



Anwendung des 3R-Konzeptes bei der Qualitätskontrolle eines Impfstoffes gegen die Frühsommermeningoenzephalitis (FSME®) des Menschen

Susanne Schober-Bendixen

Fa. Immuno AG, A-Orth/Donau

Zusammenfassung

Es werden 3R relevante Maßnahmen beschrieben, die in den vergangenen 15 Jahren bei der Qualitätskontrolle von FSME-Impfstoff beim Impfstoffhersteller durchgeführt wurden. Die Gesamtzahl von 4.278 Versuchstieren konnte auf 2.011 Versuchstiere pro Impfstofflot reduziert werden. Das ergibt eine Einsparung von 34.005 Versuchstieren pro Jahr.

Wenn der noch ausstehende Änderungsantrag von den Zulassungsbehörden genehmigt ist, wird diese Zahl auf 961 Versuchstiere pro Impfstofflot sinken. Das ergibt eine Einsparung von 49.755 Versuchstieren pro Jahr.

Für einen neuentwickelten FSME-Impfstoff, der 1997 im dezentralen Verfahren mit gegenseitiger Anerkennung in der europäischen Union eingereicht wird, sind in der Qualitätskontrolle nur mehr 531 Versuchstiere pro Impfstofflot vorgesehen, das entspricht 12,5 % der Ausgangszahl oder einer Reduktion von fast neunzig Prozent.

Dank der konsequenten Suche nach Alternativmethoden und des hohen Stellenwerts, der an die Validierung dieser Methoden angelegt wurde, ist es gelungen, die nationalen Zulassungsbehörden davon zu überzeugen, daß nur mehr absolut notwendige Tierversuche in der Qualitätskontrolle eines Impfstoffes durchgeführt werden müssen.

Es wird auch in Zukunft nicht möglich sein, bei der Qualitätskontrolle eines Impfstoffes ganz auf Tierversuche zu verzichten, aber bei konsequenter Berücksichtigung der 3 R kann sowohl die Zahl der Tiere minimiert, als auch das Leiden der Versuchstiere möglichst gering gehalten werden. Das Ziel ist also nicht nur der komplette Ersatz eines Tierversuches, sondern auch als erster Schritt die größtmögliche Reduktion von Leiden für die noch erforderlichen Versuchstiere.

Summary: Application of the 3 R (refine, reduce, replace) in the quality control of a human vaccine against Tick-borne encephalitis (TBE)

This report describes the various ways in which animal experiments were replaced, reduced or refined by the manufacturer in the quality control of the tick-borne encephalitis (TBE) vaccine over the past fifteen years. The total number of test animals was reduced from 4.278 to 2.011 per vaccine lot. This involves a reduction of 34.005 test animals per year.

If a further planned change submitted to the regulatory authorities is approved, the number of animals used will be further reduced to 961 per vaccine lot. This will result in a total saving of 49.755 animals per year.

A newly developed TBE vaccine, which will be submitted to the EC regulatory authorities in 1997, will involve even further reductions in the number of test animals required for quality control. Only 531 test animals will be required per lot for this newly developed vaccine i. e. almost 90 % reduction compared to the numbers required for the original vaccine.

It has been possible to convince the national regulatory authority that only a minimal amount of animal tests are essential for the quality control of this vaccine. This has been made possible by the intensive search for replacement tests and by the high standard of validation of these tests.

It will probably not be possible to totally eliminate animal tests for vaccine quality control in the future. However, the vigorous implementation of the 3 R's will certainly lead to a reduction in the number of animals required and the reduction of animal suffering. The aim of this policy must be seen not only as a reduction in the number of animals used, but primarily a reduction in suffering to the lowest possible levels for the animals still required.

Keywords: human vaccine, quality control, animal reduction and replacement

1 Einleitung

Immunologische Arzneimittel können wegen der natürlichen biologischen Variabilität während des Herstellungsprozesses in der Regel nicht mit einer derart gleichmäßigen Konstanz hergestellt werden, wie

dies bei pharmazeutischen Arzneimitteln der Fall ist. Pharmazeutika können, nachdem sie ein Zulassungsverfahren durchlaufen haben, direkt in Verkehr gebracht werden.

Dagegen unterliegen immunologische Arzneimittel einer staatlichen Chargenprü-

fung, das heißt, auch nach der Zulassung muß jede in einem einheitlichen Herstellungsgang hergestellte Produktionscharge, bevor sie in den Handel abgegeben werden darf, von einer staatlichen Kontrollbehörde einen Freigabebescheid erhalten. Das Kontrollinstitut hat dabei die Mög-



lichkeit, die Prüfungsergebnisse durch eigene Untersuchungen nachzuvollziehen oder auch die Qualitätsprüfung durch eine Inspektion beim Hersteller zu überwachen.

Die Chargenkontrolle umfaßt zahlreiche Prüfungen zur Reinheit, Unschädlichkeit und Wirksamkeit der Produkte. Diese Anforderungen sind in der Regel in Prüfvorschriften vorgegeben.

Zahlreiche Bestimmungen der nationalen (Österreichisches Arzneimittelgesetz,

1996) und europäischen Arzneibuchmonographien (Europäische Pharmakopöe, 1997), aber auch die WHO-Anforderungen (1995) schreiben die Durchführung von Tierversuchen vor. Bei Impfstoffen kommt es zu besonders vielen Tierversuchen in der Qualitätskontrolle, da zum Beispiel die potentielle Gefahr von Fremdviren, von nicht vollständig inaktivierten Viren oder anderen Verunreinigungen besteht.

Hier gibt es viele Ansätze, durch konsequente Anwendung des 3 R-Konzeptes (*refine, reduce, replace*) Versuchstiere einzusparen:

1. Bei Testsystemen, die mit einem Standard verglichen werden, kann bei gleichzeitigem Ansatz vieler Proben die Anzahl der Standardtiere vermindert werden.
2. Durch den Nachweis einer gleichförmigen konsistenten Herstellung (GMP, *good manufacturing practice*) kann darauf verzichtet werden, auf jeder einzelnen Stufe einen Test durchzuführen. Ein Test zum Nachweis der *consistency* des Impfstofflots ist ausreichend.
3. Durch die Etablierung einer Alternativmethode kann ein Tierversuch teilweise oder komplett ersetzt werden.
4. Ein durch die Zulassungsbehörde vorgeschriebener Test kann, wenn er über Jahre kein positives Ergebnis gezeigt hat, nach Ansuchen bei der Zulassungsbehörde mit oder ohne Genehmigung ersatzlos gestrichen werden.

Mit dieser Arbeit soll gezeigt werden, wie und welche dieser Möglichkeiten bereits verwirklicht wurden. Es ist unbestritten, daß der Tierschutzgedanke in der Industrie einen hohen Stellenwert hat, aber auch durch den wirtschaftlichen Nutzen ist zusätzlich ein hoher Anreiz zur Entwicklung von Alternativmethoden gegeben.

2 Übersicht über die Zusammensetzung und die Produktionsschritte von FSME-IMMUN®

FSME-IMMUN® Inject ist ein inaktivierter Virusimpfstoff zur aktiven Immunisierung gegen Frühsommermeningoenzephalitis (FSME).

1971 wurde eine Zusammenarbeit zur Entwicklung einer kommerziell hergestellten inaktivierten Vakzine gegen FSME zwischen Christian Kunz vom Virologischen Institut in Wien und der Mikrobiologischen Forschungseinrichtung in Porton Down, England begonnen. Das für diese Entwicklung und der daraus folgenden Herstellung des FSME-Impfstoffes verwendete Virus (Stamm Neudörfel) wurde aus infizierten Zecken isoliert, auf Hühnerembryonalzellen kloniert und in Maus-hirnpassagen vermehrt.

Die nach der letzten Passage vorliegende Maus-hirnsuspension ist die Saatviruskultur für die Produktion des FSME-Impf-

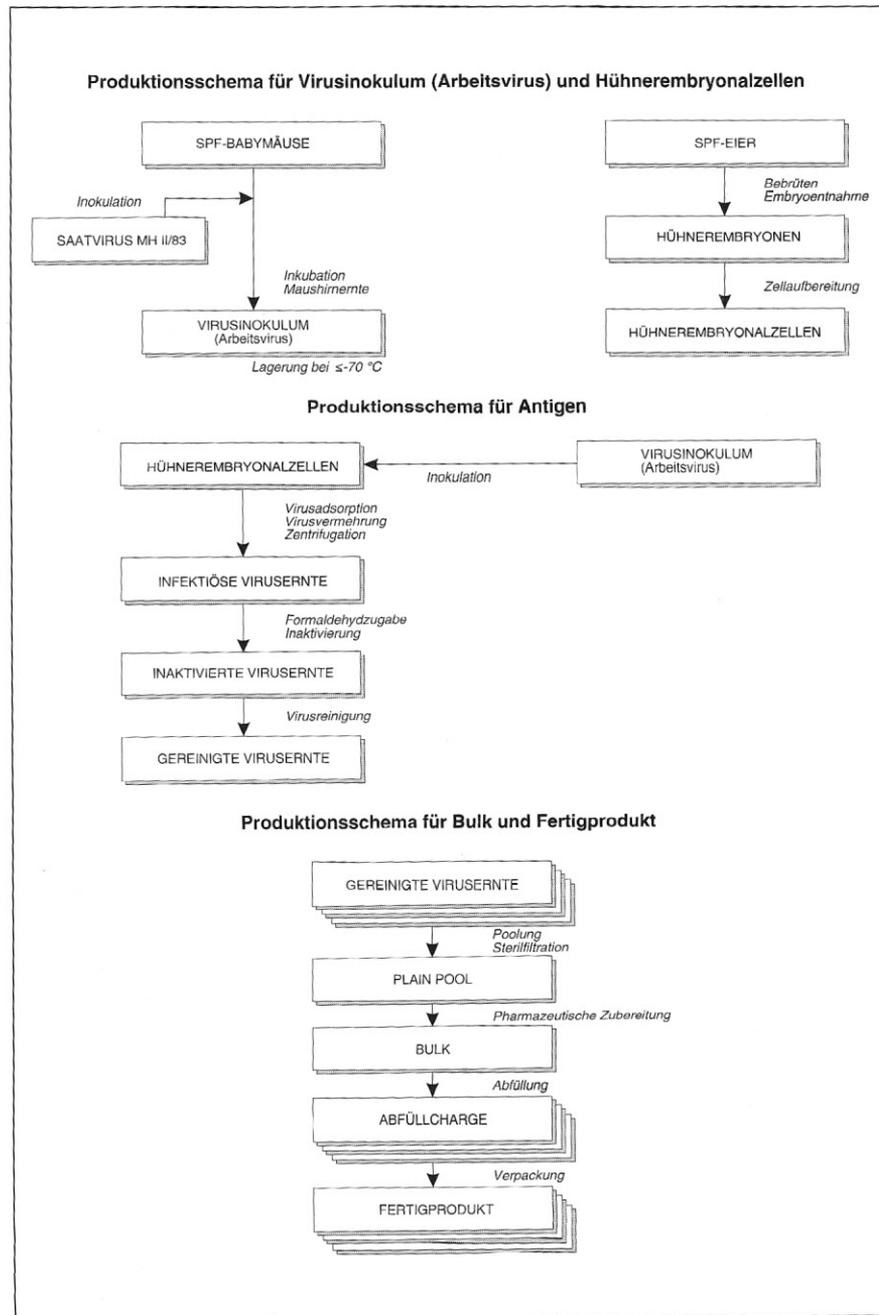


Abbildung 1: Produktionsschema des FSME-Impfstoffes

Tabelle 1: Übersicht aller Qualitätskontrolltests, die Versuchstiere benötigen beziehungsweise benötigt haben. Alle hellgrau unterlegten Testmethoden mit Versuchstieren wurden bereits eingespart.

Die dunkelgrau unterlegten Testmethoden sind bereits mit einer validierten Alternativmethode bei den Zulassungsbehörden zur Änderung eingereicht.

*= nicht rechenbar, da seit 1983 für alle Impfstoffe verwendet, **= nur an einer Abfüllcharge

stoffes. Das Saatvirus wird in Flüssigstickstoff gelagert.

Aus dem Saatvirus wird durch Passage in Babymäusen das Arbeitsvirus (Virusinokulum) hergestellt. Das Virusinokulum wird zur Produktion einer Antigencharge auf Suspensionskulturen von Hühnerembryonalzellen überimpft.

Nach einer Virusadsorptionsphase werden die Zellen gewaschen und anschließend zur Virusvermehrung in einem Kulturmedium inkubiert. Der virushaltige Zellüberstand wird mit einer Durchlaufzentrifuge vom Zellsediment abgetrennt und durch Zugabe von Formaldehyd inaktiviert. Nach der Fällung nichtviraler Proteine wird das FSME-Virusantigen mit einer Ultrazentrifuge in einem Saccharose-Dichtegradienten gereinigt (Heinz et al., 1980; Kunz et al., 1980).

Ein Impfstofflot entsteht durch Poolung mehrerer Antigenchargen. Dieser Pool wird verdünnt, mit Humanalbumin als Stabilisator versetzt und sterilfiltriert. Anschließend wird Merthiolat als Konservans und Aluminiumhydroxid als Adjuvans zugesetzt.

Der Bulkimpfstoff wird vollautomatisch unter streng aseptischen Bedingungen in sterile Fertigspritzen abgefüllt und anschließend automatisch verpackt.

Die einzelnen Produktionsschritte, die durch Qualitätskontrolltests beim Hersteller geprüft werden müssen, sind als *flow-sheet* in Abbildung 1 zusammengefasst.

Die ersten klinischen Studien (Kunz et al., 1976; Kunz, 1981; Kunz et al., 1980) ergaben eine hohe Wirksamkeit bei geringen Nebenwirkungen.

Produktionsstufe	Testbezeichnung	Versuchstierart	Anzahl der Tiere/Versuch	durchschnittliche Anzahl der Tiere/Impfstofflot
Saatvirus MHII/83	<i>M. tuberculosis</i> Virustiter	Meerschweinchen Mäuse	5 50 Probe 50 Standard	n.r.*
	Fremdvirentest	Mäuse Meerschweinchen	10 5	
Virusinokulum (Arbeitsvirus)	Virustiter	Mäuse	50 Probe 50 Standard	15-20 Probe 15-20 Standard
Hühnerembryonalzellen	Fremdvirentest	Babymäuse	10	150
		Mäuse	10	150
		Meerschweinchen	5	75
		Kaninchen	5	75
Infektiöse Virusernte	<i>M. tuberculosis</i> Virustiter	Meerschweinchen	5	75
		Mäuse	50 Probe 50 Standard	750 Probe 750 Standard
Inaktivierte Virusernte	Freisein von FSME-Viren: direkt nach Vermehrung	Babymäuse	20	300
		Babymäuse Mäuse	20 30	300 450
	Pyrogentest	Kaninchen	3	45
gereinigte Virusernte	Pyrogentest	Kaninchen	3	45
Plain Pool	Fremdvirentest: direkt nach Vermehrung	Babymäuse	400	400
		Mäuse	30	30
	Pyrogentest	Kaninchen	3	3
Bulk	Wirksamkeit	Mäuse	200 Probe 200 Standard 80 Virustitration	200 Probe 200 Standard 80 Virustitration
Abfüllcharge	Identität	Mäuse	10	80
	Pyrogentest	Kaninchen	3	21
	Pyrogentest **	Kaninchen	3	3
	Anomale Toxizität	Meerschweinchen	2	16
		Mäuse	5	40

3 Übersicht aller Qualitätskontrolltests, die Versuchstiere benötigen oder benötigt haben

Eine Übersicht aller Qualitätskontrolltests, die Versuchstiere benötigen oder benötigt haben, findet sich in Tabelle 1. Alle in dieser Tabelle aufgeführten Zahlen beziehen sich auf ein durchschnittliches Impfstofflot aus 15 gereinigten Virusernten und 8 Abfüllchargen. Diese Tabelle enthält auch Testmethoden, die bereits durch validierte Alternativmethoden ersetzt wurden, bzw. eine Testmethode, deren validierte Ersatzmethode bei den österreichischen und deutschen Zulassungsbehörden zur Genehmigung eingereicht ist. Ebenso sind Testmethoden aufgeführt, die im neuen Monographieentwurf von FSME-Impfstoffen nicht mehr verlangt werden (Phar-

meuropa, 1997). Alle in dieser Arbeit angeführten Einsparungen beziehen sich auf die durchschnittliche Jahresproduktion von 15 Impfstofflots.

3.1 Einsparungen von Versuchstieren in der Qualitätskontrolle durch bereits validierte und etablierte Alternativmethoden

3.1.1 Identität

Testmethode mit Versuchstieren

Bei zehn Mäusen wird eine subkutane Immunisierung mit jeder Abfüllcharge durchgeführt. Nach 21 Tagen werden die Tiere entblutet und ein spezifischer Nachweis auf Antikörper gegen FSME-Virus geführt (Hämagglutinationshemmtest).

► Belastung der Versuchstiere: gering

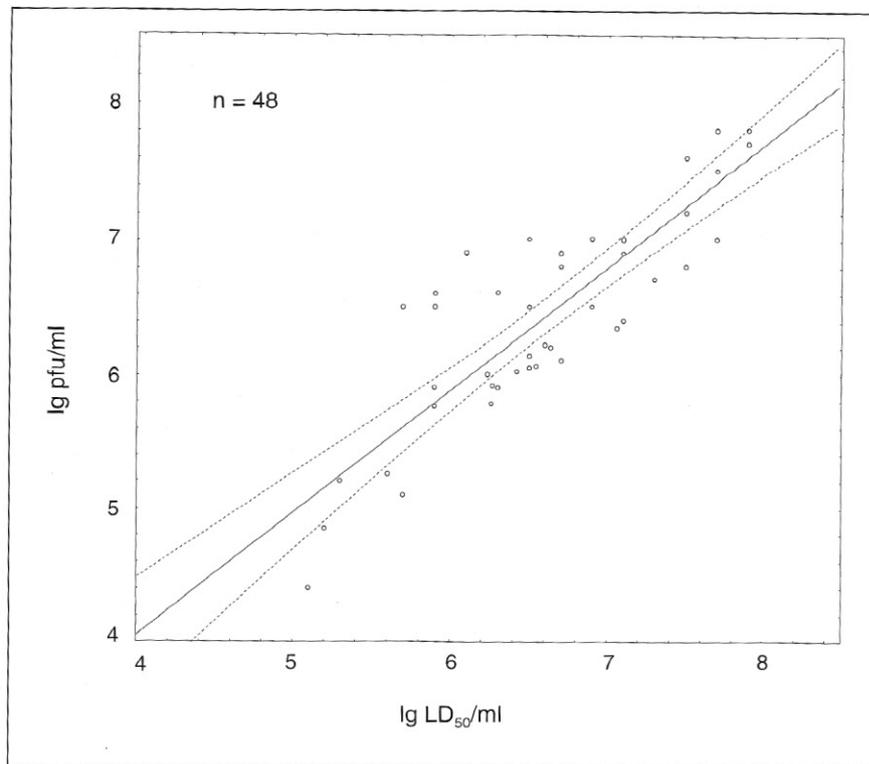


Abbildung 2: Korrelation zwischen Plaquetest und LD₅₀-Test
lg LD₅₀/ml = Logarithmus der letalen Dosis für 50 % pro ml.
lg pfu/ml = Logarithmus der plaque forming units pro ml.
n = Anzahl der Ergebnisse

Alternativtestmethode mit erheblich verminderter Zahl von Versuchstieren
ELISA-Doppelsandwichsystem

Anti-FSME-Immunglobulin von Meerschweinchen wird als „capture“-Antikörper verwendet und ein Kaninchenserum als „Detektor“-Antiserum. Das Meerschweinchen-Immunglobulin und das Kaninchenserum sind seit 1984 im Einsatz.

Validierung des ELISA-Systems

Der FSME-Identitätstest mittels ELISA ist in der Lage, Vorverdünnungen des Analyten von 1:1,6 zu detektieren; die Nachweisgrenze für den FSME-Identitätstest mittels ELISA liegt bei einem Titer von 32.

Nach der Validierung des Doppelsandwich-ELISA-Systems und der Genehmigung der österreichischen und deutschen Zulassungsbehörden konnte 1984 der Tierversuch gestrichen werden.

Für die benötigten Antiseren wurden 10 Kaninchen und 50 Meerschweinchen verbraucht.

- ▶ Einsparung:
mindestens 1.200 Mäuse pro Jahr

3.1.2 Virustiterbestimmung

Dieser Test wird an jedem Virusinokulum und jeder infektiösen Virusernte durchgeführt. Sowohl beim LD₅₀-Test als auch

beim Plaquetest wird ein Standard mitgeführt.

Testmethode mit Versuchstieren
LD₅₀-Test in erwachsenen Mäusen

5 Gruppen von je 10 erwachsenen Mäusen erhalten die verschiedenen Verdünnungen intraperitoneal verabreicht.

Die Tiere werden 21 Tage beobachtet, und am Ende der Beobachtungszeit wird die lg LD₅₀ nach der Formel von Kärber (1931) berechnet.

- ▶ Belastung der Versuchstiere: sehr hoch

Alternativtestmethode ohne Versuchstiere
Plaquetest auf porcine-stable-Zellen (Wang Lee et al., 1958; Kanda Inoue and Ogura, 1962; Russel et al., 1967; De Madrid and Porterfield, 1969, 1974)

Die auf ihren Gehalt an FSME-Viren zu prüfenden Proben werden in Zehnerschritten verdünnt und in Makroplatten mit Monolayern von porcine-stable-Zellen pipettiert und das Virus an den Zellen adsorbiert. Nach Absaugen wird halbfestes Medium zugesetzt und nach 4 Tagen wird mit Kristallviolett gefärbt, und die Plaques werden gezählt und berechnet.

Validierung des Plaquetests

Zum Vergleich der Testmethoden Plaquetest und LD₅₀-Test wurden 48 Wertepaare

herangezogen. Anhand von Mehrfachbestimmungen von Proben konnte die Präzision der Testmethoden verglichen werden. Es konnte gezeigt werden, daß die Vergleichspräzision im Plaquetest mit 0,0396 deutlich besser ist als im Tierversuch (0,2762). Dies entspricht durchaus den Erwartungen, da im Tierversuch naturgemäß mit höheren Schwankungen zu rechnen ist als in der Zellkultur.

Der Methodenvergleich anhand der ermittelten Ergebnisse in beiden Testsystemen erfolgte mittels gewichteter Regressionsanalyse (siehe Abbildung 2). Die Korrelation zwischen lg pfu/ml und lg LD₅₀/ml betrug 0,86. Unter Berücksichtigung der Reliabilität der beiden Methoden ergibt sich eine praktisch perfekte Korrelation, d.h. daß die beiden Methoden im wesentlichen dasselbe messen.

Zusammenfassung der Validierung

Der Plaquetest ergibt Anzahlen von infektiösen Einheiten, die Plaques bilden, während der LD₅₀-Test jene Verdünnung bestimmt, bei der 50% der Tiere überleben. Das heißt, daß die beiden Verfahren offensichtlich dasselbe messen, aber verschieden gut. Der Plaquetest hat durchwegs die besseren Testwerte, wobei insbesondere die Wiederholbarkeit (*repeatability*) und Präzision des Plaquetests günstiger zu beurteilen sind.

Nach Genehmigung durch die österreichischen und deutschen Zulassungsbehörden konnte der Plaquetest den LD₅₀-Test in erwachsenen Mäusen zur Bestimmung des Virustiters ab November 1989 komplett ersetzen.

- ▶ Einsparung:
mindestens 20.000 Mäuse pro Jahr

3.1.3 Überprüfung der Hühnerembryonalzellen (Produktionszellen) auf Freisein von Fremdviern

Die Hühnerembryonalzellen werden 1 Woche inkubiert. Danach werden die Zellen mikroskopisch beurteilt, geerntet, gezählt und auf die gewünschte Konzentration eingestellt.

Testmethode mit Versuchstieren

Überprüfung der Hühnerembryonalzellkulturen in Tieren

10 Babymäuse, 10 erwachsene Mäuse, 5 Meerschweinchen und 5 Kaninchen erhalten 1 bzw. 2 Millionen Zellen intramuskulär verabreicht. Die Tiere werden 21-30 Tage beobachtet, und 80% der Tiere müssen bei voller Gesundheit überleben.

► Belastung der Versuchstiere: gering

Parallele Testmethode ohne Versuchstiere

Test in befruchteten Hühnereiern

2 Millionen Zellen werden in die Allantoishöhle von zehn bebrüteten SPF-Hühnereiern injiziert, die Überlebensrate der Hühnerembryonen muß 80% betragen, und der Hämagglutinationstest muß negativ sein.

Validierung des Tests in befruchteten Hühnereiern

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurde ein Spiking-Experiment mit dem Virus der klassischen Geflügelpest (Influenza A/FPV/Rostock/34/H7N1) durchgeführt. Es konnten Virustiter von 0,5 EID₅₀ (Ei infektiöse Dosis bei 50%) reproduzierbar nachgewiesen werden.

Der Nachweis von < 0,5 EID₅₀/0,5 ml gelang nur in 4 von 5 Ansätzen.

Da jede Probe zusätzlich in Gewebekulturen drei verschiedener Spezies (Huhn, Affe und Mensch) getestet wird und der Tiertest in zehn Jahren kein positives Ergebnis gezeigt hat und auch nie validiert wurde, konnte nach Genehmigung der österreichischen und deutschen Zulassungsbehörde der Tiertest ab 1990 abgeschafft werden.

► Einsparung
mindestens 2.200 Babymäuse pro Jahr
mindestens 2.200 Mäuse pro Jahr
mindestens 1.100 Kaninchen pro Jahr
mindestens 1.100 Meerschweinchen pro Jahr

3.1.4 Prüfung auf *Mycobacterium tuberculosis*

Testmethode mit Versuchstieren

5 Meerschweinchen erhalten die Probe intraperitoneal verabreicht und werden 60 Tage beobachtet. Bei der Sektion darf keine Tuberkuloseinfektion nachgewiesen werden.

► Belastung der Versuchstiere: gering

Alternativtestmethode ohne Versuchstiere

Nährmedienbeimpfung
Jede Probe wird auf flüssiges Middlebrook-Medium und auf Löwenstein-Jensen Schrägagar beimpft und 42 Tage bebrütet, und alle Fläschchen und Röhrchen werden makroskopisch auf Keimwachstum untersucht.

Validierung der Nährmedienbeimpfung

In allen gespikten Proben gelang ein eindeutiger Mykobakteriennachweis. Die verwendeten Medien erwiesen sich als gut geeignet, und es konnte eine Erfassungsgrenze von zwei Keimen/0,5 ml Inokulum erreicht werden. Im Tierversuch wurden keine Spikingexperimente durchgeführt.

Da die Werte dieser Validierung den Anforderungen der Europäischen Pharmakopöe entsprachen, wurde dieser Test nach Genehmigung durch die österreichischen und deutschen Zulassungsbehörden ab 1993 durchgeführt.

► Einsparung
mindestens 1.100 Meerschweinchen pro Jahr

3.1.5 Pyrogentest

(auf der Stufe der gereinigten Virusernte)

Durch eine Änderung in der Lagerung dieses Zwischenproduktes (statt Lagerung der rückverdünnten Peak Pool-Konzentrate bei +4 °C, Lagerung der konzentrierten Peak Pool-Konzentrate bei -20 °C) fällt dieser Test weg.

Die Änderung der Lagerung dieses Zwischenproduktes ist von allen Zulassungsbehörden seit 1996 (Deutschland seit 1997) genehmigt.

► Einsparung:
mindestens 675 Kaninchen pro Jahr

3.1.6 Anomale Toxizität

Testmethode mit Versuchstieren laut Pharm. eur.

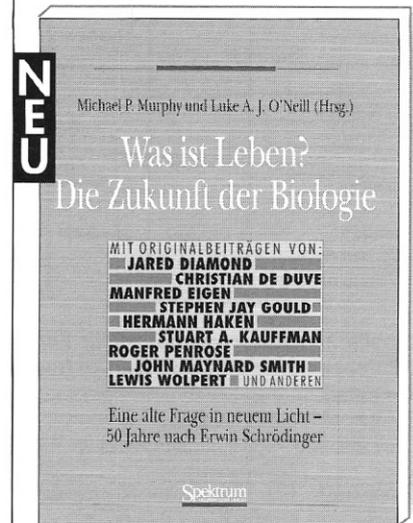
Nach intraperitonealer Applikation der Probe in zwei Meerschweinchen und fünf Mäusen werden die Tiere eine Woche lang beobachtet und am Anfang und Ende des Tests abgewogen. Jedes Tier muß zunehmen und die Testdauer überleben.

► Belastung der Versuchstiere: gering

In einer umfangreichen Studie des Paul-Ehrlich-Institutes wurde die Aussagekraft dieses Tests auf anomale Toxizität in Fra-

Was ist Leben?

50 Jahre nach
Erwin Schrödinger



Michael P. Murphy / Luke A. O'Neill (Hrsg.)

Was ist Leben? Die Zukunft der Biologie

Eine alte Frage in neuem Licht –
50 Jahre nach Erwin Schrödinger

In der Nachfolge von Erwin Schrödingers einflussreichem Buch *Was ist Leben?* stellen sich in diesem Band – 50 Jahre Jahre später – führende Biologen und Physiker erneut jener Schlüsselfrage der Biologie. Ihre Antworten überspannen ein Themenspektrum von der chemischen Evolution bis zur Chaostheorie, von der Entwicklungsbiologie bis zur Physik des Bewußtseins. Sie gewähren nicht nur faszinierende Einblicke in das Denken bedeutender Wissenschaftler unserer Tage, sondern zeigen auch, wohin sich die Biologie in den nächsten 50 Jahren entwickeln könnte.

ca. 224 S., geb.

DM 48,-/öS 351,-/sFr 46,-

ISBN 3-8274-0120-8

Zu den **Autoren** zählen Nobelpreisträger wie Manfred Eigen und Christian de Duve, Biologen wie Stephen J. Gould, Jared Diamond und Lewis Wolpert und Physiker wie Roger Penrose und Hermann Haken.

Spektrum
AKADEMISCHER VERLAG

Vangerowstr. 20, D-69115 Heidelberg



Zeitraum	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996
Nagetiere*	137.797	141.340	134.780	139.903	109.941	88.944	87.782
Kaninchen	17.950	16.126	15.360	14.707	13.177	11.268	9.942
Schimpansen**	6	23	23	17	30	15	48
Makaken**	3	5	3	4	17	6	6
Landwirtschaftliche Nutztiere**	55	55	39	54	56	52	44
Insges. verwendete Versuchstiere	155.811	157.549	150.205	154.685	123.225	100.285	97.822

Tabelle 2: Versuchstierbedarf für Forschung und Entwicklung und gesetzlich vorgeschriebene Chargenprüfungen im Biomedizinischen Forschungszentrum, Orth/Donau, der Firma Immuno AG.

* Maus, Meerschweinchen, Ratte.

** all diese Tiere stehen jahrelang im Versuch

ge gestellt. Für Humanimpfstoffe wurde der Test ab 1.1.1997 für Impfstoffe gegen Diphtherie, Tetanus und Keuchhusten abgeschafft (Cußler, 1996).

Für eine Änderungsmeldung zur Abschaffung dieses Tests wurden die Ergebnisse (Rohdaten) aller Impfstofflots von FSME von 1995 beginnend zusammengefaßt und an alle Zulassungsbehörden der Länder, in denen der Impfstoff zugelassen ist, weitergegeben. Kein Test war positiv, und zusätzlich wird die Reinheit des FSME-Impfstoffantigens über einen Ultrazentrifugationsgradienten nachgewiesen. Alle anderen Zusatzstoffe werden mit analytischen Testmethoden nachgewiesen und unterliegen strikten Freigabekriterien. Ab Juni 1997 wird der Test nicht mehr durchgeführt.

- ▶ Einsparung: mindestens 240 Meerschweinchen pro Jahr
- mindestens 600 Mäuse pro Jahr

3.1.7 Pyrogentest (auf der Stufe der Abfüllchargen)

Testmethode mit Versuchstieren laut Pharm. eur.

Nach intravenöser Injektion der Probe in 3 Kaninchen wird der Temperaturanstieg der Tiere über 3 Stunden bestimmt. Der maximale Temperaturanstieg gilt als Maß für die Pyrogenität einer Probe.

- ▶ Belastung der Versuchstiere: gering

Da die Abfüllung des Endproduktes seit längerer Zeit in einer steriltechnisch optimierten und vor allem geschlossenen Prozeßanlage durchgeführt wird, erfolgt die Abfüllung sämtlicher Fertigspritzen (Ab-

füllchargen) aus demselben Behältnis. Daher ist es für die Gewährleistung der Produktsicherheit ausreichend, den Test auf Pyrogenität von nur einer Abfüllcharge durchzuführen.

Diese Änderungsmeldung wurde ebenfalls an alle Zulassungsbehörden weitergeleitet.

Ab Juni 1997 wird der Test nur mehr an einer Abfüllcharge durchgeführt.

- ▶ Einsparung: mindestens 300 Kaninchen pro Jahr

3.2 Validierte Alternativmethode, deren Änderungsantrag bei den Zulassungsbehörden aufliegt

3.2.1 Freisein von lebenden FSME-Viren nach Inaktivierung

Testmethode mit Versuchstieren

Test in Mäusen und Babymäusen

In 20 Babymäuse wird die Probe direkt intraperitoneal und intracerebral injiziert, und in 10 Babymäuse und 15 erwachsene Mäuse werden Proben nach Vermehrung in Gewebekulturzellen intraperitoneal und intracerebral injiziert.

Die Beobachtungszeit beträgt 21 Tage, und falls ein Tier stirbt, muß eine Passage durchgeführt werden (gleiche Durchführung wie oben, Probe ist Gehirn und Leberhomogenisat der verstorbenen Maus).

- ▶ Belastung der Versuchstiere: hoch

Alternativtestmethode ohne Versuchstiere
Zellkulturvermehrungsschritt mit anschließendem Plaquetest auf porcine-stable-Zellen

Die Proben werden mit Natriumbisulfit neutralisiert und auf einer permanenten (Vero) und einer primären (*chicken embryo cells*) Zellkultur inkubiert. Die Überstände werden nach 10 Tagen im Plaque-test (siehe 3.1.2) auf lebende FSME-Viren ausgetestet.

Validierung der Alternativmethode

Basierend auf folgender theoretischen Annahme kann die Nachweisgrenze rechnerisch ermittelt werden und zeigt direkte Abhängigkeit vom Probenvolumen.

1. 1 pfu (*plaque forming unit*) ist ausreichend, um die Zellkultur zu infizieren und während der Inkubationsperiode leicht meßbare Virustiter zu erzeugen.
2. Die Anzahl pfu im Probenvolumen besitzt eine Poissonverteilung. Die Nachweisgrenze entspricht somit jener Konzentration im Testmaterial, bei der mit 95%iger Wahrscheinlichkeit im Probenvolumen mindestens 1 pfu auftritt.

Die theoretische Annahme wurde durch das Validierungsexperiment bestätigt.

Zusammenfassung der Validierung

1. Die Inkubation der Probe in der Gewebekultur von 10 Tagen ist ausreichend, um auch sehr niedrige Virustiter im Ausgangsmaterial detektieren zu können. In Abhängigkeit vom Virustiter im Ausgangsmaterial wurden nach Gewebekultur mindestens 10^1 pfu/ml (Virustiter im Ausgangsmaterial $< 0,07$ pfu/ml) und maximal 10^7 pfu/ml (Virustiter im Ausgangsmaterial $\geq 0,5$ pfu/ml) erreicht.
2. Die Nachweisgrenze des Testsystems ist abhängig vom Probenvolumen. 30 ml Probe sind erforderlich, um 0,1 pfu/ml sicher und reproduzierbar nachweisen zu können.
3. Die Testung der Gewebekulturüberstände kann ohne Einschränkung der Nachweisgrenze nach Chargen gepoolt durchgeführt werden.

Da das Testsystem in der Lage ist, mit einem Probenvolumen von 30 ml mindestens 0,1 pfu/ml nachzuweisen, und das empfindlichste Testsystem mit Tieren nur 40 pfu/ml nachweisen kann, ist das neue Testsystem 400fach empfindlicher.

Die Änderungsmeldung wurde Ende 1996 an die österreichischen und deutschen Zulassungsbehörden zur Prüfung weitergeleitet und wartet auf die Genehmigung.

- ▶ Einsparung: mindestens 10.000 Babymäuse pro Jahr

mindestens 7.000 erwachsene Mäuse pro Jahr

4 Diskussion

Der FSME-Impfstoff kam in Österreich 1979 erstmals auf den Markt. Da es damals keine Zulassung für Impfstoffe in Österreich gab und jedes Lot nur chargenweise freigegeben wurde, waren die Anforderungen an die Qualitätskontrolle beim Hersteller sehr hoch. Eine Testmethode, die mit Versuchstieren durchgeführt wurde, mußte zu dieser Zeit nicht validiert werden. Es erforderte daher viel Mühe, einen nicht validierten Tierversuch zu streichen oder durch eine validierte Alternativmethode zu ersetzen, da es oft gar keine Möglichkeit gibt, den Tierversuch zu validieren. Zusätzlich erfordert jede Testmethode, die neu etabliert werden soll, oft hohe Ausrüstungs- und Laborkosten, verbunden mit vermehrtem Personaleinsatz.

Die Einhaltung des 3 R-Konzeptes war immer oberstes Ziel in den Qualitätskontrolllabors der Immuno AG. Jede Einsparung von Tieren, die durch Umstellung einer Testmethode möglich wird, ist auch mit einem großen wirtschaftlichen Nutzen

verbunden. Die benötigten Budgetmittel für die Entwicklung und Validierung einer neuen Testmethode konnten dadurch gerechtfertigt werden. Da Tierversuche zu den biologischen Testsystemen zählen, die nicht immer mit der gleichen Präzision arbeiten wie analytische Testmethoden, ist es auch im Sinne der Qualitätssicherung, auf Tierversuche zu verzichten.

Zum frühestmöglichen Zeitpunkt wurde der Tierversuch, der die höchste Belastung für die Versuchstiere brachte (Virus-titerbestimmung mit LD₅₀), eingespart.

Inzwischen ist ein Großteil der Tierversuche eingespart worden. Der Pyrogentest ist aber an mehreren Stufen der Produktion unbedingt erforderlich, da der LAL-Test nur Verunreinigungen von Gram-negativen Bakterien nachweisen kann, und durch die Verwendung von primären Hühnerembryonalzellen kann es auch zu Verunreinigungen mit Gram-positiven Bakterien kommen.

In Tabelle 2 ist eine Übersicht über den Versuchstierverbrauch für Forschung und Entwicklung und für die gesetzlich vorgeschriebenen Chargentestungen von 1990-1996 im Biomedizinischen Forschungszentrum in Orth/Donau dargestellt.

Die Rückgänge sind auf die konsequente Einhaltung der 3 R, sowohl in Forschung und Entwicklung von Impfstoffen und Genprodukten, als auch bei der Qualitätskontrolle der Impfstoffe und Blutprodukte zurückzuführen.

Durch die Erstzulassung des FSME-Impfstoffes in Österreich hat die österreichische Zulassungsbehörde die größte Erfahrung mit FSME-Impfstoffen. Durch enge Zusammenarbeit mit dem Verfasser konnte auch auf den Monographientwurf für FSME-Impfstoffe Einfluß genommen werden. In diesem Entwurf ist der Test auf Freisein von lebenden FSME-Viren nach Inaktivierung laut unserer Änderungsanzeige aufgenommen, obwohl die Änderungsanzeige für den zugelassenen Impfstoff noch nicht genehmigt ist. Da der Impfstoff bei den verschiedenen nationalen Zulassungsbehörden (wie zum Beispiel Österreich, Deutschland, Schweiz, Frankreich, Holland, Tschechien, Ungarn, Ukraine und die baltischen Staaten) registriert ist, und das Qualitätskontrollprogramm zu den Registrierungsunterlagen gehört, muß für jede größere Teständerung eine Änderungsanzeige gemacht werden, die melde- oder genehmigungspflichtig ist und an alle nationalen Zulassungsbehörden

Tabelle 3: Übersicht über bereits durchgeführte und geplante Einsparungen von Versuchstieren in der Qualitätskontrolle von FSME-Impfstoff. * = wenn die im Text unter 3.2 erwähnte Änderungsanzeige von den Zulassungsbehörden genehmigt ist.

Zeitraum	Gesamtanzahl der verwendeten Versuchstiere		Erparnis an Versuchstieren pro Jahr	
	pro Impfstofflot	pro 1.000 Dosen	pro Teständerung	Gesamt
bis 1984	4.278	9,5	0	0
ab 1984	4.198	9,3	1.200	1.200
ab 1989	2.658	5,9	23.100	24.300
ab 1990	2.208	4,9	6.750	31.050
ab 1993	2.133	4,7	1.125	32.175
ab 1996	2.088	4,6	675	32.850
ab 6/1997	2.011	4,5	1.155	34.005
ab Herbst 1997*	961	2,1	15.750	49.755
Ende 1998 für FSME-ImmunCC	531	1,2	6.450	56.205

den verschickt wird. Das ergibt oft Verzögerungen, bis alle Übersetzungen verfügbar sind und weitergeleitet werden.

Da die Immuno AG 1997 den Antrag auf Zulassung eines neuen FSME-Impfstoffes (FSME-IMMUN-CC®) im dezentralen Verfahren mit gegenseitiger Anerkennung in der EU stellen wird, haben wir ein neues Qualitätskontrollprogramm erarbeitet, das nur mehr die, unserer Meinung nach, absolut notwendigen Tierversuche beinhaltet. In Tabelle 3 ist auch eine Übersicht über die Einsparung von Versuchstieren für den neuen FSME-Impfstoff gegeben.

Mit diesem neuen Kontrollprogramm, das auch die Fremdviorentestung am *plain pool* (siehe Tabelle 1) durch einen Zellkulturtest ersetzt, würden pro Impfstofflot nur mehr 531 Tiere verwendet werden. Bei der erwarteten Neuzulassung des Impfstoffes (Mitte bis Ende 1998) würden im Kontrollprogramm nur mehr für den Pyrogentest und den Mauspotencytest Tiere verwendet werden.

Da bei Impfstoffen der Nachweis der Wirksamkeit im Menschen meist nur über serologische Ergebnisse oder eine Statistik erbracht werden kann, und es bei FSME ein gut validiertes und reproduzierbares Challengemodell gibt, ist dieses auch in dem neuen Monographieentwurf vorgeschrieben und essentieller Bestandteil der Freigabe.

Dieser Qualitätskontrolltest ist der einzige, der mit einer hohen Belastung für die (nicht geschützten) Versuchstiere verbunden ist. Inzwischen wurde diese Testmethode dahingehend standardisiert, daß die Tiere öfter kontrolliert und beim ersten Anzeichen von Krankheitssymptomen (Einschränkung der allgemeinen Motorik) schmerzlos getötet werden. Diese Änderung hatte keine Auswirkung auf das Testergebnis und bringt sicher eine wesentliche Reduktion der Belastung der Versuchstiere.

Seit einigen Monaten wird die Virustitration des Challengevirus zusätzlich im Plaquetest ausgetestet. Die ersten Ergebnisse waren leider nicht so überzeugend wie erwartet, aber wir hoffen trotzdem, in Zukunft die Virustitration in Mäusen durch einen Plaquetest ersetzen zu können.

Der Pyrogentest ist mit einer geringen Belastung für die Versuchstiere verbunden und aus Sicherheitsgründen zur Produktfreigabe unbedingt erforderlich.

Abschließend soll noch einmal darauf hingewiesen werden, daß ein Großteil der Tierversuche, die in Tabelle 1 aufgezählt sind, von der österreichischen Zulassungsbehörde bei den ersten Chargenfreigaben (1979) verlangt wurde. Nur die Erfahrung, daß der seit über 15 Jahren in Österreich verkaufte Impfstoff (durchschnittlich 3-5 Millionen Impfdosen pro Jahr) so gut verträglich und sicher ist, und die hohe Qualität der eingereichten Alternativmethoden haben es ermöglicht, daß in dem neuen Monographieentwurf so wenig Tierversuche gefordert sind.

Das Umdenken bezüglich Tierversuche in der Qualitätskontrolle von Impfstoffen läßt die Impfstoffhersteller für künftige Neuzulassungen hoffen, daß nur mehr absolut notwendige Tierversuche verlangt werden. Auch die gegenseitige Anerkennung von Zulassungen in der EU ist dabei eine große Hilfe.

Literatur

- Cußler, K. (1996). Europäische Arzneibuchkommission streicht Prüfung auf anomale Toxizität aus einigen Monographien. *Altex* 13, 28.
- De Madrid, A. T. and Porterfield, J. S. (1969). A Simple Micro-culture Method for the Study of Group B Arboviruses. *Bull. Org. mond. Santé, Bull. WHO* 40, 113-121.
- De Madrid, A. T. and Porterfield, J. S. (1974). The Flaviviruses (group A arboviruses): a cross-neutralization study. *J. gen. Virol.* 23, 91-96.
- Europäische Pharmakopöe (1997). 3rd ed.
- Heinz, F. X., Kunz, C. and Fauna H. (1980). Preparations of a highly purified vaccine against tick-borne encephalitis by continuous flow zonal ultracentrifugation. *J. Med. Virol.*, 6, 213-221.
- Kanda Inoue, Y. and Ogura, R. (1962). III. Propagation and Assay of Japanese B Encephalitis Virus in a Stable Line of Porcine Kidney Cells. *Virology*, Vol. 16, 205-207.
- Kärber, G. (1931). Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch. exp. Path. Pharmak.*, Vol. 162, 480-487.
- Kunz, C., Hofmann, H. and Stary, A. (1976). Field studies with a new tick-borne encephalitis (TBE) vaccine. *Zentralbl. Bakteriol. Hyg. J. Abt. Orig. A*, 243, 141-144.
- Kunz, C., Heinz, F. X. and Hofmann, H. (1980). The efficiency of vaccination against tick-borne encephalitis. *Wien Klin. Wochenschr.*, 92, 809-813.
- Kunz, C., Heinz, F. X. and Hofmann, H. (1980). Immunogenicity and reactogenicity of a highly purified vaccine against tick-borne encephalitis. *J. Med. Virol.*, 6, 103-109.
- Kunz, C. (1981). Immunoprophylaxis of encephalitis. In Kunz, C. (ed), *Tick-Borne Encephalitis* (1-21). Wien, Facultas Verlag.
- Österreichisches Bundesgesetzblatt (1996). 379. Bundesgesetz, mit dem das Arzneimittelgesetz (AMG, Novelle 1996) geändert wird.
- Pharmeuropa (1997). Tick-borne encephalitis vaccine (inactivated). *Vol. 9, No. 1*, 18-20
- Russell, P. K., Nisalak, A. and Sukhavachana, P. (1967). A Plaque Reduction Test for Dengue Virus Neutralizing Antibodies. *The Journal of Immunology* 2, 285-290.
- Tierversuchsgesetz (1988). Österr. Bundesgesetzblatt 501. Bundesgesetz vom 27.9.1989 über Versuche an lebenden Tieren.
- Wang Lee, H., Hinz, R. W. and Scherrer, W. F. (1958). Porcine Kidney Cell Cultures for Propagation and Assay of Japanese Encephalitis Virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, Vol. 99, 579-583.
- WHO Expert committee on biological standardization (October 1995). Summary protocol for production and testing of virus vaccines. *WHO*, 1-15.

Korrespondenzadresse

Dr. Susanne Schober-Bendixen
Fa. Immuno AG
Uferstraße 15
A-2304 Orth/Donau