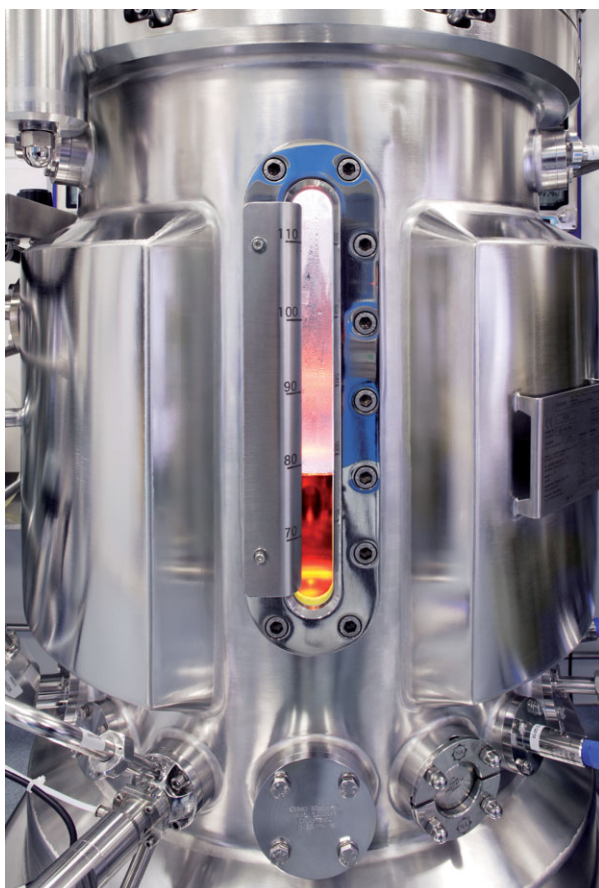


„The process is the product“

Herstellung und Qualitätskontrolle von Impfstoffen

MICHAEL PFLEIDERER

Der Nutzen von Impfstoffen zur Prophylaxe von Infektionskrankheiten wurde bereits vor mehr als 200 Jahren wissenschaftlich belegt. In der Folge wurden seit den Tagen Edward Jenners, der 1798 überzeugend darstellen konnte, dass Kuhpocken am Menschen zum Schutz vor Pockenvirusinfektionen angewendet werden können, fortwährend neue oder optimierte Impfstoffe entwickelt. Dadurch haben viele der ansonsten lebensbedrohlichen viralen und bakteriellen Infektionskrankheiten heute ihren Schrecken verloren.



Medium zur Zellvermehrung im Fermenter.
(Quelle: Novartis Behring)

Historisches

Die Entwicklung neuer Impfstoffe war und ist in der Regel von vielen Komplikationen begleitet und es bedarf eines enormen technischen, wissenschaftlichen und wirtschaftlichen Aufwandes, um auf diesem Gebiet erfolgreich tätig zu sein. In vielen Fällen waren auch bahnbrechende Vorbereitungsarbeiten zur Überbrückung technologischer Lücken notwendig, bevor theoretische Konzepte erfolgreich in die Praxis umgesetzt werden konnten. So ist es nicht verwunderlich, dass im 19. Jahrhundert lediglich vier Impfstoffe (Tollwut, Typhus, Cholera, Pest) und im 20. Jahrhundert nur wenig mehr, nämlich sieben Impfstoffe (Tuberkulose, Gelbfieber, Keuchhusten, Influenza, Fleckfieber, Diphtherie, Tetanus), entwickelt werden konnten.

Der eigentliche Durchbruch in der Impfstoffentwicklung war erst nach dem zweiten Weltkrieg zu verzeichnen – mit der Entwicklung von mehreren Dutzend neuer Impfstoffe, die in der breiten Palette der heute verfügbaren Impfstoffe ihren vorläufigen Höhepunkt findet. Insbesondere die Entwicklung neuer Kulturmedien zur Vermehrung der für die Impfantigenproduktion benötigten Bakterien- oder Virusstämme, die Verbesserung der Zellkulturtechniken und die rasant fortschreitende Technisierung der industriellen Herstellungsstätten ermöglichten die Produktion von immer komplexer werdenden Einzel- und Kombinationsimpfstoffen.

Natürlich waren diese Entwicklungsschritte oft von Rückschlägen begleitet, in einigen Fällen sogar zum Schaden der Impflinge. Die berühmtesten Beispiele sind wohl die unzureichende Inaktivierung der ersten Generation von Polioimpfstoffen in den 1950er Jahren oder, wenig später, die Verunreinigung primärer Affennierenzellen zur Produktion von Polioimpfstoffen mit dem SV40-Virus. Viele andere kleinere und größere „Unfälle“ während der Entwicklung und Herstellung von Impfstoffen haben letztendlich unser heutiges Verständnis der „Qualität“ von Impfstoffen geprägt. Diese recht statisch anmutende Bezeichnung beschreibt jedoch ein dynamisches Prinzip aus sich immer weiter entwickelnden Kontrollmechanismen, die zur Überwachung des Herstellungsprozesses und des Produktes notwendig sind. Es stellt in den Vordergrund, dass Impfstoffe zur Prophylaxe an gesunde Personen verabreicht werden und dass unzumutbare Nebenwirkungen, bedingt durch

eine unzureichende Qualität von Impfstoffen, auf jeden Fall vermieden werden müssen, um dem Impfgedanken keinen Schaden zuzufügen.

Biologische Arzneimittel

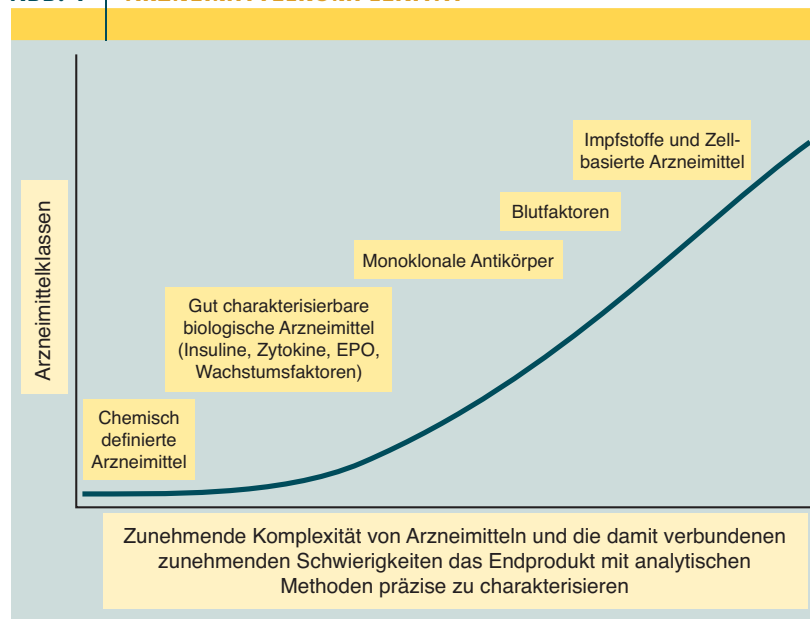
Die Definition „biologische Arzneimittel“ ist als Unterscheidung zu den „chemisch definierten“ Arzneimitteln zu sehen. Die Definition beinhaltet die Aussage, dass biologische Arzneimittel entweder aus biologischen Ausgangsmaterialien extrahiert werden, z.B. Gerinnungsfaktoren aus menschlichem Blut oder Impfantigene aus Mikroorganismen, oder mithilfe von biologischen Systemen hergestellt werden, z.B. unter Verwendung von Gewebekulturzellen. Es gibt unterschiedliche Vorstellungen, was unter der Definition „biologisches Arzneimittel“ denn genau zu verstehen ist. Alle gehen jedoch von der Grundlage aus, dass hiermit grundsätzlich Proteine gemeint sind, die mithilfe der gerade beschriebenen Techniken hergestellt werden.

Antibiotika, Vitamine und andere (niedermolekulare) Substanzen, die nicht proteinöser Natur sind, aber mittels Fermentation von Mikroorganismen hergestellt werden, zählen nicht zur Gruppe der biologischen Arzneimittel, bzw. Substanzen. Allerdings muss an dieser Stelle angemerkt werden, dass diese Einschätzung ständigen Änderungen unterworfen ist: So werden z.B. Heparine trotz ihrer Polysaccharidstruktur mittlerweile auch zu den biologischen Arzneimitteln gezählt – zumindest wendet man dasselbe regulatorische Rahmenwerk an.

Auch wenn hier keine Aussage gemacht werden soll, ob nun die biologischen oder die chemisch definierten Arzneimittel komplexeren Herstellungsmethoden unterliegen, so ist doch klar, dass die Charakterisierung des Endproduktes bei den chemisch definierten Arzneimitteln viel einfacher zu vollziehen ist als bei einem biologischen Arzneimittel. Im Allgemeinen ist bei den chemisch definierten Arzneimitteln die Molekularstruktur des Wirkstoffs bekannt und mit physiko-chemischen Methoden nachweisbar. Mit der gleichen Methodik können Verunreinigungen, die aus dem Herstellungsprozess resultieren, nachgewiesen werden. Im Endeffekt bedeutet dies, dass der Herstellungsprozess für chemisch definierte Arzneimittel zwar genau überwacht, jedoch nicht unbedingt durch enge und zahlreiche Spezifikationen beschrieben werden muss, um eine akzeptable Qualität herzustellen. Entscheidend ist die Analyse des Endproduktes. Entspricht diese den in der Zulassung beschriebenen Spezifikationen, kann das Produkt für den Verkehr freigegeben werden.

Bei den biologischen Arzneimitteln stellt sich die Situation ganz anders dar. Aufgrund ihrer im Allgemeinen komplexen Struktur, resultierend aus der primären, sekundären und tertiären Proteinstruktur und vielen möglichen post-translationalen Modifikationen, können sie auf der Ebene des Endproduktes nur schwer oder kaum mehr charakterisiert werden. Je größer das Molekulargewicht eines biologischen Wirkstoffes ist und je aufwändiger Modifikationen der Primärstruktur sind (z.B. Glykosylierung, Bildung von

ABB. 1 ARZNEIMITTELKOMPLEXITÄT



Die zunehmende Komplexität der analytischen Darstellung verschiedener Arzneimittelklassen auf der Ebene des Endproduktes.

Disulfidbrücken, korrekte Faltung, Spaltung in Untereinheiten und vieles mehr), umso unwahrscheinlicher ist die verlässliche Charakterisierung auf der Ebene des Endproduktes. Dies gilt insbesondere für Impfstoffe, die zu den komplexesten biologischen Arzneimitteln zählen. Abbildung 1 versucht dies zu veranschaulichen.

Aus den genannten Gründen rückt die präzise Beschreibung des Herstellungsprozesses in den Mittelpunkt. Damit ist gemeint, dass alle Prozessparameter und Produktattribute über ein dichtes Netzwerk von Inprozesskontrollen und produktspezifischen Tests kontrolliert werden müssen. Je zahlreicher die Kontrollen und Tests und je enger die Spezifikationen für die Ergebnisse sind, umso mehr wird sichergestellt, dass jede produzierte Charge den Zulassungskriterien entspricht und somit von gleichbleibender Qualität ist. Man spricht unter diesen Bedingungen von einem konsistenten Herstellungsverfahren. Die unterschiedlichen Aspekte, die zu diesem Ziel führen, sollen abgestimmt auf die Impfstoffe, in den folgenden Abschnitten erläutert werden.

Gesetze und Leitfäden zur Sicherung der Qualität von Impfstoffen

Verschiedene Institutionen auf nationaler, europäischer und globaler Ebene beschäftigen sich seit vielen Jahrzehnten mit gesetzlichen und wissenschaftlichen Regelungen zur Sicherstellung der bestmöglichen Qualität von Arzneimitteln. Die rasante technische Weiterentwicklung von Herstellungsprozessen und Kontrollmethoden oder neue Erkenntnisse über mögliche Gefährdungen der Qualität von Arzneimitteln (siehe TSE-Problematik im Abschnitt „Kontrolle der Roh- und Ausgangsmaterialien“) machen die per-

manente Anpassung der Regelwerke an diesen Fortschritt notwendig. Bei Gesetzestexten, z.B. dem Arzneimittelgesetz (AMG), ist dies ein umständlicher Prozess, der einem eher langfristigen Prozedere unterliegt. Rechtsverordnungen lassen dringend notwendige und gesetzlich verbindliche Kriterien zur Sicherstellung der Qualität von Arzneimitteln auch außerhalb der Novellierungen des AMG zu.

Wesentlich flexibler ist das System der wissenschaftlichen Leitfäden (*Guidelines*), die dem Stand des Wissens jederzeit und zügig angepasst werden können. Sie besitzen nicht die Kraft des Gesetzestextes, werden aber allgemein beachtet und kaum umgangen. Sie finden in der Regel internationale Anwendung. Für neue Leitfäden zur Regelung der Qualität von Impfstoffen und für die Anpassung der bereits bestehenden sind unterschiedliche, international besetzte Gruppierungen verantwortlich. Auf europäischer Ebene ist hier sicherlich die *Biologics Working Party* (BWP) des *Committee for Human Medicinal Products* (CHMP; Ausschuss für Humanarzneimittel), der in London ansässigen EMA (*European Medicines Agency*; Europäische Arzneimittelagentur) federführend tätig. Die ständig erweiterte Sammlung der derzeit relevanten Leitfäden zur Qualität von Impfstoffen und anderen biologischen Arzneimitteln ist im Internet abrufbar [1]. Die CHMP *Vaccine Working Party* (VWP) der EMA beschäftigt sich mit der Erstellung von multidisziplinären Leitfäden, die den Bezug zu präklinischen und klinischen Aspekten der Impfstoffprüfung herstellen [2].

Das *European Department for the Quality of Medicines* (EDQM) mit Sitz in Straßburg befasst sich neben der Pflege der Europäischen Pharmakopoea, mit ihrer Vielzahl von allgemeinen und spezifischen Texten und Monographien zur Herstellung von Impfstoffen [3], auch mit der Erstellung von Leitlinien zur Chargenprüfung von Impfstoffen, den *batch release guidelines* [4].

Die Leitfäden der Weltgesundheitsorganisation (WHO) für Impfstoffe, die so genannten *Technical Report Series* (TRS) *Vaccines* [5] sowie die Leitfäden der *International Conference on Harmonization* (ICH) [6] vervollständigen die derzeit von den Behörden und Impfstoffherstellern angewendeten wissenschaftlichen Grundlagen zur Sicherstellung der Qualität von Impfstoffen und anderen biologischen Arzneimitteln.

In Anbetracht der Vielzahl der Leitfäden und der zuständigen Gremien, die für deren Erstellung und Pflege zuständig sind, ist es wichtig zu verstehen, dass Leitfäden mit gleicher Thematik komplementäre und keine gegensätzlichen Informationen beinhalten. Lediglich die Fokussierung mag unterschiedlich sein, so muss beispielsweise ein WHO-Leitfaden globaler und damit auch etwas allgemeiner ausgelegt sein als ein EU- oder ein nationaler Leitfaden.

Letztendlich schreiben die gesetzlichen Vorgaben, wie ein Zulassungsantrag für einen Impfstoff zu gestalten ist, vor, dass sich die Impfstoffhersteller, aber auch die zuständigen Behörden, an die genannten Leitlinien halten müssen. Ein Zulassungsantrag, heute *Common Technical Document* (CTD) genannt, ist ein in der EU, in Japan und in den USA

gleichermaßen anerkanntes Dokument und besteht aus fünf Modulen. Im Modul 3 müssen alle Angaben zum Herstellungsverfahren gemacht werden, aus denen sich für die Zulassungsbehörden die konsistent hohe Qualität eines Impfstoffs oder eines anderen biologischen Arzneimittels erkennen und bewerten lässt.

Viele der gesetzlichen Grundlagen zur Regulierung der Herstellung, Prüfung, Zulassung und des Verkehrs mit Arzneimitteln sind mittlerweile innerhalb der EU vereinheitlicht. EU-Verordnungen besitzen unmittelbare Gültigkeit, EU-Richtlinien müssen innerhalb eines bestimmten Zeitraums in die nationale Gesetzgebung zur Regulierung von Arzneimitteln, in Deutschland in der Regel das AMG, integriert und somit umgesetzt werden. Die vollständige EU-Arzneimittelgesetzgebung (*The Rules Governing Medicinal Products in the European Union*) ist auf der Homepage des EU-Generaldirektorats für Handel und Industrie einsehbar [7].

Wichtig ist an dieser Stelle zu verstehen, dass dieses komplexe Regelwerk auch von den Herstellern als hilfreich und nicht als behördliche Gängelung verstanden wird. Dies mag daran liegen, dass allen Parteien Gelegenheit zur Kommentierung gegeben wird, bevor eine Regelung in Kraft tritt.

Grundlagen zu den Herstellungsprozessen für Impfstoffe

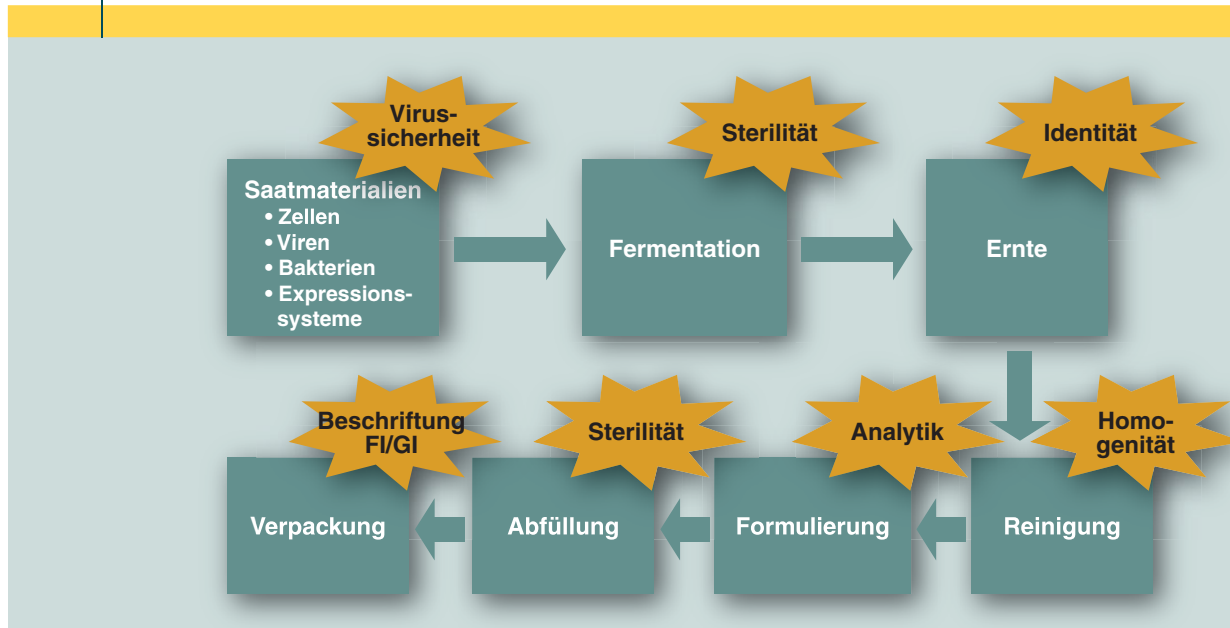
Die industrielle Herstellung von Impfstoffen gliedert sich in mehrere charakteristische Prozessschritte, die dem jeweiligen Impfantigen individuell angepasst werden. In Verbindung mit der im zweiten Abschnitt beschriebenen Test- und Kontrollmethodik ergibt sich die Einzigartigkeit eines beliebigen Herstellungsprozesses, was in der Konsequenz bedeutet, dass zwei Herstellungsprozesse unterschiedlicher Hersteller, selbst für das gleiche Impfantigen, nicht miteinander vergleichbar sind. Sie können zu vollkommen unterschiedlichen Qualitäten und klinischen Leistungsmerkmalen führen. Deswegen werden alle regulatorischen (= behördlichen) Maßnahmen produktspezifisch getroffen – und nur in Ausnahmefällen für eine Produktklasse oder gar alle Impfstoffe. Die zuletzt genannten generischen Ansätze beziehen sich zumeist auf Informationen in der Fach- und Gebrauchsinformation, die für alle Impfstoffe relevant sind.

Moderne Herstellungsprozesse für Impfstoffe gliedern sich, wie schon erwähnt, in die folgenden charakteristischen Teilschritte auf,

- die Fermentation der Mikroorganismen, die zur Erzeugung des Impfantigens benötigt werden;
- die Reinigung der Impfantigene;
- (die Inaktivierung oder Detoxifizierung der Impfantigene);
- die Formulierung und Abfüllung des Endproduktes.

Innerhalb dieser Teilschritte gibt es natürlich weitere Verfahrensschritte, die letztendlich zu einem hochreinen Impfantigen führen, das nur noch Spuren von prozess- und produktspezifischen Verunreinigungen enthält. In Abbildung

ABB. 2 | PRINZIP DER IMPFSTOFFHERSTELLUNG



Verallgemeinerter Ablauf der Impfstoffherstellung mit selektierten Kontrollen zur Überprüfung der Qualität der Zwischenprodukte und des Endproduktes. FI/GI = Fach- und Gebrauchsinformation.

2 sind die am häufigsten vorkommenden Prozessschritte exemplarisch zusammengefasst, zusammen mit einigen charakteristischen produktspezifischen Kontrollen, die bei diesen Schritten besonders interessieren.

Die Kontrolle der Roh- und Ausgangsmaterialien

Die Qualität von Impfstoffen hängt in hohem Maße von den verwendeten Roh- und Ausgangsmaterialien ab. Aus diesem Grunde werden diese, als weitere Besonderheit der biologischen Arzneimittel, als Teil des Herstellungsprozesses betrachtet. Rohmaterialien sind alle Substanzen, die zur Herstellung benötigt werden, vom einfachen Natriumchlorid bis hin zu hochkomplexen chemisch definierten Medien zur Gewebekultur für die Anzucht von Impfviren oder für die Vermehrung von Bakterien- oder Hefekulturen zur Gewinnung von Impfantigenen. Sie alle müssen hohen Anforderungen gerecht werden und ihre Herstellung muss denselben strengen Kontrollen unterliegen wie die Herstellung der Impfantigene selbst.

Eine besondere Rolle spielen Rohmaterialien tierischen oder menschlichen Ursprungs. Seit dem Höhepunkt der BSE-Krise, die etwa von Anfang der 1990er Jahre bis etwa 2005 andauerte, hat man sehr intensiv an der Etablierung von Kontrollmechanismen gearbeitet, die verhindern sollten, dass der BSE-Erreger über kontaminierte Substanzen, die zur Impfstoffherstellung oder zur Herstellung anderer Arzneimittel benötigt werden, insbesondere durch die Verwendung von Substanzen aus Rindern oder Schafen, massenhaft Einzug in die menschliche Population hält. Die Prinzipien zur bestmöglichen Minimierung dieses Risikos sind in einem TSE-Leitfaden (TSE = *Transmissible Spongiform*

Encephalopathy) – „Leitfaden für die Minimierung des Risikos der Übertragung von Erregern der spongiformen Enzephalopathie tierischen Ursprungs durch Human- und Tierarzneimittel“ – niedergelegt [8], der auch Teil der gesetzlich verbindlichen Vorschriften des europäischen Arzneibuchs ist (Chapter 5.2.8 *Minimising the risk of transmitting animal spongiform encephalopathy agents via human and veterinary medicinal products*).

Ähnlich strenge Auflagen gelten für Substanzen, die aus anderen Tierspezies gewonnen werden, z.B. Trypsin aus Schweinepankreas, oder dem Menschen, z.B. humanes Serumalbumin.

In einigen Fällen wurden zur vollständigen Vermeidung solcher Risiken Substanzen tierischen Ursprungs, die in den Herstellungsprozessen für Impfstoffe eingesetzt werden, durch gleichwertige Substanzen pflanzlichen Ursprungs ersetzt, z.B. Detergenzien wie etwa Tween.

Als Ausgangsmaterialien werden bei der Impfstoffherstellung alle Komponenten bezeichnet, die zur Extraktion oder zur Vermehrung der Impfantigene benötigt werden. Für die bakteriellen Impfstoffe sind dies die entsprechenden Impfstämme, für die viralen Impfstoffe sind dies geeignete Zellkulturen und Virusstämme, für die rekombinanten Impfstoffe sind dies bakterielle, virale oder Hefebasierte gentechnisch veränderte Vektoren (Expressionssysteme), die das klonierte Gen des Impfantigens exprimieren.

Die mikrobiologische Sicherheit von Ausgangsmaterialien zur Herstellung von Impfstoffen

Zellsubstrate und Mikroorganismen zur Impfstoffherstellung müssen strengen mikrobiologischen Auflagen bezüg-

MINIMIERUNG DES RISIKOS DER ÜBERTRAGUNG VON ERREGERN DER SPONGIFORMEN ENZEPHALOPATHIE TIERISCHEN URSPRUNGS DURCH HUMAN- UND TIERARZNEIMITTEL (PH.EUR. 5.2.8)

Tierkörperteile, Körperflüssigkeiten und Sekrete als Ausgangsmaterial

Bei von TSE befallenen Tieren sind die unterschiedlichen Organe und Sekrete unterschiedlich infektiös. Die Gewebe werden ungeachtet des Krankheitsstadiums in drei Infektiositäts-Hauptkategorien unterteilt:

- Kategorie A Hohe Infektiosität des Gewebes**
Gewebe des zentralen Nervensystems (ZNS), das in den letzten Stadien aller TSE-Erkrankungen einen hohen Infektiositätstiter erreicht, sowie bestimmtes Gewebe, das anatomisch mit dem ZNS in Verbindung steht.
- Kategorie B Mäßige Infektiosität des Gewebes**
Peripheres Gewebe mit positivem Befund bei der Prüfung auf Infektiosität und/oder PrP^{Sc} bei zumindest einer TSE-Form.
- Kategorie C Keine nachweisbare Infektiosität des Gewebes**
Gewebe, da mit negativem Befund auf Infektiosität geprüft wurde, das heißt, dass keine Infektiosität und/oder kein PrP^{Sc} nachgewiesen werden konnte.

PrP^{Sc}: abnormale Isoform des Prionproteins (PrP), das als der für die Übertragung der TSE-Erkrankung verantwortliche Erreger gilt.

Tiere als Ausgangsmaterial

Geographische Herkunft der Tiere bei Materialien von Rindern

Die Klassifizierung des geographischen BSE-Risikos (GBR) des Wissenschaftlichen Lenkungsausschusses gibt einen Hinweis auf die Wahrscheinlichkeit, dass in einem Land oder einer Region eine klinische oder präklinische BSE-Infektion bei einem oder mehreren Rindern auftritt. Die folgende Tabelle enthält die Definition der vier Kategorien:

GBR-Kategorie	Auftreten einer klinischen oder präklinischen BSE-Infektion bei einem oder mehreren Rindern in einem Land oder einer Region
I	höchst unwahrscheinlich
II	unwahrscheinlich aber nicht ausgeschlossen
III	wahrscheinlich, aber nicht bestätigt beziehungsweise bestätigt bei niedriger Inzidenz
IV	bestätigt bei hoher Inzidenz*
*≥ 100 BSE-Fälle/1 Million ausgewachsene Rinder je Jahr	

Berichte über die GBR-Bewertung der einzelnen Länder stehen auf der WLA-Internetseite (http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/outcome_en.html) zur Verfügung. Falls der WLA den BSE-Status eines Landes nicht klassifiziert hat, ist eine Risikobewertung vorzulegen, welche die WLA-Kriterien für die GBR-Klassifikation berücksichtigt.

lich ihrer Sicherheit genügen. Unter Sicherheit versteht man in diesem Fall die sichergestellte Abwesenheit von Fremdkeimen in den bakteriellen, Hefe-basierten oder viralen Saatmaterialien sowie in den Zellbänken, die zur Virusvermehrung verwendet werden. Die Reinheit von bakteriellen und Hefe-basierten Saatmaterialien lässt sich mit relativ einfachen Methodiken und Testverfahren sicherstellen. Geeignete Verfahren hierzu sind die Inokulation in selektiv wirkende Medien, die Identifizierung über Kolonienmor-

phologien, die mikroskopische Analyse von Gramfärbungen oder die Identitätsanalyse über spezifische Antiseren. Die einschlägigen Pharmakopoea-Monografien für bakterielle und Hefe-basierte rekombinante Impfstoffe geben die anzuwendende Methodik im Detail wieder.

Wesentlich aufwändiger ist der Nachweis der Freiheit von Fremdviiren in den Ausgangsmaterialien zur Herstellung von Virusimpfstoffen. Während kontaminierende Hefen und Bakterien über Inkubationstests in geeigneten Medien bestätigt oder ausgeschlossen werden können, ist der Ausschluss von Fremdviiren in den Virus-Saatmaterialien und den Zellbänken nur über komplexe *In-vitro*- und *In-vivo*-Testverfahren zu bewerkstelligen. Die größte Schwierigkeit ergibt sich dabei aus der Verfügbarkeit geeigneter Antiseren zur Neutralisierung der eigentlichen Impfviren, denn diese müssen zunächst „ausgeschaltet“ werden, damit sie mögliche Aktivitäten von Fremdviiren nicht maskieren. Anschließend lässt sich über die Inokulation der Virus-Saatmaterialien in juvenile und adulte Mäuse und Meerschweinchen sowie in geeignete Gewebekulturen im Allgemeinen jede Art von viraler Kontamination feststellen. Neben diesen unspezifischen aber sehr sensitiven Testsystemen setzt sich die PCR (*Polymerase Chain Reaction*) zur spezifischen Erkennung von Fremdviiren mehr und mehr durch.

Die gleichen Strategien werden zum Ausschluss von Viruskontaminationen in Zellbänken und Hühnereiern zur Produktion von Virusimpfstoffen angewendet. Die europäische Pharmakopoea widmet diesem wichtigen Qualitätsaspekt eigene Kapitel (2.6.16. *Tests for extraneous agents in viral vaccines for human use*; 5.2.2. *Chicken flocks free from specified pathogens for the production and quality control of vaccines*; 5.2.3. *Cell substrates for the production of vaccines for human use*).

Ähnliche Texte werden von der EMEA, der WHO und der ICH bereitgehalten.

Für die Rohmaterialien zur Impfstoffherstellung gelten die gleichen strengen Anforderungen im Bezug auf Sterilität und Virussicherheit. Oft ist es hier aber möglich, die geforderte Qualität über Sterilisation, Filtration oder Bestrahlung sicherzustellen.

Substanzen tierischen oder menschlichen Ursprungs, die in der Impfstoffproduktion eingesetzt werden, bergen das größte Risiko, Fremdviiren in einen Herstellungsprozess einzuschleppen. Insbesondere das zur Zell- und Viruskultur oft notwendige fötale Kälberserum (*fetal calf serum*; FCS) birgt ein großes Risiko der Kontamination mit bovinen Viiren. Die Bestrahlung des FCS, der Ersatz von FCS durch synthetische, also chemisch definierte Kulturmedien, und die damit verbundene Adaptation von Gewebekulturzellen an völlig serumfreie Kulturbedingungen sind erfolgreiche Strategien zur Minimierung des Risikos einer Viruskontamination durch tierische Seren.

Humanes Serumalbumin (HSA), das bisweilen als Stabilisator in Virusimpfstoffen verwendet wird oder zur Viruskultur benötigt wird, gilt als absolut virussicher, soweit es nach den Vorgaben der europäischen Pharmakopoea her-

gestellt wurde. Nur unter diesen Bedingungen darf es überhaupt in Impfstoffen eingesetzt werden. Um hypothetische Risiken, die mit der Verwendung von HSA verbunden sind, weiter zu minimieren, sind einige Hersteller dazu übergegangen, ihre Prozesse so zu optimieren, dass HSA nicht mehr benötigt wird oder durch rekombinantes humanes Albumin (rHA) aus rekombinanten Hefezellen ersetzt wird.

Die Tumorigenität von Gewebekulturzellen zur Virusvermehrung

Impfviren für Virusimpfstoffe können in primären Zelllinien (z.B. Hühnerembryofibroblasten, Affennierenzellen), kontinuierlichen menschlichen Zelllinien [z.B. MRC-5-Zellen, WI-38-Zellen (Embryonalzellen)], kontinuierlichen Säuger-Zelllinien [z.B. Verozellen (Affennierenzellen), MDCK-Zellen (Hundenierenzellen)] und Insekten-Zelllinien [z.B. Hi-5 (Schmetterlingsovarien)] vermehrt werden. Dies ist eine wesentlich besser kontrollierbare und sicherere Methode verglichen mit der früher praktizierten Virusvermehrung z.B. in Mäusehirnen (z.B. Tollwut-, FSME-, Japanische Enzephalitis-Impfstoffe) oder der Haut von Tieren (Pockenimpfstoffe).

Die Liste von weiteren Zelllinien, die sich durch gute Kultureigenschaften auszeichnen und eine optimale Virusreplikation erlauben, wird immer umfangreicher und damit auch der Diskussionsbedarf, welchen Kriterien diese neuen Zellsubstrate genügen müssen, damit sie für die Virusherstellung akzeptiert werden. Ein mögliches Risiko, das mit der Verwendung mancher Zelllinien in Verbindung gebracht wird, ist deren Eigenschaft, in Mäusen nach einer Inokulation Tumore zu erzeugen. Die noch vor wenigen Jahren vorherrschende Lehrmeinung schloss die Verwendung solcher Zellsubstrate für die Impfstoffherstellung kategorisch aus. Mittlerweile hat man sich aber von diesem Zwang befreit oder ist zumindest offen für Argumente, die auch im Mausmodell als tumorigen eingestufte Zelllinien als geeignete Substrate für die Herstellung von Humanimpfstoffen qualifizieren. Viele neue Erkenntnisse spielen hier eine tragende Rolle. Zum einen sind nur intakte Zellen tumorigen, lysierte Zellen oder deren gereinigte chromosomale DNA vermögen im Mausmodell in der Regel keine Tumoren mehr auszulösen. Zum anderen sind die heutigen Herstellungs- und Aufreinigungsmethoden so effizient, dass kaum mehr Wirtszellprotein und nur minimale Mengen von degradierter und somit nicht mehr funktionaler Wirtszell-DNA in das Endprodukt gelangen können, geschweige denn noch intakte Zellen. Es sind also diese Überlegungen, die unter Berücksichtigung der einzelnen Schritte des Herstellungsprozesses und der Impfstoffklasse die Verwendung von tumorigenen Zellsubstraten durchaus zulassen können.

Unverändert bestehen bleibt aber auch das Dogma, dass für Impfstoffe, die aufgrund ihrer Natur nur sehr milde Aufreinigungsschritte tolerieren – in erster Linie die lebend-attenuierten Impfstoffe –, nur nicht-tumorigene Zellsubstrate verwendet werden dürfen.

Von den Saatmaterialien zum Impfstoff

Die Herstellung von Impfstoffen beginnt mit definierten Ausgangsmaterialien, also den bakteriellen, Hefe-basierten oder viralen Saatmaterialien und den Gewebekulturbänken. Was die Impfstämme betrifft, so spricht man von *Master Seeds* und *Working Seeds*. Historie und Herstellung, von der ersten Isolation des Mikroorganismus, der das Impfantigen enthält bzw. repräsentiert, bis hin zu den in der Produktion verwendeten *Seeds* müssen genau dokumentiert sein. Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund der TSE-Problematik wichtig, um auszuschließen, dass niemals Kontakt zu möglicherweise BSE-haltigen Substanzen bestand.

Für virale Saatmaterialien zur Herstellung von Lebendvirusimpfstoffen verlangt die europäische Pharmakopoea zudem die Durchführung eines Neurovirulenztests in Affen, der die Abwesenheit neurovirulenter Eigenschaften bestätigt (2.6.18. *Test for neurovirulence of live virus vaccines*).

Ähnlich strenge Auflagen zur Beschreibung von Herkunft und Historie gelten für die *Master Cell Banks* und *Working Cell Banks* zur Virusvermehrung.

Alle Saatmaterialien und Zellbänke müssen so ausreichend angelegt sein, dass sie für das gesamte Produktleben,



Die geprüften Saatzellen werden in flüssigem Stickstoff (< -196 °C) aufbewahrt und bei Produktionsbeginn aufgetaut. (Quelle: Novartis Behring)

AUSZUG AUS PH.EUR. 5.2.1 TERMINOLOGIE IN IMPFSTOFF-MONOGRAPHIEN:

Saatgutsystem:

In einem Saatgutsystem werden aufeinander folgende Chargen eines Produkts von demselben Mastersaatgut abgeleitet. Für die routinemäßige Herstellung kann ein Arbeitssaatgut aus dem Mastersaatgut hergestellt werden. Die Herkunft sowie die Art und Häufigkeit der Passagierung des Mastersaatguts und des Arbeitssaatguts werden protokolliert.

Mastersaatgut:

Eine Kultur eines Mikroorganismus, aufgeteilt aus einem einzigen Bulk in Behältnissen die in einem einzigen Arbeitsgang gemeinsam so behandelt werden, dass Gleichförmigkeit und Stabilität gesichert sind und Verunreinigung verhindert wird. Ein Mastersaatgut in flüssiger Form wird in der Regel bei -70°C oder darunter gelagert. Ein gefriergetrocknetes Mastersaatgut wird bei Temperaturen gelagert, die nachweislich die Stabilität gewährleisten.

Arbeitssaatgut:

Eine Kultur eines Mikroorganismus, die vom Mastersaatgut abgeleitet und zur Verwendung bei der Herstellung vorgesehen ist. Arbeitssaatgut wird in Behältnisse aufgeteilt und wie für Mastersaatgut angegeben gelagert.

Zellbanksystem (Saatzellgutsystem):

Ein System, in dem aufeinander folgende fertige Zubereitungen (Chargen) eines Produkts durch Kultur in Zellen hergestellt werden, die von derselben Masterzellbank (Mastersaatzellgut) abgeleitet werden.

Eine Anzahl Behältnisse der Masterzellbank (des Mastersaatzellguts) werden zur Herstellung einer Arbeitszellbank (Arbeitssaatzellgut) verwendet. Das Zellbanksystem (Saatzellgutsystem) wird auf der höchsten Passagiestufe validiert, die während der routinemäßigen Herstellung erreicht wird.

Masterzellbank (Mastersaatzellgut):

Eine Kultur von Zellen, die in einem einzigen Arbeitsgang in Behältnisse verteilt, zusammen behandelt und so gelagert werden, dass Gleichförmigkeit und Stabilität gewährleistet sind und eine Verunreinigung ausgeschlossen ist.

Eine Masterzellbank (Mastersaatzellgut) wird in der Regel bei -70°C oder darunter gelagert.

Arbeitszellbank (Arbeitssaatzellgut):

Eine Kultur von Zellen, die von der Masterzellbank (dem Mastersaatzellgut) abgeleitet werden und zur Verwendung bei der Herstellung von Herstellungszellkulturen vorgesehen ist.

Die Arbeitszellbank (das Arbeitssaatzellgut) wird wie unter Masterzellbank (Mastersaatzellgut) angegeben in Behältnisse verteilt, bearbeitet und gelagert.

also viele Jahrzehnte, ausreichen. Die Neuanlage eines *Master Seeds* oder einer *Master Cell Bank*, insbesondere aus unbekannten Vorläufermaterialien, ist ein bedeutendes regulatorisches Problem und kann im extremen Fall die vollständige Neuzulassung bedeuten.

Alle Impfstoffe basieren auf dem Konzept, dass die Einzelschritte zur Vermehrung des Impfantigens immer im gleichen Zeitmuster und in derselben Schrittabfolge durchgeführt werden müssen. Man bezeichnet dieses Vorgehen als *Seed-Lot-System*, d.h. immer gleiche Saatmaterialien und immer gleiche Fermentationsbedingungen stellen sicher, dass Impfantigene mit immer gleichen Produkteigenschaften produziert werden. Alle Arzneibuch-Monografien für Impfstoffe beginnen mit dieser Vorgabe. Eingeschobene Passagen zur Vermehrung der Impfantigene oder Kultur-

zellen oder beliebig verlängerte bzw. verkürzte Kulturbedingungen können zu vollkommen unterschiedlichen Qualitäten und somit Produkten führen, mit unvorhersehbaren klinischen Eigenschaften und sind unzulässige Abweichungen von den Zulassungskriterien.

Kontrolle der Intermediate und des Endproduktes

Nach der kontrollierten Fermentation zur Vermehrung der Impfantigene erfolgt deren Ernte aus dem zellfreien Überstand, den virusinfizierten Zellen oder den Bakterien bzw. Hefen. Die Entfernung der enormen Medienmengen (bis zu 10.000 Liter) ist dabei der erste Schritt. Dies geschieht über einfache Zentrifugationsschritte (Bakterien, Hefen) oder, wie bei den Virusimpfstoffen, über große Durchlauf-Ultrazentrifugen, mit denen die das Impfantigen enthaltenen Viren zumeist in einem Zuckergradienten konzentriert werden. Je nach Impfstoffklasse schließen sich diverse Filtrations-, Chromatographie- und Inaktivierungsschritte an, die letztendlich ein hoch gereinigtes Impfantigen ergeben. Lebend-attenuierte Ganzvirusimpfstoffe können aufgrund ihrer Empfindlichkeit nur milden Konzentrations- und Reinigungsschritten unterworfen werden. Spaltantigen- oder Untereinheitenimpfstoffe sowie inaktivierte virale bzw. bakterielle Ganzkeim-Impfstoffe sind robuster und können mit einer wesentlich umfangreicheren Auswahl an Methoden gereinigt werden.

Das im Abschnitt „Biologische Arzneimittel“ erläuterte Prinzip der Beschreibung des Herstellungsprozesses durch eine geeignete Anzahl von prozess- und produktspezifischen Kontrollen mit möglichst engen technischen und biologischen Spezifikationen findet hier seine Anwendung und gilt für jeden einzelnen Herstellungsschritt.

Die Definition und Bestätigung geeigneter Spezifikationen ist ein langfristiges Vorhaben, das sich über das gesamte pharmazeutische Entwicklungsprogramm, also von den ersten Pilotversuchen bis hin zum letztendlichen industriellen Verfahren, erstreckt und nur durch unzählige Wiederholungen der einzelnen Prozessschritte möglich ist. Damit erreicht man die Validierung des Herstellungsverfahrens, was eine der fundamentalen Voraussetzungen für eine Impfstoffzulassung ist.

Über die somit vollzogene Beschreibung des Herstellungsprozesses und der Produktintermediate (*drug substance*) wird die konsistente Qualität einer jeden Impfstoffcharge sichergestellt, ohne dass die Wirkstoffe, also die Impfantigene, im Endprodukt (*drug product*) molekular analysiert werden müssen, was, wie schon erläutert, aufgrund ihrer Komplexität auch nicht möglich ist.

Kontrollzellen

Moderne Herstellungsanlagen für Impfstoffe ermöglichen die Durchführung nahezu aller im vorigen Absatz beschriebenen Teilschritte in einem geschlossenen Prozess, wodurch das Produkt und seine Intermediate von allen Risiken, insbesondere mikrobiologischen Kontaminationen,

TAB. 1 | PRÜFUNG DER ZELLINIEN NACH PH.EUR. 5.2.3 „ZELLKULTUREN FÜR DIE HERSTELLUNG VON IMPFSTOFFEN FÜR MENSCHEN“

Prüfung	Saatzellgut	Masterzellbank (MZB)	Arbeitszellbank (AZB)	Zellen mit mindestens der in der Herstellung erfolgten maximalen Anzahl der Poptionsverdupplungen
1. Identifikation und Reinheit				
Morphologie	+	+	+	+
Relevante Auswahl der folgenden Prüfungen: biochemisch (wie Isoenzyme), immunologisch (wie Histokompatibilität), zytogenetische Marker, Nukleinsäure-Fingerprinting	+	+	+	+
Karyotyp (diploide Zelllinien)	+	+	+))	+))
Lebenserwartung (diploide Zelllinien)	–	+	+	–
2. Fremde Agenzien				
Bakterien, Pilze	–	+	+	–
Mycoplasmen	–	+	+	–
Prüfung in Zellkulturen	–	–	+	–
Co-Kultur	–	–	+))	+))
Prüfungen in Tieren und Eiern	–	–	+))	+))
Spezifische Prüfungen auf mögliche Verunreinigungen, abhängig von der Herkunft der Zellen	–	–	+))	+))
Retroviren	–	+)))	–	+)))
3. Tumorigenität				
Tumorigenität	–	–	–	+))))

*) Der diploide Charakter für jede Arbeitszellbank wird durch die Verwendung von Zellen mit mindestens der in der Herstellung erfolgten maximalen Anzahl der Populationsverdupplungen gebildet.
 **) Prüfungen für jede Arbeitszellbank werden unter Verwendung von Zellen mit mindestens der in der Herstellung erfolgten maximalen Anzahl der Populationsverdupplungen durchgeführt.
 ***) Prüfungen für die Masterzellbank werden unter Verwendung von Zellen mit mindestens der in der Herstellung erfolgten maximalen Anzahl der Populationsverdupplungen durchgeführt.
 ****) Die MRC-5-, die WI38 und die FRhL2 Zelllinien sind als nicht tumorigen erkannt worden und müssen nicht auf Tumorigenität geprüft werden. Prüfungen an Zelllinien, von denen vermutet wird oder von denen bekannt ist, dass sie tumorigen sind, werden nicht durchgeführt.

die permanent von außen einwirken, geschützt ist. Bisweilen ist es aber dennoch notwendig, bestimmte Herstellungsschritte per Hand durchzuführen. Dies betrifft bei Virusimpfstoffen insbesondere die initialen Schritte der Zellkultur und die Infektion mit dem Saatvirus sowie bei bakteriellen Impfstoffen und Hefe-basierten Impfstoffen die Inokulation des Kulturmediums mit den entsprechenden Saatmaterialien.

Während mikrobiologische Kontaminationen im Allgemeinen schnell erkannt werden können, besteht bei Virusimpfstoffen das besondere Risiko der Kontamination der Zellkulturen mit Fremdviiren durch die am Prozess beteiligten Personen. Obwohl diese heute durch geeignete Schutzkleidung praktisch ausgeschlossen wird, ist es dennoch notwendig, diesen kritischen Schritt besonders genau zu kontrollieren. Dies geschieht über Kontrollzellen, die genauso behandelt werden wie die für die Virusanzucht vorgesehenen Zellen, aber eben nicht infiziert werden. Am Ende des Fermentationsprozesses werden diese Kontrollzellen in ähnlicher Weise auf mögliche Fremdviiruskontaminationen untersucht, wie dies im Absatz „Mikrobiologische Sicherheit von Ausgangsmaterialien zur Herstellung von Impfstoffen“ für die Zellbänke erläutert wurde.

Virusimpfstoffe, die mithilfe bebrüteter Hühnereier als Substrat zur Vermehrung der Impfviren hergestellt werden,

werden in ähnlicher Weise (anhand von Kontrolleiern) auf mögliche Prozess-bedingte Fremdviiruskontaminationen untersucht. Die jeweiligen Monografien für Virusimpfstoffe der europäischen Pharmakopoe nehmen sehr präzise Be-



Die Zellen werden hinsichtlich Wachstum und Vitalität überprüft. (Quelle: Novartis Behring)

zug auf dieses Testprinzip (2.6.16. *Tests for extraneous agents in viral vaccines for human use*).

Good Manufacturing Practice (GMP)

Über die wissenschaftlichen und gesetzlichen Vorgaben zum Inhalt der Zulassungsunterlagen kann die Qualität eines Impfstoffs und die Art der Herstellung ausreichend beurteilt werden. Die Eignung der Herstellungsstätte kann dagegen nur bedingt über die Prüfung der Zulassungsunterlagen beurteilt werden. Zwar müssen Angaben zum Grundriss der Räumlichkeiten, zur Klassifizierung der Reinräume, zum Produktionsfluss und zur technischen Eignung der Produktionsausrüstung gemacht werden – eine Beurteilung, ob die Herstellung gemäß den gesetzlichen Vorgaben zur guten Herstellungspraxis (*Good Manufacturing Practice*; GMP) geschieht, ist anhand solcher Unterlagen allerdings nicht möglich.

Die Einhaltung der GMP-Bestimmungen kann nur über die Inspektion der Herstellungsbetriebe überprüft werden. Die Inspektion eines Betriebes, der biologische Arzneimittel herstellt, ist erheblich aufwändiger als die eines Betriebes für chemisch definierte Arzneimittel. Dies hängt mit den in den vorangegangenen Abschnitten erläuterten Besonderheiten der Biologika zusammen. Die Inspektion eines Betriebes, der Impfstoffe herstellt, umfasst neben der Überprüfung der Eignung der Räumlichkeiten und der technischen Ausstattung viel weiter greifende Aspekte. Die Lagerung und Kontrolle der Rohmaterialien, die Herstellung der Ausgangsmaterialien (ab der Ebene der *Working Seeds*), die einzelnen Herstellungsschritte, die zum Endprodukt führen und die Kontrollmethoden werden vor Ort überprüft. Ebenso ist die Überprüfung der Schulung und Eignung der mit der Herstellung betrauten Mitarbeiter ein wichtiger Faktor.

Letztendlich ist das Ziel einer solchen Inspektion die Erteilung einer gültigen Herstellungserlaubnis. Diese wird bei den Biologika immer produktspezifisch erteilt, berücksichtigt also die fundamentale Tatsache, dass zwei im Prinzip identische biologische Arzneimittel, die jedoch in unterschiedlichen Herstellungsverfahren hergestellt werden, nicht miteinander vergleichbar sind. Für die Erteilung einer Herstellungserlaubnis sind in Deutschland die Länder zuständig, die Inspektionen im Benehmen mit den Experten aus den zuständigen Zulassungsbehörden durchführen (für Impfstoffe in Zusammenarbeit mit dem PEI). Ihre weitere Gültigkeit muss durch regelmäßige Wiederinspektionen – in der Regel im Zweijahres-Rhythmus – sichergestellt werden.

Die Erteilung einer Herstellungserlaubnis bedeutet auch die Einhaltung der GMP-Vorschriften der EU [9]. Wie für die Zulassung gelten also auch im Bezug auf die gute Herstellungspraxis einheitliche Bedingungen innerhalb der Gemeinschaft, sodass es keine Qualitätsunterschiede bei biologischen Arzneimitteln geben kann, auch wenn sie in unterschiedlichen Mitgliedsstaaten hergestellt werden. Annex II der EU-GMP-Vorschriften nimmt besonderen Bezug auf die biologischen Arzneimittel [10].

Momentan gelten die GMP-Vorschriften nur für die Herstellung der Wirkstoffe (*Active Pharmaceutical Ingredients*; API), nicht aber für die Herstellung der Hilfsstoffe (*excipients*). Mittlerweile ist dies als schwerwiegende Lücke erkannt worden, denn gerade bei Impfstoffen spielen Hilfsstoffe, wie beispielsweise Adjuvanssysteme zur Verstärkung der Immunantwort oder Humanalbumin, bzw. andere Substanzen, die als Stabilisatoren eingesetzt werden, eine tragende Rolle im Bezug auf die immunologische Funktionsweise. Ihre Qualität sollte deshalb den gleichen strengen Bestimmungen in Bezug auf die Überwachung der Herstellung unterliegen, wie das bei den Impfantigenen der Fall ist. Eine Ausweitung der EU-GMP-Vorschriften ist deshalb in Vorbereitung.

Die Stabilität von Impfstoffen

Impfstoffe haben Laufzeiten zwischen 18 Monaten (die meisten lebend attenuierten Impfstoffe) und vier Jahren (einige Tollwutimpfstoffe), bei einer Lagertemperatur von 2 bis 8 °C. Die genaue Kenntnis der Stabilität eines Impfstoffes ist ein wichtiges Kriterium zur Sicherstellung der gleichbleibenden Wirksamkeit. Spezielle Stabilitätsstudien unter realen, aber auch aggressiveren Lagerbedingungen, z.B. unterschiedlichen Temperaturstufen, erlauben die Ermittlung des Stabilitätsprofils eines Impfstoffes, das auch Aussagen darüber ermöglicht, wie mit einem Impfstoff vorzugehen ist, der vorübergehend in Abweichung von der vorgeschriebenen Lagertemperatur aufbewahrt wurde. Des Weiteren muss die maximale Laufzeit eines Impfstoffes heute über klinische Daten abgesichert werden. Diese *End-of-shelf-life studies* sind notwendig, da mit physiko-chemischen Testmethoden zwar die unverminderte Qualität eines Impfstoffes am Ende der beantragten Laufzeit sichergestellt werden kann, nicht aber unbedingt dessen unveränderte Wirksamkeit.

Konservierungsmittel, insbesondere das in Verruf geratene Thiomersal (eine Quecksilberverbindung), sind mittlerweile aus den meisten Impfstoffen verschwunden. Ihre Aufgabe besteht darin, die mikrobiologische Qualität von Impfstoffen über die gesamte Laufzeit sicherzustellen. Im extremen Fall versteht man darunter, dass sich unvermeidbare mikrobiologische Kontaminationen des Endprodukts im Beisein eines Konservierungsmittels während der Laufzeit nicht weiter ausbreiten können, eine weitere Keimvermehrung also unterbunden werden muss (z.B. bei Pockenimpfstoffen, die auf der Haut lebender Tiere hergestellt wurden). Eine solche Sichtweise ist heutzutage natürlich inakzeptabel. Moderne Produktions- und Abfüllanlagen erlauben die aseptische Herstellung des Produkts und die quasi-sterile Abfüllung. Angesichts der enormen Stückzahlen mit denen Impfstoffe abgefüllt werden, ist dies eine beachtliche Leistung. Typische Chargengrößen für Impfstoffe bewegen sich zwischen einigen Tausend und einigen Hunderttausend Fertigspritzen oder Fläschchen. Kein anderes biologisches Arzneimittel kommt auch nur annähernd an diese Stückzahlen heran.

Die firmeninterne und behördliche Chargenfreigabe

Die letzten Schritte der Impfstoffherstellung umfassen die Freigabe einer Charge im Herstellungsbetrieb und nachfolgend durch die zuständige staatliche Kontrollbehörde (z.B. das PEI). Verantwortlich für die firmeninterne Freigabe einer Charge ist die in der Arzneimittelgesetzgebung definierte sachkundige Person (*qualified person*). Natürlich müssen alle mit der Impfstoffproduktion genannten Mitarbeiter sachkundig sein, die Besonderheit der Funktion der *qualified person* liegt aber darin, dass sie persönlich für die Einhaltung aller mit der Zulassung genehmigten Vorgaben zur Herstellung einer Impfstoffcharge haftet. In Anbetracht der in den vorangegangenen Absätzen beschriebenen Komplexität der Impfstoffherstellung eine unverzichtbare zentrale Position.

Die *qualified person* stellt also sicher, dass alle Herstellungsschritte ordnungsgemäß abgelaufen sind und die Charge den zugelassenen Spezifikationen entspricht. Dies wird über eine umfangreiche Serie von Tests am Endprodukt noch einmal bestätigt. Die wichtigsten dieser Tests dienen der Sicherstellung der Sterilität des Endprodukts, der Identität und des korrekten Antigengehalts. Eine Charge, die alle Tests erfolgreich durchlaufen hat, wird zur Prüfung und Freigabe an das zuständige staatliche Kontrolllabor geschickt. Das AMG schreibt die Prüfung des Herstellungsprotokolls einer Charge vor, nicht aber unbedingt die experimentelle Testung. Gleichwohl wird die experimentelle Testung der meisten Impfstoffe vom PEI seit vielen Jahrzehnten praktiziert.

Im Einklang mit der EU-weiten Harmonisierung der Zulassungskriterien und der GMP-Vorschriften unterliegt auch die Chargenprüfung seit vielen Jahren einem EU-weit akzeptierten Reglement. Dieses legt fest, dass eine Impfstoffcharge nur einmal innerhalb der EU von einem zuständigen nationalen Kontrolllabor experimentell getestet werden muss (*Official Control Authority Batch Release*; OCABR). Art und Ausmaß der Testverfahren sind in verbindlichen Leitfäden, den *Batch release guidelines* für Impfstoffe, festgelegt [11]. Eine derart geprüfte Impfstoffcharge erhält von der prüfenden Behörde ein EU-weit gültiges Chargenfreigabezertifikat (*EU batch release certificate*), das als Grundlage zur nationalen Freigabe in den Mitgliedsstaaten dient. Die anderen Kontrolllabors innerhalb der EU dürfen eine Charge zwar unabhängig davon immer noch experimentell prüfen, dies aber nicht mehr zur Voraussetzung für ihre nationale Freigabe machen. Die Koordination der OCABR-Aktivitäten geschieht durch das *European Directorate for the Quality of Vaccines* (EDQM) mit Sitz in Straßburg [12].

Abschließende Bemerkungen

Die Herstellung und Qualitätskontrolle von Impfstoffen unterliegt einer Vielzahl von wissenschaftlichen und gesetzlichen Regularien, die dem Stand des Wissens fortwährend angepasst werden. Eines der grundlegenden Prinzipien dieser Bemühungen ist der Tatbestand, dass Impfstoffe an ge-

sunde Personen zur Prophylaxe und nicht an Patienten zur Therapie verabreicht werden und somit so sicher wie möglich sein sollten.

Die Regelungen für biologische Arzneimittel, zu denen die Impfstoffe als komplexeste Vertreter dieser Arzneimittelklasse zählen, sind aber trotz ihres Umfangs und ihrer Komplexität als Konsens zwischen den zuständigen Behörden und den Herstellern zu verstehen. Keinesfalls ist es erstrebenswert, dass eine behördliche Institution Regelwerke erstellt, die von denen, die sie anwenden müssen, gar nicht eingehalten werden können. Um Missstände dieser Art von Anfang an zu vermeiden, hat der Dialog zwischen Herstellern und zuständigen Behörden schon seit geraumer Zeit einen enormen Stellenwert erlangt. Das Prinzip der wissenschaftlichen Beratung (*scientific advice*) ist mittlerweile auf allen regulatorischen Ebenen, also national sowie auf EU- und WHO-Ebene, etabliert. Die wissenschaftliche Beratung ist als Gedankenaustausch zwischen Herstellern und Behörden zu verstehen, um Wege zu finden, wie wirksame und verträgliche Impfstoffe schnell zur Verfügung gestellt werden können und dabei alle Beteiligten ihrem Auftrag gerecht werden können.

Das System zur Regulierung von Impfstoffen basiert auf einer Evolutionsphase, die Mitte der 1950er Jahre ihren Anfang nahm und mittlerweile in eine Optimierungsphase übergegangen ist. Das System funktioniert verlässlich, denn die Fälle, in denen systematischer Schaden von Impfstoffen ausgeht, gehören schon seit langer Zeit der Vergangenheit an. Angesichts der Tatsache, dass noch nie so viele neue und hochkomplexe Impfstoffe auf den Markt kamen wie in den vergangenen Jahren und in riesigen Chargengrößen in den Verkehr gebracht werden, eine durchaus zufriedenstellende Bilanz.

Zitierte Literatur

- [1] <http://www.emea.europa.eu/htms/human/humanguidelines/biologicals.htm>
- [2] <http://www.emea.europa.eu/htms/human/humanguidelines/multidiscipline.htm>
- [3] <http://online.pheur.org/entry.htm>
- [4] http://www.edqm.eu/site/page_527.php
- [5] <http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/en/>
- [6] <http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>
- [7] http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/index_en.htm
- [8] [http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:52004XC0128\(02\):DE:HTML](http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:52004XC0128(02):DE:HTML)
- [9] <http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/homev4.htm>
- [10] <http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/vol-4/pdfs-en/annx02en200408.pdf>
- [11] http://www.edqm.eu/site/page_527.php
- [12] <http://www.edqm.eu/>

Der Autor:



Dr. Pfeleiderer ist Leiter des Fachgebiets Virusimpfstoffe am Paul-Ehrlich-Institut (PEI), Bundesamt für Sera und Impfstoffe und in dieser Funktion u.a. zuständig für die Prüfung von Zulassungsanträgen und die Prüfung und Freigabe von Impfstoffchargen. Dr. Pfeleiderer vertritt das PEI in verschiedenen Arbeitsgruppen des Ausschusses für Humanarzneimittel (Committee for Human Medicinal Products (CHMP) bei der Europäischen Agentur für Arzneimittel (European Medicines Agency (EMA) in London, insbesondere in der CHMP Vaccine Working Party (VWP), deren Ko-Vorsitzender er ist, in der CHMP/Biologics Working Party (BWP) sowie in der BWP/Influenza ad hoc Working Group. Auf nationaler Ebene arbeitet Dr. Pfeleiderer in diversen wissenschaftlichen Gremien, z.B. in der Bund-Länder Expertengruppe Influenza Pandemie-Planung sowie im wissenschaftlichen Beirat der Arbeitsgemeinschaft Influenza (AGI). Dr. Pfeleiderer berät zudem die WHO zu diversen Impfstoffthemen.

Anschrift:

Dr. Michael Pfeleiderer
Fachgebietsleiter Virusimpfstoffe
Paul-Ehrlich-Institut, Bundesamt
für Sera und Impfstoffe
Paul-Ehrlich-Straße 51-59
63225 Langen
pflmi@pei.de

TOD EINES IMPFSTOFFES – DER FALL LYMERix®

Ein schöner Spaziergang im Wald oder in hohen Wiesen birgt manchmal die Gefahr, dass man sich einen kleinen Blutsauger einfängt – die Zecke. Wenn sie es beim Saugen belassen würde, wäre es ja nicht so schlimm. Leider stülpt sie auch Teile ihres Verdauungssaftes in die Wunde, und darin befinden sich immer wieder auch kleine Mitreisende: Viren, die im Opfer die Frühsommermeningoencephalitis hervorrufen können oder aber Bakterien, die unbehandelt zur Borreliose im Gegensatz zu z.B. Slowenien nicht zu den meldepflichtigen Erkrankungen. Man schätzt allerdings, dass jährlich 60-100.000 Neuinfektionen auftreten. Durch den bakteriellen Ursprung der Krankheit, lässt sie sich – falls früh, z.B. am Erythema migrans erkannt – recht gut mit einer Antibiotika-Therapie in den Griff bekommen. Unbehandelt führt die Borreliose zu neurologischen, Herz- oder Skelettmuskelbeschwerden. Eine chronische Infektion führt meist zu Gelenkarthritis.

In Europa und Asien wird die Borreliose jedoch weniger von *B. burgdorferi* als von *B. afzelii* und *B. garinii* hervorgerufen. In Deutschland gehört die Borreliose im Gegensatz zu z.B. Slowenien nicht zu den meldepflichtigen Erkrankungen. Man schätzt allerdings, dass jährlich 60-100.000 Neuinfektionen auftreten. Durch den bakteriellen Ursprung der Krankheit, lässt sie sich – falls früh, z.B. am Erythema migrans erkannt – recht gut mit einer Antibiotika-Therapie in den Griff bekommen. Unbehandelt führt die Borreliose zu neurologischen, Herz- oder Skelettmuskelbeschwerden. Eine chronische Infektion führt meist zu Gelenkarthritis.

Unabhängig von der Antibiotika-Anwendung versuchte man recht schnell, eine Prävention mit einer aktiven Immunisierung zu ermöglichen. In den frühen 1990er Jahren wurden von SmithKlineBeecham und PasteurMérieux-Connaught die beiden Borreliose-Impfstoffe LYMERixTM bzw. ImuLymeTM entwickelt, die beide auf dem so genannten *outer-surface protein A* (OspA) basierten. Dieses Protein ist dominant auf der Oberfläche der Borrelien, die sich in der Zecke befinden, und sehr spezifisch für den Borreliensstamm (Abb. 1). Wechselt das Bakterium den Wirt, wechselt es auch das Oberflächenprotein und exprimiert im Menschen das *outer-surface protein C* (OspC). Da diese Oberflächenproteine jedoch genetisch sehr variabel sind, konnte man für die Impfstoffproduktion nur die „gängigste Variante“ auswählen.

LYMERixTM zeigte sich in einer Phase-III-Studie an mehr als 10.000 Probanden im Alter zwischen 15 und 70 Jahren als sicher und führte zu einer Reduktion der Erkrankungsfälle um 76 %. Basierend auf diesen Daten erteilte das FDA dem Impfstoff LYMERixTM Ende 1998 die Zulassung. Für den vergleichbaren ImuLymeTM wurde nie eine Zulassung beantragt. Trotz der Nachteile, dass LYMERixTM nie an kleineren Kindern getestet wurde und keinerlei Information über die Dauer des Impfschutzes vorlagen, empfahl das *Advisory Committee on Immunization Practices* aufgrund einer positiven Kosten-Effektivitäts-Analyse aus dem Jahr 1999 die Immunisierung für Personen, die in Endemiegebieten leben bzw. eine erhöhte Expositionsrate gegenüber Zecken aufweisen. Keine Impfempfehlung wurde für unter 15- bzw. über 70-jährige ausgesprochen sowie für diejenigen, die eben nicht in Endemiegebieten leben.

Die Lyme-Borreliose und auch die Vorzüge des Impfstoffes standen nur recht kurze Zeit im Mittelpunkt des Medien-Interesses. Innerhalb eines Jahres nach der Zulassung häuften sich die Be-