gelang schließlich durch die wiederholte Zugabe von Trypsin die Vermehrung von Influenzaviren in Verozellen. Wir konnten zeigen, daß sich alle untersuchten Influenzaviren einschließlich der Impfstämme der letzten Influenza-Saisonen in Verozellen, die unter absolut serumfreien Bedingungen kultiviert worden sind, nach einer einmaligen Gabe von Trypsin sehr gut vermehren ließen (Kistner et al., 1998). Das verwendete porcine Trypsin ist einzige Protein tierischen Ursprungs, das für den gesamten Herstellungsprozeß benötigt wird und bietet ein Höchstmaß an Sicherheit durch ein routinemäßiges Screening auf mögliche kontaminierende Erreger und 2 unabhängigen Virusinaktivierungsschritten während des Reinigungsverfahrens. Diese Technologie konnte erfolgreich in einen industriellen Groß-Maßstab mit 1200 Liter-Fermenterkulturen umgesetzt werden: Aus einem 1200 Liter Fermenter-Lauf konnten, abhängig vom Impfstamm, 205.000–330.000

Impfstoff-Dosen erzeugt und somit 205.000–330.000 bebrütete Hühnereier ersetzt werden. Die Entwicklung eines Herstellungs-Schemas für die groß-industrielle Produktion mit modernen biotechnologischen Methoden ermöglichte die Herstellung von sehr sauberen und sicheren Ganzvirus-Impfstoffen, die die regulatorischen Anforderungen, die von verschiedenen Institutionen gefordert werden (FDA, 1993; Pharm Eur., 1997; WHO, 1998), erfüllen können. Diese Impfstoffe waren in Mäusen und Schimpansen mindestens genauso immunogen wie konventionelle Ei-Impfstoffe (Kistner et al., 1998, 1999; Brühl et al., 2000), und Protektions-Studien in Frettchen zeigten, daß immunisierte Frettchen vor einer Infektion mit lebenden Influenzaviren geschützt werden konnten (Kistner et al., 1999). Eine Reihe von verschiedenen klinischen Studien der Phase I, II und III, die mit den Influenza-Impfstoffen der Saisons 1996/97, 1997/98, 1998/99 und 1999/2000 in Großbritannien, Polen und Österreich erfolgreich durchgeführt wurden, zeig-

ten eine sehr hohe Immunogenität des Verozell-Influenza-Impfstoffs bei einer sehr guten Verträglichkeit.

5. Schlußfolgerungen

- 1) Der beschriebene Impfstoff ist der erste Influenza-Impfstoff, der im groß-industriellen Maßstab aus Verozell-Fermenterkulturen hergestellt wird
- 2) Vero ist eine gut charakterisierte Säugtier-Zelllinie mit hoher Sicherheit, die seit mehr als 15 Jahren für die Herstellung von lizenzierten Polio- und Tollwut-Impfstoffen verwendet wird
- 3) Die serumfreie Herstellung und die Verwendung eines einzigen Proteins tierischen Ursprungs (mit dokumentierter Sicherheit) schließt das Risiko einer Kontamination mit Fremderregern aus
- 4) Der Impfstoff ist absolut frei von Hühnereiweiß und Antibiotika-Resten und somit auch für Personen mit Hühnereiweiß- oder Antibiotika-Allergien verträglich
- 5) Der Impfstoff ist frei von Merthiolat, einer Quecksilber-haltigen Verbindung, die noch in vielen Impfstoffen als Konservierungsmittel enthalten ist
- 6) Die Impfstoff-Produktion ist unabhängig von der Verfügbarkeit von Eiern und kann somit Engpässen, die vor allem im Falle einer Pandemie drohen, vorbeugen
- 7) Ein 1200 Liter Fermenterlauf kann 205.000 bis 330.000 bebrütete Hühnereier ersetzen.

Literatur

- Brühl, P., Kerschbaum, A., Kistner, O., Barrett, P. N., Dörner, F. and Gerencer, M. (2000). Humoral and cell-mediated immunity to Vero cell-derived influenza vaccine. *Vaccine* 19, 1149-1158.
- CPMP, Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP) (1997). Note for Guidance on Harmonisation of Requirements for Influenza Vaccines (CPMP/BWP/214/96), 12 March 1997, 16-18.
- FDA (1993). Points to consider in the characterization of cell lines used to produce biologicals.
- Hirst, G. K. (1941). The agglutination of red cells by allantoic fluid of chicken embryo infection with influenza virus. *Science* 94, 22-23.
- Kaverin, N. V. and Webster, R. G. (1995). Impairment of multicycle influenza virus growth in Vero (WHO) cells by loss of trypsin activity. *J. Virol.* 69, 2700-2703.
- Kistner, O., Barrett, P., N., Mundt, W. et al. (1998). Development of a mammalian cell



- (Vero) derived Candidate influenza virus vaccine. *Vaccine* 16, 960-968.
- Kistner, O., Barrett, P. N., Mundt, W. et al. (1999). A novel mammalian cell (Vero) derived influenza virus vaccine: development, characterization and industrial scale production. *Wien. Klin. Wochenschr.* 115/5, 207-214.
- Lau, S. C. and Scholtissek, C. (1995). Abortive infection of Vero cells by an influenza A virus (FPV). *Virology* 212, 225-231.
- Montagnon, B. J., Fanget, B. and Nicholas, A. J. (1981). The large-scale cultivation of Vero cells in microcarrier culture for virus vaccine production. Preliminary results for killed poliovirus -vaccine. *Dev. Biol. Stand.* 47, 55-64.
- Nakamura, K. and Homma, M. (1981). Protein synthesis in Vero cells abortively infected with Influenza B virus. *J. Gen. Virol.* 56, 199-202.
- Petricciani, J. C. (1991). Regulatory philosophy and acceptability of cells for the production of biologicals. *Dev. Biol. Stand* 75, 9-15.
- Pharmacopoeia European (1997). 0159, 1-3.
- Rowe, P. M. (1995). Pandemic influenza (un)preparedness described. *Lancet* 346, 1699.
- Vidor, E., Meschievitz, C. and Plotkin, S. (1997). Fifteen years of experience with Vero-produced enhanced potency inactivated poliovirus vaccine. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 16, 312-322.
- WHO (1995). Cell culture as a substrate for the production of influenza vaccines: memorandum from a WHO meeting. *Bull. WHO* 73, 431-435.
- WHO (1998). Requirements for the use of animal cells as in vitro substrates for the production of biologicals. *WHO Technical Report Series* 878, 19-56.
- Wood, J. M., Schild, G. C., Newman, R. W. et al. (1977). An improved single-radial-immunodiffusion technique for the assay of influenza haemagglutinin antigen: application for potency determinations of inactivated whole virus and subunit vaccines. *J. Biol. Stand.* 5, 237-247.

Korrespondenzadresse

Dr. Otfried Kistner
 Director Virology
 Biomedical Research Center
 Baxter Hyland Immuno
 Uferstr. 15
 2304 Orth/Donau
 Tel: +43-1-20100 4314
 Fax: +43-1-20100 4000
 E-mail: Otfried_Kistner@baxter.com



Poster

Alternative IgY Eidotterantikörper-Technologie vom SPF-Huhn – eine Chance für Gegenwart und Zukunft

Hartmut Kobilke

Egg Immun DAMSDORF GmbH i.G., D-Damsdorf,
 E-mail: office@egg-yolk-antibodies.de

Die IgY-Antikörper (=IgG im Serum) stellen eine erfreuliche und segensreiche Alternative zu den bisher jährlich zu mehreren Millionen getöteten Labor- und Kleinsäugern dar, die zur Gewinnung poly- und monoklonaler Antikörper verwendet wurden. Im Sinne der „3R“ (Russel and Burch, 1959) leistet diese innovative Methode der jüngsten Branche der Biotechnologie/Biomedizin einen gewichtigen Beitrag im Sinne des praktizierten Tierschutzes als Tierversuchs-Ersatzmethode.

Die IgY-Technologie beinhaltet als Gesamtsystem folgende Teilgebiete, deren Beherrschung eine mehrjährige Erfahrung, tierphysiologisches und immunologisches, biochemisches Denken und Wissen, ein bewußtes Engagement für Tierschutz, Ausdauer und Optimismus wie auch eine glückliche Hand voraussetzt. Nicht zuletzt deshalb dauerte es seit Klemperer (1893!), bis diese Technologie ihren Siegeszug anzutreten begann (1996), so viele Jahre. Teilgebiete:

► Auswahl und Vorbereitung der Junghennen (SPF- oder Vorzugshühner) einschließlich ihrer tierartgerechten Haltung und Fütterung,

► Präparation und Applikation der Immunisierungsantigene beim Huhn, Antigenauswahl (Viren, Bakterien, Protozoen, Prionen, Toxine, Endoparasiten, Allergene, Hormone, Enzyme, Vitamine sowie synthetische Peptide),

► Auswahl und Prüfung verschiedener und geeigneter (alternativer) Adjuvantien zur Steigerung der Immunleistung, Applikationsart,

► Antigenaufbereitung (pH, Mol.-gewicht, Dosis) und geeigneter Immunisierungsablauf (Methode) zur Erzielung lang anhaltender, maximaler Antikörperproduktion mit spezifischer Wirkung,

► Aufbereitung, Reinigung, Mengenbestimmung der spezifischen IgY-Antikörper,

► Anwendungs- und Applikationsstrategien für diese IgY-Antikörper in Human- und Veterinärmedizin und im Umweltschutz für Diagnostik und Therapie inkl. klinischer Erprobung und praktischer Anwendung,

► Aufbau eines Qualitätssicherungssystems (Öko-Audit, ISO 9001, GLP) sowie von Produktions-, Konfektionierungs- und Vertriebsstrukturen und -netzen,

► Erforderliche Aus- und Fortbildung des Personals, Aufklärung und Werbung,
 ► Ausrichtung sowie Förderung von Forschung und Entwicklung auf dieses neue Gebiet (insbesondere größere Unterstützung für kleinere und mittlere Unternehmen!).

Aus bisher realisierten 40 Forschungs- und Entwicklungsprojekten und bereits laufenden klinischen Erprobungen und praktischen Anwendungen, gekrönt durch bisher 3 Patente und die z.Zt. laufende Gründung der Produktions-, Verarbeitungs-, Konfektionierungs- und Vertriebs-GmbH Egg-Immun sowie der Med.-Immun Rastatt AG ergeben sich weitreichende Chancen mit positiven ethischen, sozialen, human- und tiergesundheitlichen sowie ökologischen Folgen und Nutzwendungen der IGY auf den Gebieten:

1. Veterinär- und humanmedizinische sowie ökotoxikologische Diagnostik (z.B. infektionsmedizinische, kostengünstige ELISA-Kits, Frühdiagnostik von Polytrauma, Sepsis und Schock in der Unfallmedizin, Frühwarnsysteme u.a. „Waldsterben“)

2. Ungeahnte Möglichkeiten zur oralen oder parenteralen passiven Immuntherapie bei Mensch und Tier z.B. gegen HIV-Infektionen (AIDS, ARC) und Virusinfektionen und gegen faktorensuchenhafte infektiöse Durchfallerkrankungen oder lokale Anwendung als Spezialwundsalbe gegen hartnäckig nässende eiternde abszedierende oder nekrotisierende Wunden der Haut und kutanen Schleimhaut.