

Wichtige Aspekte der Virussicherheit bei Neuartigen Therapien

Bei Arzneimitteln, die aus biologischen Ausgangsmaterialien oder in der Zellkultur hergestellt werden, besteht grundsätzlich das Risiko ihrer Kontamination mit Viren. In der Vergangenheit ist es – insbesondere bei aus humanem Plasma gewonnenen Gerinnungsfaktorpräparationen – zu Übertragungen des Humanen Immundefizienzvirus (HIV), Hepatitis-B-Virus (HBV) und Hepatitis-C-Virus (HCV) gekommen. Aufgrund dieser Erfahrungen wurde ein mehrstufiges Konzept zur Virussicherheit entwickelt, das heute die Sicherheit dieser Produkte gewährleistet. Dieses Konzept stützt sich im Wesentlichen auf drei einander ergänzende Maßnahmen: (i) die sorgfältige Selektion der Blutspender mit Blick auf ein geringes Infektionsrisiko, (ii) die Testung der Blutspender auf bestimmte Viren und (iii) die Einführung von Produktionsschritten, die Viren inaktivieren oder entfernen. Erfahrungen mit Plasmaprodukten haben gezeigt, dass nur die Kombination dieser drei Maßnahmen zu einer höchstmöglichen Sicherheit führt. Eine alleinige Testung der Spender erwies sich hier nicht immer als ausreichend, um eine Virusübertragung auszuschließen. Selbst bei der Anwendung hochempfindlicher Nukleinsäure-Amplifikations-Techniken (NAT), wie der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), kann nicht immer ausgeschlossen werden, dass sich im Produkt noch Restmengen von Viren oder einzelne infektiöse Viruspartikel befinden.

Arzneimittel für Neuartige Therapien (Advanced Therapy Medicinal Products, ATMPs), stellen besondere Herausforderungen an die Virussicherheit. ATMPs werden unter Verwendung einer Vielzahl an menschlichen oder tierischen Ausgangsmaterialien hergestellt. Wegen der Eigenheiten der Arzneimittel ist es nicht möglich, bei ihnen die drei eingangs beschriebenen Prinzipien der Virussicherheit immer konsequent anzuwenden. Bei Produkten mit lebenden Zellen (Cell-Based Medicinal Products) scheidet die Möglichkeit einer Virusinaktivierung grundsätzlich aus, da die hierfür verwendeten Methoden (zum Beispiel eine Hitzebehandlung) auch die Zellen abtöten. Auch bei Gentransferarzneimitteln, die aus infektiösen Viruspartikeln bestehen, die zum Einschleusen von Erbgut in Zellen eingesetzt werden (virale Genvektoren), scheidet Verfahren zur Virusinaktivierung meist aus, da der virale Vektor damit selbst inaktiviert würde. Aufgrund dieser Limitierungen kommt den anderen Maßnahmen wie der sorgfältigen Selektion der Ausgangsmaterialien und ihrer Testung besondere Bedeutung zu.

Im Folgenden werden die Möglichkeiten zur Realisierung der Virussicherheit und ihre Limitierungen für Produkte zur somatischen Zelltherapie (Cell-Based Medicinal Products), für Gewebezüchtungen (Tissue-Engineered Products) sowie für Gentransferarzneimittel erläutert.

Somatische Zelltherapie-Arzneimittel und Produkte aus der Gewebezüchtung

Somatische Zelltherapie-Arzneimittel (Cell-Based Medicinal Products)

Arzneimittel, die Stammzellen oder andere Zellen des Menschen als Wirkstoff enthalten oder aus solchen bestehen, werden zur Gruppe der Arzneimittel für die somatische Zelltherapie gezählt. Häufig werden diese Arzneimittel einfach als humane somatische Zelltherapeutika oder somatische Zelltherapie-Arzneimittel bezeichnet, obgleich auch präventive und diagnostische Anwendungsmöglichkeiten bestehen können. Somatische Zelltherapeutika sind Arzneimittel gemäß § 2 Arzneimittelgesetz (AMG, § 2 Arzneimittelbegriff). Sie bestehen aus oder enthalten lebensfähige Stammzellen oder andere humane Zellen, die mit Blick auf die Anwendung am Menschen einer geeigneten Behandlung unterzogen wurden. Als Behandlung können (i) die Isolierung der Zellen, (ii) die Ex-vivo-Kultivierung der Zellen und ihre Expansion oder Anreicherung oder (iii) eine anderweitige pharmakologische Behandlung der Zellen betrachtet werden, gegebenenfalls einschließlich einer ihre Wirkung nicht beeinträchtigenden Bestrahlung. Gegenwärtige Einsatzgebiete somatischer Zelltherapie-Arzneimittel sind zum Beispiel die Onkologie (Tumorimpfstoffe), die Infektiologie (adaptive Immuntherapie) und die Transplantationschirurgie (Zellbeziehungsweise Gewebeersatz).

J. Blümel · A. Stühler

Wichtige Aspekte der Virussicherheit bei Neuartigen Therapien

Zusammenfassung

Medikamente für Neuartige Therapien stellen besondere Herausforderungen an die Virussicherheit. Diese Produkte werden unter Verwendung einer Vielzahl an menschlichen oder tierischen Ausgangsmaterialien und Produktionshilfsstoffen in Zellkulturen hergestellt oder beinhalten selbst Zellen. Eine ausführliche Testung der Spender und der zur Produktion etablierten Zellbanken ist daher unerlässlich. Bei den Produktionshilfsstoffen ist auf die Virussicherheit biologischer Zellkulturzusätze wie Rinderseren, Schweinetrypsin sowie verschiedenster Wachstumsfaktoren zu achten. Nach Möglichkeit sollten Schritte zur Inaktivierung

oder Entfernung von Viren als weitere Sicherheitsmaßnahme eingeführt werden. Bei Produkten, die aus Zellen bestehen, scheiden Methoden zur Virusinaktivierung weitgehend aus, da sie immer auch die Funktionsfähigkeit und Lebensfähigkeit der Zellen selbst beeinträchtigen. Nur bei stabilen kleinen, unbehüllten Virusvektoren ist der Einsatz bestimmter Methoden zur selektiven Inaktivierung oder Entfernung potenziell kontaminierender Hüllviren denkbar.

Schlüsselwörter

Virus · Sicherheit · Arzneimittel für Neuartige Therapien · Zelltherapie · Gentherapie

Im Gegensatz zur somatischen Zelltherapie wird bei der allogenen Gewebetransplantation häufig Material eingesetzt, das keiner besonderen Herstellung oder Behandlung unterzogen wurde, zum Beispiel Herzklappen oder Cornea. Daher zählen diese Arzneimittel nach gegenwärtiger Einschätzung nicht zu den Arzneimitteln für die somatische Zelltherapie. Eine arzneimittelrechtlich gültige Definition somatischer Zelltherapie-Arzneimittel ist noch zu fixieren. Xenogene Zelltherapie-Arzneimittel enthalten Zellen, Gewebe und Organe, die nicht vom Menschen stammen.

Produkte aus der Gewebezüchtung (Tissue-Engineered Products)

Produkte aus der Gewebezüchtung bestehen aus lebenden menschlichen Zellen, die unter Zuhilfenahme von häufig bioabbaubaren Gerüstsubstanzen und Biomolekülen (wie Wachstumsfaktoren) zu künstlichen Gewebekonstrukten zusammengefügt werden. Sie sollen genutzt werden, um bestimmte Gewebefunktionen wiederherzustellen, zu erhalten oder zu verbessern. Die ersten diesbezüglichen Produkte sind bereits auf dem Markt. Es handelt sich bei ihnen um einfachen Haut- und Knorpelersatz. Der Unterschied zur herkömmlichen Transplantation besteht darin, dass die Gewebeprodukte erst ex vivo hergestellt und dann in den Körper des Patienten integriert werden.

Spenderauswahl

Wesentliche Grundlagen zur Vermeidung des Risikos einer Virusübertragung durch die oben genannten Produkte sind eine sorgfältige Anamnese der Zellbeziehungsweise Gewebespenders sowie deren ausführliche klinische und infektiionsserologische Untersuchung. Möglicherweise infizierte Spender müssen zuverlässig identifiziert werden, um zu verhindern, dass ihr Blut, ihre Zellen oder ihre Gewebe in ein Arzneimittel einfließen. Folglich müssen die Spender bei der körperlichen Untersuchung frei von auffälligen Krankheitszeichen sein. Da Viruserkrankungen aber auch symptomarm und somit unbemerkt verlaufen können, muss intensiv nach Anhaltspunkten

Important aspects of virus safety of advanced therapy medicinal products

Abstract

Virus safety of advanced therapy medicinal products is a particular challenge. These products may consist of whole cells and the manufacture of these is performed using various human or animal-derived starting materials and reagents. Therefore, extensive testing of donors and of established cell banks is required. Furthermore, the virus safety of reagents such as bovine sera, porcine trypsin, and growth factors needs to be considered. Whenever possible, manufacturing steps for inactivation or removal of viruses should be

introduced. However, it is not possible to introduce such steps for cell-based medicinal products as the activity and viability of cells will be compromised. Only in the production of small and stable non-enveloped viral gene vectors is it conceivable to implement steps to selectively inactivate or remove potential contaminating enveloped viruses.

Keywords

Virus · Safety · Advanced therapy medicinal products · Cell therapy · Gene therapy

für eine mögliche Infektion gesucht werden. Die Spender werden daher zunächst sehr umfassend danach befragt, ob sie infektiologisch relevanten Risikosituationen ausgesetzt waren.

So sollte zum Beispiel bei der Auswahl der Spender für Zellen und Gewebe zur heterologen Anwendung das CJD (Creutzfeld-Jakob-Disease) und (v)CJD (new Variant Creutzfeld-Jakob-Disease)-Risiko – analog zu den Hämotherapie-Richtlinien [1] – berücksichtigt und dokumentiert werden. Anordnungen des Paul-Ehrlich-Instituts zu (v)CJD-Ausschlüssen sind entsprechend anzuwenden. Da es zurzeit noch nicht möglich ist, Spenden auf Vorliegen einer CJD-/vCJD-Infektion zu testen, werden Personen, die einem möglichen Infektionsrisiko ausgesetzt waren, als Spender zurückgewiesen. Ausgeschlossen werden Personen, bei denen die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit oder ihre neue Variante diagnostiziert wurde, Personen, die eine nicht iatrogene Creutzfeldt-Jakob-Krankheit in der familiären Vorgeschichte aufweisen, aber auch Empfänger von Cornea-, Sklera- und Dura-Mater-Transplantaten.

Mit Blick auf die (v)CJK sind zudem weitere Vorsichtsmaßnahmen zu empfehlen: Von der Spende auszuschließen sind Personen, die sich zwischen 1980 und 1996 insgesamt länger als sechs Monate im Vereinigten Königreich (Großbritannien und Nordirland) aufgehalten haben, die nach dem 1. Januar 1980 in Großbritannien und Nordirland eine „schwere“ Operation hinter sich gebracht haben, die nach dem 1. Januar 1980 in Deutschland eine Bluttransfusion (Blutkomponenten) erhalten haben.

Testung von Ausgangsmaterialien

Alle in die Zell-/Gewebeherstellung eingehenden biologischen Roh- und Ausgangsstoffe sollten identifiziert und beschrieben werden. Dazu gehören auch Substanzen biologischen Ursprungs, die bei der Produktion in Kontakt mit dem Arzneimittel kommen (einschließlich Hilfsstoffe und Produktionshilfsstoffe). Diese Substanzen sind mit Blick auf eine mögliche Inaktivierung oder Entfernung von Viren während der Herstellung zu bewerten. Das mögliche Risiko des Ein-

trags von Viren durch diese Substanzen ist zu diskutieren.

Humane Ausgangsmaterialien

Bei jeder Zell-/Gewebeherstellung muss das Blut des Spenders vorab mit sensitiven Methoden auf das Vorliegen von Markern für relevante Virusinfektionen untersucht werden. Die Spendertestung muss entsprechend den Vorgaben der nationalen [1] und europäischen [2] Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen sowie der Richtlinie 2006/17/EG [3] der Kommission zur Durchführung der Richtlinie (RL) 2004/23/EG [4] des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich technischer Vorschriften für die Spende, Beschaffung und Testung von menschlichen Geweben und Zellen durchgeführt werden. In der Verordnung über die Anforderung an die Qualität und Sicherheit der Entnahme von Geweben und deren Übertragung nach dem Transplantationsgesetz (TPG-GewV) sind die Bedingungen für die Laboruntersuchungen im Rahmen von Gewebespenden festgelegt. Gemäß Anlage 3 TPG-GewV sind für alle Gewebespenden von toten und lebenden Spendern infektionsserologische Tests des Spenderblutes auf HIV und HCV (Antikörpernachweis) sowie auf HBV (Nachweis von S-Antigen sowie Testung auf anti-Hbc-Antikörper) durchzuführen [5]. Darüber hinaus bestehen besondere Anforderungen an die Laboruntersuchungen des Blutes bei lebenden Spendern. Bei einer geplanten langfristigen Lagerung der von ihnen gespendeten Gewebe beziehungsweise Gewebesubstanzen ist dem Spender nach 180 Tagen eine erneute Blutprobe zu entnehmen und eine Wiederholungsuntersuchung des Spenderblutes erforderlich. Wird die Spenderprobe jedoch neben den infektionsserologischen Tests zusätzlich mittels NAT auf HIV, HBV, HCV untersucht, kann die erneute Blutprobenentnahme und Testung entfallen. Gleiches gilt, wenn bei der Be- oder Verarbeitung der gespendeten Zellen/Gewebe ein validiertes Viren-Inaktivierungsverfahren zur Anwendung kommt.

Während also die infektionsserologischen Testungen (Antikörper- und Antigennachweis) einer Blutprobe von Zel-

len-/Gewebespendern gesetzlich vorgeschrieben sind, wird der Nukleinsäure-Nachweis auf HIV, HBV und HCV in der Blutprobe nicht ausdrücklich gefordert. Durch den direkten Genomnachweis mittels NAT, die es erlaubt, eine vorliegende Infektion erheblich früher zu erkennen, als dies über die Erfassung von Antikörpern oder Antigenen möglich ist, wird die „diagnostische Lücke“ jedoch deutlich reduziert. Für eine NAT-Testung des Spenderblutes spricht eine Reihe von Gründen (zum Beispiel dokumentierte Virusübertragungen aus Blut und Geweben et cetera), wobei je nach zu spendendem Gewebe auf unterschiedliche Erreger zu testen ist. Da die NAT offenkundige Vorteile besitzt (Reduktion der diagnostischen Lücke) und durch ihren Einsatz zudem auf Inaktivierungsverfahren, die das gespendete Gewebe zerstören würden, verzichtet werden kann, sollten die HIV-, HBV- und HCV-NAT-Testung einer Spenderblutprobe als zusätzliche Sicherheitsmaßnahme durchgeführt werden.

Falls humanes Albumin, Transferrin oder andere Plasmaderivate dem Zell-/Gewebekulturmedium zugesetzt werden, muss auch für diese die Virus- und (v)CJK-Sicherheit nachgewiesen werden. Die hier vorzulegenden Unterlagen sollten zeigen, ob es sich um ein zugelassenes Arzneimittel handelt, und Angaben zum Hersteller des Albumins oder Transferrins, zum Herstellungsprozess, zu den Maßnahmen zur Erregerreduktion, zur Herkunft des Ausgangsmaterials (Plasma) sowie zu den Spenderauswahlkriterien und zur Spendertestung enthalten sind. Bei einem in Europa zugelassenen Arzneimittel ist die Vorlage eines „European Batch Release Certificate“ eines Labors aus dem Netzwerk der offiziellen Arzneimittelkontrolllabore (Official Medicines Control Laboratories, OMCL) erforderlich.

Tierische Materialien

Grundsätzlich ist festzuhalten, dass bei der Verwendung tierischen Materials die Übertragung von Zoonoseerregern, das heißt von Erregern, die auf natürlichem Weg vom Tier auf den Menschen übertragen werden können, so weit wie möglich ausgeschlossen werden muss. Die Bedeu-

tung der Zoonosen liegt in ihrer Häufigkeit, der hohen Letalität einzelner Zoonosen und in der Möglichkeit, dass bisher auf das Tierreservoir beschränkte Erreger die Artengrenze zum Menschen überwinden könnten. Veränderte Bedingungen bei der Lebensmittelproduktion (inklusive Massentierhaltung) und der Ernährung sowie demografische, klimatische und ökologische Faktoren fördern die Verbreitung von Zoonoseerregern. Bei der Verwendung von Zellen tierischen Ursprungs ist deshalb insbesondere auf zoonotische Viren (zum Beispiel Flaviviren wie das West-Nil-Virus aus Insektenzellen) zu achten. Auch für die in die Produktion eingehenden Roh- und Ausgangsstoffe ist die Virussicherheit nachzuweisen. Bei Verwendung von Materialien aus tierischem Blut oder anderen tierischen Geweben sind die Epidemiologie möglicher Erreger in der geografischen Region, aus der die Tiere stammen, die Tierhaltung, die veterinärmedizinische Überwachung und die spezifische Testung der Tiere beziehungsweise der Materialien tierischen Ursprungs auf spezifische Erreger zu beschreiben. Hierbei sind Kontaminationen durch das Ausgangsgewebe sowie durch biologische Hilfsstoffe zur Gewebekultur oder Gewebeaufbewahrung zu beachten (zum Beispiel Sera oder andere Mediumzusätze).

Weiterhin sollten die in die Produktion eingehenden Roh- und Ausgangsstoffe aus Tierarten mit TSE-Risiko (Transmissible Spongiform Encephalopathy) oder entsprechende Substanzen, die bei der Produktion in Kontakt mit dem Arzneimittel kommen (einschließlich der Hilfsstoffe und Produktionshilfsstoffe) identifiziert und beschrieben werden. Für diese Substanzen ist die Übereinstimmung mit dem TSE-Leitfaden der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) in seiner jeweils gültigen Fassung [6] zu belegen. Dieser Leitfaden zielt darauf ab, das TSE-Risiko durch Berücksichtigung verschiedener Aspekte zu minimieren. In diesem Zusammenhang werden insbesondere die geografische Herkunft und das Alter der Tiere, die Art des tierischen Gewebes sowie der Herstellungsprozess mit Blick auf eine mögliche Inaktivierung oder Abreicherung von Prionen bewertet. Die Konformität mit dem TSE-Leitfaden kann

durch ein entsprechendes TSE-Zertifikat des „European Directorate for the Quality of Medicines“ (EDQM) unterstützt werden.

Bei Einsatz von fötalem Kälberserum (FCS) ist zu belegen, dass es in Übereinstimmung mit dem TSE-Leitfaden [6] und der Monographie „Bovine Serum 04/2006:2262, 6th Ed. Ph. Eur.“ verwendet wird. Wie in der Monographie gefordert, sollte es auf bovine Viren getestet und einem Virusinaktivierungsschritt unterzogen werden.

Bei Verwendung von Trypsin porzinen Ursprungs gibt es keine prinzipiellen TSE-Bedenken, da bei Schweinen kein TSE-Risiko besteht. Eine Gamma-Bestrahlung sollte hier für einen ausreichenden Schutz vor einer Infektion mit porzinen Viren sorgen. Dabei ist allerdings zu bedenken, dass zum Beispiel die Gamma-Bestrahlung keinen absoluten Schutz vor Viruskontaminationen garantiert. Das Schweinetrypsin muss frei von Parvoviren und Pestiviren sein. Zur weiteren Risikominimierung kann auf rekombinantes Trypsin oder auf andere proteolytische Enzyme pflanzlichen Ursprungs zurückgegriffen werden.

Heparine werden in der Regel aus der Schleimhaut von Schweinedärmen gewonnen. Ihre chemische Qualität muss den Anforderungen des Arzneibuches genügen. Bei der Herstellung von Heparin werden chemische Verfahren eingesetzt, die Viren üblicherweise effektiv inaktivieren. Die Wirksamkeit der Verfahren zur Virusinaktivierung des Heparins muss vom Hersteller durch geeignete Validierungsexperimente belegt werden. Diese werden bei der Arzneimittelzulassung bewertet.

Für alle nicht bereits als Arzneimittel zugelassenen Substanzen beziehungsweise Reagenzien muss die Virussicherheit bewertet und möglichst mit Daten belegt werden. Es gilt generell auch hier der Grundsatz, möglichst Materialien ohne beziehungsweise mit geringem Kontaminationsrisiko zu verwenden oder Substanzen, die einer Methode zur Virusinaktivierung unterworfen wurden. Es ist in der Praxis für den Hersteller eines Arzneimittels für Neuartige Therapien nicht immer einfach, die benötigten Informationen zur Virussicherheit für alle ver-

wendeten Reagenzien biologischen Ursprungs von den jeweiligen Lieferanten zu erhalten.

Testung von Zellkulturen

In Übereinstimmung mit dem EMA-Leitfaden für somatische Zelltherapie-Arzneimittel [7] sollte wenn immer möglich ein gut charakterisiertes Zellbanksystem etabliert werden, das aus einer „Master Cell Bank“ (MCB) und einer „Working Cell Bank“ (WCB) besteht. Da die Zahl der in einer MCB gelagerten Aliquots oft für eine Produktion über viele Jahre nicht ausreicht, ist es möglich – ausgehend von der MCB – viele Arbeitszellbanken zu generieren. Derartige Zellbanksysteme sichern eine kontinuierliche Herstellung des Arzneimittels.

Eine MCB kann mit versteckten Erregern, die sich erst bei der weiteren Kultivierung der Zellen bis zur Nachweisbarkeit vermehren, kontaminiert sein. Aus diesem Grund wird eine erneute Testung an „End of Production Cells“ (EP-Zellen) gefordert. Diese Zellen haben die gleiche Zahl an Zellteilungen durchlaufen wie die Zellen aus der Produktion. Bei der EP-Zellen-Testung wird auch ein In-vitro-Test durchgeführt, das heißt, das Testmaterial wird auf Indikatorzellen gegeben, in denen sich eventuell vorhandene Fremd-viren vermehren können. Eine Infektion der Indikatorzellen wird über lichtmikroskopische Untersuchungen auf Zellschäden, eine Adsorption von Erythrozyten an die infizierten Zellen (Hämadsorption) oder durch viruspezifische Immunfluoreszenztests nachgewiesen. Die Indikatorzellkulturen umfassen auch humane Zellen und Affenzellen zum Nachweis von Retroviren. Bei Affenzellen ist auf eine Kontamination mit dem Herpes-B-Virus sowie mit dem Simian Virus 40 (SV40) zu achten. Weitere spezifische Virustests (PCR) sind bei Zellen humanen Ursprungs (zum Beispiel auf HIV, HBV, HCV, Hepatitis-A-Virus, Zytomegalievirus, Epstein-Barr-Virus et cetera) oder bei Insektenzellen durchzuführen. Bei Insektenzellen ist insbesondere auf zoonotische Viren (zum Beispiel Flaviviren wie das West-Nil-Virus) zu achten.

Eine Kontamination mit Viren während der Herstellung des Arzneimittels

kann trotz aller Maßnahmen wie sorgfältige Spenderauswahl, Spendertestung und Testung der Ausgangsmaterialien sowie aller Hilfsstoffe nicht immer mit Sicherheit ausgeschlossen werden. So gibt es bei den eingesetzten Virentests Nachweisgrenzen (PCR, In-vitro-Test, In-vivo-Test). Für den Fall, dass fötales Rinderseum und/oder Trypsin bei der Kultivierung der Zellen verwendet werden, sollten diese vorab in vitro auf Rinder- und Schweineindikatorzelllinien auf kontaminierende Viren untersucht werden.

Eine besondere Problematik ergibt sich, wenn Zellen vor der Anwendung am Patienten nicht gelagert (zum Beispiel eingefroren) werden können. Eine In-vitro-Testung auf Indikatorzellen dauert 14 bis 28 Tage. Daher können diese Zelltherapie-Arzneimittel nicht unmittelbar vor ihrem Einsatz auf Fremdviren getestet werden. Gerade in diesen Fällen, ist auf eine strikte Auswahl virussicherer Ausgangsmaterialien und Reagenzien sowie auf eine kontaminationsrisikofreie Produktionsweise (Zellkulturphase) zu achten.

Inaktivierungsmethoden

Mit der Umsetzung der EU-Richtlinien 2004/23/EG, 2006/17/EG und 2006/86/EG im Gewebegesetz sowie den begleitenden Verordnungen (AMWHV, TPG-GewV) wurden auch die grundlegenden Anforderungen an die Virussicherheit der Gewebespenden definiert. Während infektionsserologische Testungen (Anti-HIV, Anti-HCV, HBsAg, Anti-HBc, TPHA) vorgeschrieben sind, wird der Nukleinsäure-Nachweis für HIV, HBV, HCV nicht explizit gefordert. Inaktivierungsverfahren können nur in einem sehr begrenzten Maße durchgeführt werden, da es dabei – wie eingangs bereits beschrieben – zur irreversiblen Schädigung der Zellen oder Gewebe kommen kann. Inaktivierungsverfahren sind jedoch für avitale Gewebekomponenten (zum Beispiel Kollagengerüste et cetera) vorstellbar beziehungsweise möglich. Hier sind Verfahren wie eine Behandlung mit Säuren (Peressigsäure), Hitzeinaktivierung oder Gammabestrahlungen denkbar. Diese Verfahren sind sowohl mit Blick auf ihre Virusinaktivierungskapazität als auch auf mögliche Schädigungen der

Produkteigenschaften zu untersuchen. Zellkulturzusätze können je nach Stabilität und Größe auch einer Reihe von Methoden wie Hitzebehandlung, Gammabestrahlung oder Virusfiltration unterzogen werden. Die Erfahrung bei der Produktion rekombinanter Proteine in Zellkulturen zeigt, dass die Verwendung virusinaktivierter Rinderseren das Kontaminationsrisiko signifikant reduziert.

Fazit

Bei Produkten, die aus lebenden Zellen bestehen, scheidet die Möglichkeit der Virusinaktivierung durch zum Beispiel Hitzebehandlungen oder chemische Verfahren grundsätzlich aus. Diese Methoden könnten die Zellen selbst abtöten. Als Folge dieser Einschränkungen kommt hier den anderen Maßnahmen, wie der sorgfältigen Selektion und der Testung von Ausgangsmaterialien, grundsätzlich eine besondere Bedeutung zu.

Gentransferarzneimittel

Gentransferarzneimittel sind dazu bestimmt, definierte Gene in einen Organismus einzuführen und dort zu exprimieren. Sie können zu diagnostischen, prophylaktischen oder therapeutischen Zwecken eingesetzt werden. Die zu transferierenden Gene sind in Vektoren eingebaut, die die Übertragung und Expression der Gene in die/den Empfängerzellen (host cells) des Organismus ermöglichen. Die Vektoren können viralen oder nicht-viralen Ursprungs sein. Bei viralen Vektoren ist die zu transferierende DNA oder RNA Bestandteil eines Viruspartikels. Nicht-virale Vektoren bestehen meist aus in Bakterien produzierter Plasmid-DNA. Die Vektoren werden entweder direkt in den Patienten übertragen (In-vivo-Gentransfer) oder zunächst in Empfängerzellen, die sich außerhalb des Organismus befinden (Ex-vivo-Gentransfer). Erst diese genetisch modifizierten Zellen werden dann dem Patienten verabreicht.

Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wird üblicherweise in bakteriellen Zellkulturen produziert. Humane oder animale Viren können

sich nicht in Bakterien vermehren. Tierische Nährmedien wie mit Trypsin oder Pepsin behandelte Fleischextrakte (Tryptone beziehungsweise Peptone) werden durch Autoklavieren sterilisiert, weshalb hier kein Viruskontaminationsrisiko besteht. Bei Verwendung von Plasmid-DNA sind die tierischen Materialien daher lediglich mit Blick auf eine Kontamination mit animalen TSE-Erregern entsprechend dem europäischen Leitfaden [6] zu bewerten. Bei der Reinigung der Plasmid-DNA wird gelegentlich ein enzymatischer Verdau mittels RNA-degradierender Enzyme (RNAsen) durchgeführt. RNAsen werden häufig aus Bauchspeicheldrüsen von Rindern gewonnen, weshalb auch hier das theoretische Risiko der Kontamination mit Viren beziehungsweise mit BSE-Erregern durch die Auswahl geeigneter Produkte mit vernachlässigbarem Risiko zu berücksichtigen ist.

Virale Gentransferarzneimittel

Die Produktion viraler Gentransferarzneimittel weist viele Parallelen mit der von viralen Lebendimpfstoffen auf. In beiden Fällen werden infektiöse Viruspartikel in Zellkulturen oder auf Hühneriern (Vaccinia-Vektoren) gezüchtet. Daher ist es konsequent, die Prinzipien der Testung auf virale Kontaminationen, die in den entsprechend allgemeinen Texten des Europäischen Arzneibuchs für virale Lebendimpfstoffe ausgeführt sind [8, 9], auch auf die viralen Gentransferarzneimittel anzuwenden [10]. Bei der Auswahl der Produktionshilfsstoffe (Zellkulturmedien, Zusätze wie Rinderseren, Wachstumsfaktoren) ist neben dem TSE-Risiko auch das Risiko einer viralen Kontamination zu berücksichtigen. Generell gilt auch hier der Grundsatz, möglichst Materialien ohne beziehungsweise mit geringem Kontaminationsrisiko zu verwenden oder Substanzen (Rinderseren, Schweinetrypsin), die einer Methode zur Virusinaktivierung unterworfen wurden. Verwendetes Schweinetrypsin muss frei von Parvoviren und Pestiviren sein [8].

Testung der Zellkulturen zur Produktion von Virusvektoren

Wie bei den Zelltherapie-Arzneimitteln beschrieben, muss grundsätzlich ein System aus definierten Zellbanken (MCB, WCB) etabliert werden. Die MCB wird gemäß Arzneibuch mittels Elektronenmikroskopie (ELMI) auf das Vorliegen von Viren untersucht. Außerdem werden diese Zellen mit dem „Product Enhanced Reverse Transcriptase Assay“ (PERT) auf Retroviren getestet. Der PERT ist ein extrem sensitives Nachweisverfahren für ein spezifisch retrovirales Enzym, die reverse Transkriptase (RT). Die RT produziert aus einer angebotenen Substrat-RNS ein DNS-Produkt, das anschließend mittel PCR-Technologie um ein Vielfaches vermehrt wird. Mit dem PERT ist es möglich, extrem geringe RT-Mengen nachzuweisen, die lediglich fünf bis zehn Retroviruspartikeln entsprechen.

In einer MCB können versteckte Kontaminationen enthalten sein, die sich erst bei weiterer Kultivierung der Zellen bis zur Nachweisbarkeit vermehren. Daher wird eine noch ausführlichere Testung der Zellen aus der Endphase der Produktion (EP-Zellen) gefordert. Die EP-Zellen werden mittels ELMI, PERT und Indikatorzellkulturen auf Viruskontaminationen getestet. Diese Indikatorzellkulturen umfassen auch humane Zellen und Affenzellen zum Nachweis von Viren. Bei Affenzellen ist auf eine Kontamination mit dem Herpes-B-Virus sowie mit dem Simian Virus 40 (SV40) zu achten. Weiterhin werden die EP-Zellen in Tieren (neugeborene und erwachsene Mäuse, Hamster) sowie in embryonierten Hühnereiern getestet. Eine Testung der WCB selbst kann entfallen, wenn die Verdopplungszahl der getesteten EP-Zellen das Zellbanksystem einer WCB mit einschließt. Wird jedoch eine neue WCB etabliert, so sind die Tests an den EP-Zellen, die von dieser WCB abgeleitet wurden, erneut durchzuführen. Weitere spezifische Virustests (PCR) kommen bei Zellen humanen Ursprungs oder bei Insektenzellen infrage. Bei Insektenzellen ist insbesondere auf zoonotische Viren (zum Beispiel Flaviviren wie das West-Nil-Virus) zu achten.

Testung der viralen Saatmaterialien

Analog zu den Zellbanken werden auch für die Viren „Master Virus Seed Stock“ (MVSS) und „Working Virus Seed Stock“ (WVSS) etabliert. Die Virusbanken werden in Versuchstieren (neugeborene und erwachsene Mäuse sowie Hamster) getestet, wobei das Arzneibuch die Testung der WVSS nicht ausnimmt [9]. Weiterhin findet ein In-vitro-Test mit Indikatorzellen statt. Hier sind human diploide Indikatorzellen (zum Beispiel MRC-5-Zellen) sowie eine Zelllinie, die der Spezies der Produktionszellen entspricht, einzusetzen. Erfolgt die Produktion auf Vogelzellen oder in Eiern, werden zusätzlich embryonierte Hühnereier als Indikatoren verwendet. Da der In-vitro-Test nur potenziell vorhandene Fremdviiren anzeigen soll, müssen die in den Virusbanken enthaltenen Virusvektoren oder Helferviren selbst vorher mit spezifischen Antisera neutralisiert werden. Hierzu werden meist polyklonale tierische Seren verwendet. Dabei ist sicherzustellen, dass die Tiere, aus denen diese Antisera gewonnen werden, keine Virusinfektionen durchgemacht haben. Wäre dies nicht der Fall, würden diese Viren ebenfalls durch die Seren neutralisiert und nicht als Kontaminanten der viralen Vektorproduktion erkannt. Ein weiteres Problem des In-vitro-Tests ist, dass eine vollständige Neutralisation bestimmter Viren (Herpes-simplex-Virus oder Vaccinia-Virus) und von ihnen abgeleiteter Vektoren fallweise nicht möglich oder sehr schwierig ist. In diesen Fällen fordert das Arzneibuch geeignete Alternativen, die aber nicht näher spezifiziert werden. Infrage kommt eine umfassende PCR-Testung auf Viren, die als potenzielle Kontaminanten betrachtet werden.

Testung während der Produktion

Selbst bei Verwendung fremdvirusfreier Ausgangszellen und Saatmaterialien besteht immer noch das Risiko einer Fremdviruskontamination des Vektors während der Produktion - entweder über die Zellkulturzusätze oder durch unsauberes Arbeiten. Daher wird jede virale Vektorcharge zum Zeitpunkt ih-

rer Ernte auf Fremdviiren getestet. Das Arzneibuch fordert hier den In-vitro-Zellkulturtest. Wie bei der Testung der viralen Saatmaterialien müssen die produzierten viralen Vektoren und Helferviren zuvor mit spezifischen Antisera neutralisiert werden [9]. Analog zur Testung der Saatmaterialien, können auch hier Probleme mit einer unvollständigen Neutralisation von Vektoren oder Helferviren, die vom Vaccinia-Virus oder Herpes-simplex-Virus abgeleitet sind, auftreten. Grundsätzlich sind immer auch Kontrollzellen mitzuführen, die bis zu 14 Tagen nach Ernte der viralen Vektoren weiter zu kultivieren sind. Diese Zellen werden dann mittels Hämadsorption auf eventuell vorhandene Fremdviiren, die selbst zu keiner erkennbaren Zellschädigung führen, getestet. Werden Vogelzellen oder Vogeleier zur Produktion der viralen Vektoren verwendet, werden diese im In-vitro-Zellkulturtest auf das Vorliegen des Aviäre Leukosevirus (ALV) untersucht.

Replikationskompetente Viren

In vielen Fällen ist man bei der Produktion viraler Vektoren auf Helferviren angewiesen. Hierbei handelt es sich um Viren, die in der infizierten Zelle Gene exprimieren, die für die Synthese der viralen Vektoren notwendig sind. Allein können sich die viralen Vektoren in den Zellen nicht vermehren. Wenn sich die Helferviren in den Produktionszellen vermehren, werden sie als replikationskompetent bezeichnet. In anderen Systemen sind die zur Vektorproduktion notwendigen Gene in das Genom der Produktionszellen eingebaut. Auch hier besteht das Risiko, dass durch Rekombinationsereignisse zwischen dem Vektor und den in das zelluläre Genom integrierten viralen Genen replikationskompetente Viren entstehen (wie Retroviren, Adenoviren oder adenoassoziierte Viren). Replikationskompetente Viren sind im Gentransferarzneimittel meist unerwünscht, da sie den Empfängerorganismus infizieren und sich dort verbreiten können. Arzneimittel aus onkolytischen Viren enthalten jedoch fallweise replikationskompetente Viren, die Tumorzellen selektiv zerstören. Hier ist

eine Risikobewertung mit Blick auf deren mögliche Verbreitung im Organismus des Patienten und in der Bevölkerung vorzunehmen.

Eine Abtrennung replikationskompetenter Viren vom eigentlichen Vektor ist auf chemisch-physikalischem Wege kaum möglich, wenn es sich bei beiden um die gleiche Virusgruppe handelt, da sich die Viruspartikel kaum voneinander unterscheiden. Daher werden Produktionssysteme bevorzugt, in denen nicht-replikationskompetente Helferviren verwendet werden. Aber auch in diesem Falle können durch Rekombinationsereignisse replikationskompetente Viren entstehen, die das Arzneimittel verunreinigen. Daher sind alle Produktionssysteme mittels geeigneter Indikatorzellen auf die potenzielle Generierung oder Verunreinigung mit replikationskompetenten Viren zu testen. Wenn sich die Bildung unerwünschter replikationskompetenter Viren nicht ganz vermeiden lässt, sind alle Produktionschargen auf ihren Gehalt hin zu untersuchen. Ein Grenzwert für solche Kontaminationen ist bislang nicht definiert. In diesen Fällen ist das Vorgehen mit der zulassenden Behörde abzustimmen. Speziell bei Retroviren wird pro Dosis eine Konzentration von weniger als einem unerwünschten replikationskompetenten Viruspartikel angestrebt [11]. Die Einhaltung dieses Wertes ist aber in anderen Systemen – wie bei adenoviralen Vektoren – nicht immer zu gewährleisten.

Abtrennung unerwünschter Viren

Es ist kaum möglich, behüllte Virusvektoren zur Inaktivierung von potenziell kontaminierenden Viren einer physikalisch-chemischen Methode zu unterwerfen, da diese Verfahren immer auch die Infektiosität des Virusvektors beeinträchtigen. Bei nicht-behüllten Viren (Adenoviren, Parvoviren), die viel unempfindlicher als behüllte Viren sind, kann man aber solche Methoden einsetzen [12]. So werden bei der Ernte parvoviraler oder adenoviraler Vektoren zur Zellyse meist Detergenzien eingesetzt (Triton X-100), die auch die Lipidhülle von Viren zerstören. Bei geeigneten Konzentrationen, Einwirkzeiten und Tem-

peraturen trägt ein solcher Schritt daher wesentlich zur Vektorsicherheit mit Blick auf potenzielle Kontaminanten bei. Auch gibt es Virusfilter, die große Viren (Retroviren, Baculoviren, Herpesviren, Reoviren) zurückhalten. Extrem kleine Parvoviren wie das Adenoassoziierte Virus (AAV) können die Filter aber passieren. Gerade bei AAV-Vektoren könnte man sich daher die Anwendung solcher Filter vorstellen, um eine Reihe potenzieller Kontaminanten oder replikationskompetenter Baculo-Helferviren effektiv zu entfernen. Bedauerlicherweise haben diese Verfahren bislang noch keinen Eingang in die regulatorischen Leitfäden gefunden.

Korrespondenzadresse

Dr. J. Blümel
Paul-Ehrlich-Institut
Paul-Ehrlich-Str. 51-59, 63225 Langen
blujo@pei.de

Interessenkonflikt. Der korrespondierende Autor gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

1. Bekanntmachung der Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie) gemäß §§ 12 und 18 des Transfusionsgesetzes (TFG) (Novelle 2005) Bundesanzeiger, ausgegeben am 5.11.2005
2. Richtlinie 2002/98/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 27.1.2003 zur Festlegung von Qualitäts- und Sicherheitsstandards für die Gewinnung, Testung, Verarbeitung, Lagerung und Verteilung von menschlichem Blut und Blutbestandteilen und zur Änderung der Richtlinie 2001/83/EG (ABl. EG Nr. L33, 30–38)
3. Richtlinie 2006/17/EG der Kommission vom 8. Februar 2006 zur Durchführung der Richtlinie 2004/23/EG des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich technischer Vorschriften für die Spende, Beschaffung und Testung von menschlichen Geweben und Zellen (ABl. Nr. L38 vom 9.2.2006, S. 40)
4. Richtlinie 2004/23/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 31.03.2004 zur Festlegung von Qualitäts- und Sicherheitsstandards für die Spende, Beschaffung, Testung, Verarbeitung, Konservierung, Lagerung und Verteilung von menschlichen Geweben und Zellen (ABl. EG Nr. L102, 48–58)
5. Verordnung über Anforderungen an Qualität und Sicherheit der Entnahme von Geweben und deren Übertragung nach dem Transplantationsgesetz (TPG-Gewebeverordnung – TPG-V) vom 26. März 2008. Bundesgesetzblatt Jahrgang 2008 Teil I Nr.12:512–520
6. CHMP Note For Guidance On Minimising The Risk Of Transmitting Animal Spongiform Encephalopathy Agents Via Human And Veterinary Medicinal Products (EMA/410/01 – Rev. 2) <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/bwp/TSE%20NFG%20410-rev2.pdf>
7. CHMP Guideline on human cell-based medicinal product (CHMP/410869/06). <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/cpwp/41086906enfin.pdf>
8. European Pharmacopoeia. 6th Ed. General Text 5.2.3. Cell substrates for the production of vaccines for human use. Council of Europe, Strasbourg
9. European Pharmacopoeia. 6th Ed. Biological Test 2.6.16. Test for extraneous agents in viral vaccines for human use. Council of Europe, Strasbourg
10. European Pharmacopoeia. 6th Ed. General Text 5.1.14. Gene transfer medicinal products for human use. Council of Europe, Strasbourg
11. CHMP Guideline on Development and Manufacture of Lentiviral vectors CHMP/BWB/2485/03. <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/bwp/245803en.pdf>
12. Thorne BA, Quigley P, Nichols G et al (2008) Characterizing clearance of helper adenovirus by a clinical rAAV1 manufacturing process. *Biologicals* 36:7–18