

**Stiftung zur Förderung
der Erforschung von
Ersatz- und
Ergänzungsmethoden
zur Einschränkung von
Tierversuchen**

set



Projekt

Entwicklung einer In-vitro-Methode zur Bestimmung von
Tetanus-Toxizität in Tetanus-Impfstoffen

Dr. Karin Weisser, Dr. Beate Krämer

02/2011 – 04/2012



3R reduce
refine
replace

Mainzer Landstraße 55
60329 Frankfurt/Main
Telefon 069-2556-1226
www.stiftung-set.de
info@stiftung-set.de

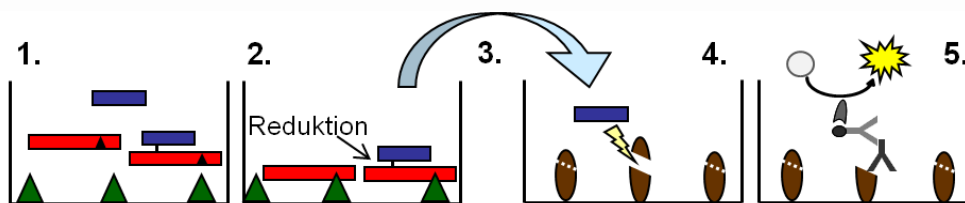
www.stiftung-set.de

Entwicklung einer In-vitro-Methode zur Bestimmung von Tetanus-Toxizität in Tetanus-Impfstoffen

Tetanusimpfstoffe werden aus dem Neurotoxin des Bakteriums *Clostridium tetani* durch chemische Inaktivierung hergestellt. Nach den Vorgaben des Europäischen Arzneibuchs muss das bei der Inaktivierung entstandene Toxoid durch *in vivo*-Toxizitätstests auf die Abwesenheit von Tetanustoxin und die Irreversibilität des Toxoids geprüft werden. Dabei werden Proben von jeder hergestellten Tetanustoxoid-Charge in insgesamt 15 (für Humanimpfstoffe) bzw. 10 Meerschweinchen (für Veterinärimpfstoffe) injiziert, und die Tiere werden 3 Wochen in Bezug auf Symptome von Tetanus-Toxizität beobachtet. Das Ziel unseres Projektes besteht in der Entwicklung eines *in vitro*-Testsystems zum Nachweis bzw. Ausschluss von aktivem Tetanus-Neurotoxin (TeNT), das diese Tierversuche ersetzen kann.

Da Zellkultur-basierte Modelle zur Detektion von Tetanus-Toxizität keine ausreichende Sensitivität bieten, konzentriert sich unser Projekt auf den funktionellen Nachweis von TeNT mit biochemischen Methoden. TeNT-Moleküle bestehen aus zwei Untereinheiten: Die schwere Kette vermittelt die Bindung und Aufnahme des Toxins in Nervenzellen, während die leichte Kette eine Proteasedomäne enthält, die in den Zellen spezifisch das Protein Synaptobrevin spaltet. Diese Spaltung hemmt die Freisetzung inhibitorischer Neurotransmitter und stellt den entscheidenden Schritt im Wirkmechanismus des Toxins dar. Frühere Ergebnisse unserer Projektgruppe hatten gezeigt, dass Methoden, die entweder ausschließlich auf dem Nachweis der Proteaseaktivität oder der Bindungsfähigkeit des Toxins beruhen, für eine sichere Bestimmung von Tetanus-Toxizität ungeeignet sind. Bei solchen Ansätzen führen beispielsweise isoliert vorliegende Toxin-Untereinheiten zu falsch-positiven Signalen.

Deshalb haben wir ein kombiniertes Testsystem entwickelt, das durch die funktionelle Verknüpfung von zwei Methoden beide für die Toxizität relevanten Eigenschaften von TeNT berücksichtigt. Die grundlegende Besonderheit dieses Testsystems besteht darin, dass Toxinmoleküle nur dann ein Signal erzeugen, wenn sie sowohl eine funktionsfähige Bindungsdomäne als auch eine aktive Proteasedomäne besitzen - und wenn sich zudem diese Domänen auf separaten, durch Reduktion trennbaren Untereinheiten befinden.



Schema des kombinierten Testsystems: (1.) Tetanustoxin-Moleküle binden über ihre schweren Ketten (rot) an immobilisierte Rezeptormoleküle (grün). (2.) Durch Zugabe eines Reduktionsmittels werden die leichten Toxin Ketten (blau) abgelöst, und ihre Proteasedomäne wird aktiviert. (3.) Die leichten Ketten werden auf eine Platte übertragen, die mit dem Substratprotein Synaptobrevin (braun) beschichtet ist. (4.) Die leichten Toxin Ketten spalten spezifisch das Synaptobrevin. (5.) Das Spaltfragment wird mit Hilfe eines Antikörpers nachgewiesen, das dabei entstehende Farbsignal wird gemessen.

Wir konnten bereits zeigen, dass das kombinierte Testsystem in der Lage ist, zwischen giftigem TeNT und ungiftigem Tetanustoxoid zu unterscheiden. Außerdem kann aktives TeNT, das zu Impfstoff-Toxoiden künstlich zugesetzt wurde, mit diesem Testsystem detektiert werden. Das bisher entwickelte Testsystem ist demnach bereits für den funktionellen Nachweis von Tetanustoxin geeignet. Bevor es jedoch als Alternative zu den an Meerschweinchen durchgeführten Toxizitätstests eingesetzt werden kann, muss vor allem die Sensitivität der Methode weiter verbessert werden. Das Ziel der Arbeiten in dem Förderzeitraum besteht deshalb zunächst in der weiteren Optimierung diverser experimenteller Parameter, um die Nachweisgrenze der Methode an diejenige des Tierversuchs anzunähern. Weiterhin soll getestet werden, ob die Methode für die Prüfung von Tetanustoxoiden aller relevanten Impfstoffhersteller anwendbar ist. Längerfristig streben wir eine Aufnahme des kombinierten Testsystems in das Europäische Arzneibuch als Ersatz für die oben genannten Tierversuche an.

Titel des Projektes

Entwicklung einer In-vitro-Methode zur Bestimmung von Tetanus-Toxizität in Tetanus-Impfstoffen

Projektleiter

Dr. Karin Weißer, Dr. Beate Krämer

Ausführende Institution

Paul-Ehrlich-Institut
Paul-Ehrlich-Straße 51-59
63225 Langen

Förderungslaufzeit

01.12.2010 - 30.11.2011

Dieses Projekt war zuvor bereits von der Schweizer Doerenkamp-Zbinden-Stiftung und der Schweizer Organisation AnimalFree Research finanziert worden.