

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

**set**



## Projekt

Chargenprüfung von adjuvantierten Tollwutimpfstoffen  
mittels Elektrodesorption

Dr. Max Bastian, Paul-Ehrlich-Institut, Langen

08/2013 – 01/2015



**3R** reduce  
refine  
replace

Mainzer Landstraße 55  
60329 Frankfurt/Main  
Telefon 069-2556-1226  
[www.stiftung-set.de](http://www.stiftung-set.de)  
[info@stiftung-set.de](mailto:info@stiftung-set.de)

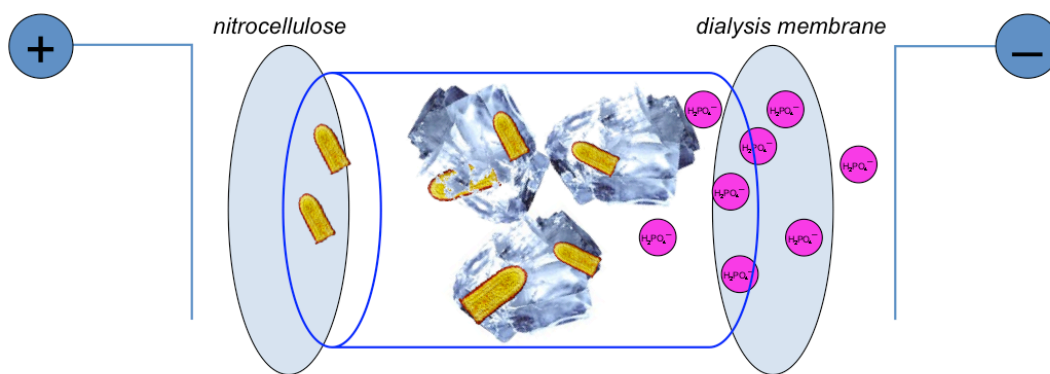
[www.stiftung-set.de](http://www.stiftung-set.de)

## Chargenprüfung von adjuvantierten Tollwutimpfstoffen mittels Elektrodesorption

Die Chargenprüfung von Impfstoffen ist eine hoheitliche Aufgabe, die am Paul-Ehrlich-Institut in Langen wahrgenommen wird. Der Wirksamkeitsprüfung von Tollwutimpfstoffen gilt aufgrund der Unheilbarkeit und der gravierenden Symptomatik der Erkrankung eine ganz besondere Aufmerksamkeit. Die meisten Tollwutimpfstoffe – insbesondere für die Anwendung am Tier – werden auf konventionelle Weise hergestellt: Dazu wird das Impfvirus zunächst in Zellkultur vermehrt. Zur Freisetzung des Virus werden die Zellen zerstört und der Virustiter der Ernte bestimmt. Mindest- und Maximaltitel der Ernte sind impfstoffspezifisch festgelegt. Anschließend erfolgen die Inaktivierung des Virus und die Adsorption an aluminiumhaltige Adjuvantien. In den meisten Ländern erfolgt die Wirksamkeitsprüfung der Impfstoffe nach wie vor anhand einer Belastungsinfektion, im sogenannten NIH-Test. Dazu werden Mäuse mit verschiedenen Verdünnungen des zu testenden Impfstoffes geimpft und anschließend mit virulentem Tollwutvirus infiziert. Das Einsetzen klinischer Symptome wird in Abhängigkeit von der Immunisierung beobachtet. Anhand des Vergleichs mit einem Standardimpfstoff wird daraus die Wirksamkeit der jeweiligen Charge berechnet. Es ist allgemein anerkannt, dass dieser Test sehr schlecht standardisierbar und reproduzierbar und zudem hoch belastend für die Versuchstiere ist, da er mit einer intrazerebralen Injektion und mit dem Tod durch klinische Tollwut einhergeht (Barth et al., 1988). In den vergangenen Jahrzehnten wurden daher – nicht zuletzt durch Arbeiten unseres Institutes – für diesen Test mehrere Ansätze des 3R-Konzepts verfolgt.

Einen vielversprechenden Ansatz zu einer völlig tierversuchsfreien Prüfung inaktivierter Tollwutimpfstoffe stellt dabei die Antigenquantifizierung dar. Anhand der Mengenbestimmung des enthaltenen Antigens sollte sich im Sinne einer Konsistenzprüfung auf die Wirksamkeit einer Charge rückschließen lassen. Für den Schutz gegen Tollwut ist die Bildung neutralisierender Antikörper, die gegen das G-Protein des Tollwutvirus gerichtet sind, entscheidend. Die Schutz vermittelnden Epitope sind bekannt. Es sind monoklonale Antikörper gegen diese Epitope verfügbar und wurden in der Humanmedizin erfolgreich in der postexpositionellen Prophylaxe eingesetzt (Müller et al., 2009). Für nichtadjuvantierte Humanimpfstoffe wurde anhand dieser monoklonalen Antikörper eine zusätzliche Prüfmethode entwickelt, bei der mittels ELISA die Menge an G-Protein im Impfstoff bestimmt wird. Allerdings wird diese Methode bislang als alleinige Endproduktprüfung nicht akzeptiert. Obwohl die Bereitschaft, derartige Methoden als Endproduktprüfungen zu akzeptieren, für Veterinärimpfstoffe deutlich größer ist, stellt ein solcher ELISA für die alum-adjuvantierten Veterinärimpfstoffe keine praktikable Alternative dar, da die feste Bindung der Impfantigene an das Aluminiumsalz eine Antigenquantifizierung mittels ELISA unmöglich macht. Um dieses Problem zu lösen, wurden verschiedenen Methoden entwickelt, die Antigene zu desorbieren, d.h. die Antigene vom Adjuvans abzutrennen. Die bislang verfügbaren Protokolle beruhen auf einer chemischen Desorption der Impfantigene vom Aluminiumhydroxid Adjuvans. Allerdings ist bislang unklar, ob diese Ansätze in der Lage sind, die gebundenen Antigene quantitativ zu desorbieren. In unserem Labor verfolgen wir daher einen neuen Ansatz.

Dabei werden die zu testenden Impfstoffe in einem entsprechenden Puffersystem einem elektrischen Feld ausgesetzt. Zusätzlich zur chemischen Desorption werden die Antigene also elektrophoretisch vom Adjuvans abgelöst und auf einer Nitrocellulosemembran immobilisiert. Anschließend kann die Menge an abgelöstem Impfantigen im Sinne eines Immunoblots detektiert und quantifiziert werden. In ersten Vorversuchen hat sich die Methode als praktikabel und einfach durchzuführen herausgestellt. Da die Methode je nach Verfügbarkeit geeigneter Antikörper sehr vielseitig einsetzbar ist, hat sie das Potential, bei einer Reihe von Impfstoffen als Prüfmethode eingesetzt zu werden und damit möglicherweise eine Reihe von Tierversuchen überflüssig zu machen.



**Schematische Darstellung der Elektrodesorptionsmethode:** Der aluminiumhydroxid-adjuvantierte Tollwutimpfstoff wird in einem geeigneten Desorptionspuffer in die Desorptionskammer eingefüllt. Anschließend wird ein elektrisches Feld angelegt. Die Tollwutantigene wandern zur Anode und werden an einer Nitrocellulose-Membran immobilisiert. Die immobilisierten Antigene werden anschließend mit spezifischen Antikörpern detektiert.



## Projektleiter

### **Dr. med vet Max Bastian**

Jahrgang 1973, Studium der Veterinärmedizin an der Tierärztlichen Hochschule, Hannover, von 1993-1999; Dissertation am Schweizerischen Tropeninstitut Basel von 2000-2004 anschließend wissenschaftlicher Mitarbeiter an den Instituten für Medizinische, bzw. Klinische Mikrobiologie der Universitäten Erlangen und Ulm von 2004-2008, seit 2009 Forschungsgruppenleiter in der Veterinärabteilung des Paul-Ehrlich-Institutes.

## Mitarbeiter

### **Anna Geißler**

Jahrgang 1991, Ausbildung zur Biolaborantin an der Universität Tübingen von 2010- 2013, seit August 2013 Mitarbeiterin in der Veterinärabteilung des Paul-Ehrlich-Institutes.

## Ausführende Institution

Paul-Ehrlich-Institut, Langen

## Förderungslaufzeit

01.08.2013 - 31.01.2015