



# Tierexperimentelle Untersuchungen im Rahmen der Qualitätskontrolle von Arzneimitteln

## Durchsicht des Europäischen Arzneibuches 4. Ausgabe 2002

Gisbert Sponer

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

### Zusammenfassung

*In der 4. Ausgabe des Europäischen Arzneibuches werden eine Reihe von tierexperimentellen Untersuchungen erwähnt, die im Rahmen der Qualitätskontrolle von Arzneimitteln durchzuführen sind. Dies betrifft sowohl Untersuchungen zur Wertbestimmung als auch Sicherheitstests. Zu den letzteren zählen die Untersuchungen auf Histamingehalt, auf pyrogene Verunreinigungen sowie die Prüfung auf anomale Toxizität.*

*Auch wenn die Sicherheit von Arzneimitteln von hoher Bedeutung ist, sollten diese Tests auf ihre Unerlässlichkeit (im Sinne von § 7, Deutsches Tierschutzgesetz, 2002) geprüft werden.*

*Für die Untersuchung auf Histamingehalt gibt es möglicherweise chemisch-analytische Methoden, die sich als Alternativen zum Tierversuch eignen. Die Prüfung auf anomale Toxizität ist wegen ihrer Unspezifität wissenschaftlich zu hinterfragen. Bei der Prüfung auf pyrogene Verunreinigungen wird in vielen Monographien der Test auf Bakterien-Endotoxine als Alternative beschrieben; bei den verbleibenden Monographien ist jedoch eine nochmalige Überprüfung im Einzelfall wünschenswert, um abzuklären, ob der Pyrogenitätstest am Kaninchen unverzichtbar ist. Durch den globalen Handel von Arzneimitteln, die andererseits den nationalen Qualitätsstandards entsprechen müssen, ist eine Verminderung von Tierversuchen nur zu erreichen, wenn man durch eine fruchtbare Kooperation zwischen Arzneimittel-Herstellern, Gesundheitsbehörden und Arzneibuch-Kommissionen zu einem Konsens kommt. Die International Conference on Harmonization könnte ein Gremium sein, das diese Themen aufgreift und zu einer international akzeptierten und wissenschaftlich fundierten Verminderung von Tierversuchen beiträgt.*

**Summary:** Animal experiments in the context of quality control of pharmaceuticals. Review of the European Pharmacopoeia, 4<sup>th</sup> edition, 2002

*In the 4<sup>th</sup> edition of the European Pharmacopoeia, animal experiments are described, which are required for the quality control of pharmaceuticals. This refers to investigations regarding both biological activity and safety aspects of the medication. The latter include investigations to find contaminations with histamine and pyrogenic substances and tests for abnormal toxicity. Even though the safety of medical drugs is of great importance, it should be examined whether these tests are still indispensable (in terms of § 7 of the German Animal Protection Law of 2002). The determination of histamine content may also be possible by chemical-analytical methods, which could represent an alternative to the animal experiment. The testing of abnormal toxicity should be scientifically questioned due to its lack of specificity. Although the in vitro test detecting bacterial endotoxins is mentioned in many monographs, the in vivo test on rabbits to test for pyrogenicity is still mentioned in some other monographs. The in vivo test should be rechallenged as to whether it can be replaced. In light of the global trade in pharmaceuticals, which must also fulfill national quality standards a reduction in animal experiments can only be reached by fruitful cooperation between pharmaceutical companies, health authorities and the commissions of the pharmacopoeias, leading to the formation of a consensus. The International Conference on Harmonization could prove an auspicious panel to take up this subject and to contribute to an internationally accepted and scientifically based reduction of animal experiments.*

**Keywords:** quality control, European Pharmacopoeia, bioassays, abnormal toxicity, pyrogenicity

### 1 Einleitung

Über tierexperimentelle Untersuchungen, die im Rahmen der Qualitätskontrolle von Arzneimitteln durchgeführt werden, ist bereits in vielen Gremien und Publikationen diskutiert worden (Ronneberger, 1993; Charton and Castle, 2001; Krämer et al., 1996; Miethe und Sponer, 2002).

Welche Tierversuche auf diesem Gebiet durchzuführen sind, ist in den Arzneibüchern festgelegt. Maßgeblich für unsere geographische und politische Region ist das Europäische Arzneibuch, in begrenztem Maße auch das Deutsche Arzneibuch. Andererseits sind durch den weltweiten Handel und Vertrieb von Arzneimitteln auch die Amerikanische Pharmacopoeia

sowie die entsprechenden amtlichen Publikationen aus Japan und anderen Ländern von Bedeutung, damit beim möglichen Export den internationalen Anforderungen Rechnung getragen werden kann. Zu beachten sind schließlich auch die Empfehlungen der WHO (2003).

Auf der Grundlage einer Durchsicht der 3. Ausgabe des Europäischen Arznei-



buches haben wir bereits früher zusammengestellt, welche tierexperimentellen Untersuchungen zur Qualitätskontrolle von Arzneimitteln in den einzelnen Monographien festgelegt sind (Miethe, 2002; Miethe und Spöner, 2002). Dabei haben wir uns verstärkt mit der Wertbestimmung von biologisch gewonnenen Arzneimitteln befasst und Möglichkeiten für alternative Methoden aufgezeigt.

In der Zwischenzeit ist die 4. Ausgabe des Europäischen Arzneibuches einschließlich einiger Nachträge erschienen (Council of Europe, 2002). Wir haben dieses Standardwerk (Stand Januar 2004) erneut daraufhin durchgesehen, für welche Arzneimittel weiterhin Tierversuche

im Rahmen der Qualitätskontrolle in den Monographien erwähnt sind. In der jetzt aktualisierten Durchsicht wurden auch die Monographien für Sera und Impfstoffe einbezogen. Im Folgenden werden insbesondere die Sicherheitstests besprochen, also die tierexperimentellen Untersuchungen, mit denen Verunreinigungen ausgeschlossen werden sollen.

Unsere Untersuchungen haben wir die Deutsche Ausgabe des Europäischen Arzneibuches zugrunde gelegt, wohl wissend, dass sie Übersetzungen aus dem Englischen enthält und dass bereits Nachträge in der englischen Fassung vorliegen, die als deutsche Version noch nicht verfügbar sind.

## 2 Bioassays als Sicherheitstests

### 2.1 Prüfung auf Histamingehalt und auf blutdrucksenkende Substanzen

Die Prüfung auf Verunreinigung mit Histamin ist bei den Wirkstoffen vorgesehen, die auch weiterhin aus histamin- oder histidinreichen Geweben gewonnen werden, nämlich bei Aprotinin, Trypsin und Chymotrypsin (s. Tabelle).

Diese Untersuchungen werden am isolierten Darm von getöteten Meerschweinchen durchgeführt. Geprüft wird auf glattemuskuläre Kontraktion des Darmes (Kapitel 2.6.10. Ph. Eur.). Bei unklarem Versuchsergebnis muss eine Unter-

**Tabelle zur Übersicht über die in der Europäischen Pharmakopöe verlangten tierexperimentellen Untersuchungen auf anomale Toxizität (AT), Pyrogenität, Histamingehalt sowie biologische Wertbestimmung**

| Titel                                              | Seite im Europ. Arzneibuch (deutsche Fassung, 4. Ausg. 2002) | Prüfung auf       |                       |             |          |                | Bemerkungen/Methoden                                        |
|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------|-----------------------|-------------|----------|----------------|-------------------------------------------------------------|
|                                                    |                                                              | Anomale Toxizität | Bakterien-endo-toxine | Pyrogenität | Histamin | Wertbestimmung |                                                             |
| Cholera-Impfstoff                                  | 793, 794                                                     | X                 |                       |             |          |                |                                                             |
| Gelbfieber-Impfstoff                               | 809                                                          | X                 |                       |             |          |                |                                                             |
| Haemophilus-Typ B-Impfstoff                        | 813                                                          | X                 | X                     | X           |          |                |                                                             |
| Hepatitis A-Impfstoff                              | 817, 3461                                                    | X                 |                       |             |          |                |                                                             |
| Hepatitis A/B-Impfstoff                            | 820                                                          | X                 |                       |             |          |                |                                                             |
| Hepatitis B-Impfstoff                              | 821                                                          | X                 |                       | X           |          |                |                                                             |
| Influenza-Impfstoff                                | 823, 825, 828                                                | X                 |                       |             |          |                |                                                             |
| Masern-Impfstoff                                   | 830                                                          | x                 |                       |             |          |                |                                                             |
| Masern-, Mumps-, Röteln-Impfstoff                  | 832                                                          | X                 |                       |             |          |                |                                                             |
| Meningokokken-Impfstoff                            | 834                                                          | X                 |                       | X           |          |                |                                                             |
| Mumps-Impfstoff                                    | 836                                                          | X                 |                       |             |          |                |                                                             |
| Pneumokokken-Impfstoff                             | 847                                                          | X                 |                       | X           |          |                |                                                             |
| Poliomyelitis-Impfstoff                            | 850                                                          | X                 |                       |             |          |                | bei Poliomyelitis-Oral (854) keine Prüfung auf AT gefordert |
| Röteln-Impfstoff                                   | 859                                                          | X                 |                       |             |          |                |                                                             |
| Tollwut-Impfstoff                                  | 863                                                          | X                 | X                     | X           |          |                |                                                             |
| Typhus-Impfstoff                                   | 866, 869, 3470                                               | X                 |                       |             |          |                | bei Typhus-Lebend-Oral (867) keine Prüfung auf AT gefordert |
| Varizellen-Impfstoff                               | 871, 4635                                                    | X                 |                       |             |          |                |                                                             |
| 99mTc Technetium-Macrosalb-Injektionslösung        | 1041                                                         |                   |                       | X           |          |                |                                                             |
| 99mTc Technetium Mikrosphärenlösung                | 1045                                                         |                   |                       | X           |          |                |                                                             |
| 99mTc Technetium Rheniumsulfat-Kolloidlösung       | 1048                                                         |                   |                       | X           |          |                |                                                             |
| 99mTc Technetium Schwefel-Kolloid-Injektionslösung | 1050                                                         |                   |                       | X           |          |                |                                                             |



| Titel                                          | Seite im Europ. Arzneibuch (deutsche Fassung, 4. Ausg. 2002) | Prüfung auf       |                         |               |          |                  | Bemerkungen/ Methoden                                                                                                                                                   |
|------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------------|---------------|----------|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                |                                                              | Anomale Toxizität | Bakterien- endo- toxine | Pyro- genität | Histamin | Wertbe- stimmung |                                                                                                                                                                         |
| 99mTc Technetium Zinnphosphat- Infusionslösung | 1052                                                         |                   |                         | X             |          |                  | Bei mehreren anderen 99mTc Technetium Injektionslösungen keine Prüfung auf Pyrogenität erwähnt                                                                          |
| N-Acetyltyrosin                                | 1108                                                         |                   |                         | X             |          |                  |                                                                                                                                                                         |
| Albuminlösung am Menschen                      | 1120, 3483                                                   |                   |                         | X             |          |                  |                                                                                                                                                                         |
| Alt-Tuberkulin zur An- wendung beim Menschen   | 1151                                                         | (X)               |                         |               |          | X                | als Prüfung auf Toxizität (nicht AT) im Abschnitt „Reinheit“ erwähnt, ent- spricht aber in Ausführung und Unspezifität der AT                                           |
| Anikacinsulfat                                 | 1167                                                         |                   |                         | X             |          |                  |                                                                                                                                                                         |
| Antithrombin III-Konzentrat vom Menschen       | 1210                                                         |                   |                         | X             |          |                  |                                                                                                                                                                         |
| Aprotinin                                      | 1213, 1215, 4385, 4387                                       | X                 |                         |               | X        |                  | Histaminprüfung ersetzbar durch HPLC?                                                                                                                                   |
| Blutgerinnungsfaktor VII vom Menschen          | 1223                                                         |                   |                         | X             |          |                  |                                                                                                                                                                         |
| Blutgerinnungsfaktor VIII vom Menschen         | 1225, 3497                                                   |                   |                         | X             |          |                  |                                                                                                                                                                         |
| Blutgerinnungsfaktor IX vom Menschen           | 1227, 3498                                                   |                   |                         | X             |          |                  |                                                                                                                                                                         |
| Bacitracin-Zn                                  | 1240                                                         |                   | X                       | X             |          |                  | Keine Prüfung auf Pyrogenität bei Bacitracin (1239)                                                                                                                     |
| Calciumlävulinat-Dihydrat                      | 1388                                                         |                   |                         | X             |          |                  |                                                                                                                                                                         |
| Chloramphenicol                                | 1490                                                         |                   |                         | X             |          |                  |                                                                                                                                                                         |
| Chloramphenicolhydrogen- succinat              | 1491                                                         |                   |                         | X             |          |                  | bei Chlorampheni- colpalmitat (1492) keine Prüfung auf Pyrogenität                                                                                                      |
| Choriongonadotropin                            | 1520                                                         |                   |                         |               |          | X                | Gewichtszunahme Samen- blase männlicher Ratten                                                                                                                          |
| Chymotrypsin                                   | 1521                                                         |                   |                         |               | X        |                  | Histaminprüfung ersetzbar durch HPLC                                                                                                                                    |
| Cholistimethat-Na                              | 1595, 3857                                                   |                   |                         | X             |          |                  |                                                                                                                                                                         |
| Dicloxacillin-Na                               | 1670                                                         |                   |                         | X             |          |                  |                                                                                                                                                                         |
| Dihydrostreptomycinsulfat für Tiere            | 1693                                                         | X                 |                         |               |          |                  | einziges Tierarzneimittel mit Prüfung auf AT                                                                                                                            |
| Erythromycinlactobionat                        | 1789                                                         |                   |                         | X             |          |                  | keine Prüfung auf Pyro- genität bei Erythromycin (1784, 3544), Erythromy- cinstolat (1787), Erythromycinmethylsucci- nat (1788, 3883), Erythromycinstearat (1792, 3547) |
| Fibrinogen vom Menschen                        | 1796                                                         |                   |                         | X             |          |                  |                                                                                                                                                                         |
| Erythropoietin                                 | 1799                                                         |                   |                         |               |          | X                | a) polythyämische Maus (Fe-Einbau in Erys)<br>b) normozythämische Maus (Anstige Retikulozyten)                                                                          |
| Flucloxacillin-Na                              | 1883, 3905                                                   |                   |                         | X             |          |                  |                                                                                                                                                                         |
| Glukagon                                       | 1953                                                         |                   |                         |               |          | X                | Hypoglykämie beim Kaninchen                                                                                                                                             |
| wasserfreie Glukose                            | 1956                                                         |                   |                         | X             |          |                  |                                                                                                                                                                         |
| Glukose-Monohydrat                             | 1957                                                         |                   |                         | X             |          |                  | keine Prüfung auf Pyro- genität bei Glukose-Sirup (1959, 1960)                                                                                                          |
| Griseofulvin                                   | 1979                                                         | X                 |                         |               |          |                  | AT im Abschnitt „Reinheit“ erwähnt                                                                                                                                      |



| Titel                                                  | Seite im Europ. Arzneibuch (deutsche Fassung, 4. Ausg. 2002) | Prüfung auf       |                       |             |          |                | Bemerkungen/ Methoden                                                                                                                                                                                 |
|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------|-----------------------|-------------|----------|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                        |                                                              | Anomale Toxizität | Bakterien-endo-toxine | Pyrogenität | Histamin | Wertbestimmung |                                                                                                                                                                                                       |
| Hämodialyselösungen                                    | 1991, 3925                                                   |                   |                       | X           |          |                |                                                                                                                                                                                                       |
| Hämofiltrations- und Hämodiafiltrationslösungen        | 1994                                                         |                   | X                     | X           |          |                | auch Prüfung auf Bakterien-Endotoxine                                                                                                                                                                 |
| Immunglobuline vom Menschen                            | 2076, 3935                                                   |                   |                       | X           |          |                |                                                                                                                                                                                                       |
| Immunglobuline vom Menschen zur intravenösen Anwendung | 2079                                                         |                   |                       | X           |          |                |                                                                                                                                                                                                       |
| Kanamycinmonosulfat                                    | 2179, 2180                                                   | X                 |                       | X           |          |                |                                                                                                                                                                                                       |
| Lösungen zur Aufbewahrung von Organen                  | 2262                                                         |                   | X                     | X           |          |                | auch Prüfung auf Bakterien-Endotoxine                                                                                                                                                                 |
| Natriumcitrat                                          | 2464                                                         |                   |                       | X           |          |                |                                                                                                                                                                                                       |
| Nystatin                                               | 2543                                                         | X                 |                       |             |          |                |                                                                                                                                                                                                       |
| Peritonealdialyselösungen                              | 2633                                                         |                   | X                     | X           |          |                | auch Prüfung auf Bakterien-Endotoxine                                                                                                                                                                 |
| Pferdeserum Gonadotropin für Tiere                     | 2643                                                         |                   |                       |             |          | X              |                                                                                                                                                                                                       |
| Plasma vom Menschen (gepoolt, virusinaktiviert)        | 2702                                                         |                   |                       | X           |          |                | keine Prüfung auf Pyrogene bei Plasma vom Menschen zur Fraktionierung (2704, 4012, 4799)                                                                                                              |
| Polymyxin-B-Sulfat                                     | 2709                                                         |                   |                       | X           |          |                |                                                                                                                                                                                                       |
| Polysorbat 80                                          | 2712, 4016                                                   |                   |                       | X           |          |                | keine Prüfung auf Pyrogenität bei Polysorbat 20 (2710) und Polysorbat 60 (2711)                                                                                                                       |
| Protaminhydrochlorid, -sulfat                          | 2768, 2770                                                   | X                 |                       |             |          |                |                                                                                                                                                                                                       |
| Prothrombinkomplex vom Menschen                        | 2772                                                         |                   |                       | X           |          |                |                                                                                                                                                                                                       |
| Rifamycin-Na                                           | 2805                                                         | X                 |                       |             |          |                |                                                                                                                                                                                                       |
| Streptokinase                                          | 2912, 4570                                                   | X                 |                       | X           |          |                | AT im Abschnitt „Reinheit“ erwähnt                                                                                                                                                                    |
| Streptomycinsulfat                                     | 2914                                                         | X                 |                       |             |          |                |                                                                                                                                                                                                       |
| Tetanus-Immunglobulin von Menschen                     | 2975                                                         |                   |                       |             |          | X              | Neutralisierende Wirkung gegen T.-Toxin in Mäusen, im Kap. „Herstellung“ erwähnt                                                                                                                      |
| Tetracosactid                                          | 2978                                                         |                   |                       |             |          | X              | Anstieg der Biosynthese von Glukokortikoiden in Nebennierenzellen von getöteten Ratten                                                                                                                |
| Trypsin                                                | 3077                                                         |                   |                       |             | X        |                | Histaminprüfung ersetzbar durch HPLC?                                                                                                                                                                 |
| gereinigtes Tuberkulin aus <i>M. avium</i>             | 3082                                                         |                   |                       |             |          | X              | Reaktion nach intradermaler Injektion in Meerschweinchen                                                                                                                                              |
| gereinigtes Tuberkulin aus <i>M. bovis</i>             | 3083                                                         |                   |                       |             |          | X              | Reaktion nach intradermaler Injektion in Meerschweinchen                                                                                                                                              |
| gereinigtes Tuberkulin zur Anwendung beim Menschen     | 3084                                                         | (X)               |                       |             |          | X              | als Prüfung auf Toxizität (nicht AT) im Abschnitt „Reinheit“ erwähnt, entspricht aber in Ausführung und Unspezifität der AT; Wertbestimmung: Reaktion nach intradermaler Injektion in Meerschweinchen |
| Urofollitropin                                         | 3099                                                         |                   |                       |             |          | X              | Gewichtszunahme Ovarien weiblicher Ratten                                                                                                                                                             |

| Titel                                                             | Seite im Europ. Arzneibuch (deutsche Fassung, 4. Ausg. 2002) | Anomale Toxizität | Prüfung auf           |             |          | Wertbestimmung | Bemerkungen/Methoden                  |
|-------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------|-----------------------|-------------|----------|----------------|---------------------------------------|
|                                                                   |                                                              |                   | Bakterien-endo-toxine | Pyrogenität | Histamin |                |                                       |
| Urokinase                                                         | 3101                                                         |                   |                       | X           |          |                |                                       |
| Diphtherie-Tetanus-Pertussis-Hämophilus B-Impfstoff               | 3235                                                         |                   |                       | X           |          |                |                                       |
| Diphtherie-Tetanus-Pertussis-Hepatitis B-Impfstoff                | 3238                                                         |                   |                       | X           |          |                |                                       |
| Diphtherie-Tetanus-Pertussis-Poliomyelitis-Impfstoff              | 3241                                                         | X                 |                       | X           |          |                |                                       |
| Blutgerinnungsfaktor XI vom Menschen                              | 3500                                                         |                   |                       | X           |          |                |                                       |
| Immunsera von Tieren zur Anwendung am Menschen                    | 3768                                                         | X                 |                       | X           |          |                |                                       |
| Diphtherie-Tetanus-Hepatitis B-Impfstoff                          | 3781                                                         |                   |                       | X           |          |                |                                       |
| Diphtherie-Tetanus-Pertussis-Poliomyelitis-Hämophilus B-Impfstoff | 3783, 3789                                                   | X                 |                       | X           |          |                |                                       |
| Diphtherie-Tetanus-Pertussis-Poliomyelitis-Impfstoff              | 3786                                                         | X                 |                       |             |          |                | Keine Prüfung auf Pyrogenität erwähnt |

#### Allgemeine Anmerkungen zur Tabelle:

- 1) Bei Impfstoffen werden Wertbestimmungen in der Tabelle nicht erwähnt, da sie unverzichtbar sind, ebenso Prüfungen auf spezifische Toxizität.
- 2) Die Prüfung auf Bakterien-Endotoxine ist in der Tabelle nur markiert, wenn sie in der Monographie zusätzlich zur Prüfung auf Pyrogenität erwähnt ist.
- 3) Die Monographien von Corticotropin (3036) und Lypressin (2274) sahen Bioassays zur Wertbestimmung vor. Diese Monographien sind durch Nachträge zur 4. Ausgabe des Europäischen Arzneibuches gestrichen worden.
- 4) Die Wertbestimmung für Pflanzenextrakte aus Digitalispflanzen ist im Deutschen Arzneibuch enthalten: Bestimmung der cardialen Letalität an Meerschweinchen.
- 5) Bei Impfstoffen für Tiere ist keine Prüfung auf AT vorgesehen.

suchung auch auf blutdrucksenkende Wirkung an der narkotisierten Katze (Kapitel 2.6.11. *Ph. Eur.*) erfolgen. Abgesehen davon, dass diese beiden Tests sehr unspezifisch sind, sollte bedacht werden, dass mittlerweile hoch-empfindliche und spezifische chemisch-analytische Methoden existieren, die z.B. in der Lebensmittel-Überwachung eingesetzt werden und sogar eine Analyse in trypsin-haltigen Lösungen erlauben (Übersicht bei Miethe und Sponer, 2002; Miethe und Surmann, 2001). Die Prüfung auf Histamin ist bei den Monographien der genannten Arzneimittel im Abschnitt „Herstellung“ zu finden. Das bedeutet, dass auf sie bei der Qualitätskontrolle der einzelnen Charge verzichtet werden kann, zumindest, wenn eine andere Methode zur Verfügung steht und während der Entwicklung eines Präparates ein behördlich akzeptiertes und gegen den Bioassay validiertes Verfahren eingesetzt wurde, mit dem die Verun-

reinigungen erkannt werden. Durch Nachweis der Konsistenz im laufenden Produktionsverfahren muss dann sichergestellt sein, dass Verunreinigungen mit Histamin ausgeschlossen werden können.

In Anbetracht der Tatsache, dass chemisch-analytische Methoden zur Verfügung stehen, sollten diese auf ihre Eignung in der Qualitätskontrolle von Arzneimitteln überprüft werden, zumal sie im Gegensatz zu den Bioassays spezifisch sind. Die Hersteller der entsprechenden Arzneimittel sollten behördlich aufgefordert werden, diese Untersuchungen durchzuführen und die Ergebnisse der Europäischen Arzneibuch-Kommission mitzuteilen, die ja an mehreren Stellen des Standardwerkes darauf hinweist, dass Tierversuche nur noch dort angezeigt sind, wo sie nicht ersetzbar sind. Sollte sich bei den Untersuchungen herausstellen, dass eine verfügbare chemisch-analytische Methode

anwendbar ist, müsste sie in die allgemeinen Monographien aufgenommen werden. Im Gegenzug würden die Kapitel 2.6.10. und 2.6.11. gestrichen. Es sollte darauf gedrängt werden, dass die entsprechenden Passagen auch in den Arzneibüchern der anderen Länder (z.B. US-Pharmacopoeia) geändert werden. Die Texte in den einzelnen Monographien für die genannten Arzneimittel müssten adaptiert werden; dann dürften die Bioassays zur Prüfung auf Verunreinigung mit Histamin bzw. mit blutdrucksenkenden Substanzen nicht mehr durchgeführt werden, da sie dann gegen § 7 des Deutschen Tierschutzgesetzes (Unerlässlichkeit) verstießen.

## 2.2 Prüfung auf Pyrogenität (Fieber erzeugend)

Aus der Erfahrung, dass bei parenteraler – insbesondere intravenöser – Applikation von Arzneimitteln Temperaturanstiege beobachtet werden können, hat



sich die Vorschrift entwickelt, bei Parenteralia solche Nebenwirkungen durch gezielte Tests auszuschließen. Dabei werden alle Produktions-Chargen diesen Prüfungen unterzogen; die Tests sind im Abschnitt „Reinheit“ der einzelnen Monographien erwähnt. Die „klassische“ Methode ist die Untersuchung an wachen Kaninchen, bei denen auf Anstieg der Körpertemperatur unter dem Einfluss der Arzneimittel geprüft wird (Kapitel 2.6.8 *Ph. Eur.*). Die Prüfung auf Pyrogenität ist ausdrücklich erwähnt bei einer Reihe von Impfstoffen/Sera, radioaktiven Arzneimitteln und sonstigen Arzneimitteln (s. Tabelle).

Als weitgehenden Ersatz dazu gibt es den Bakterien-Endotoxin-Test, auch als Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test (LAL) bezeichnet, der im Europäischen Arzneibuch (Kapitel 2.6.14 *Ph. Eur.*) beschrieben und in einer großen Anzahl von Monographien von Arzneimitteln erwähnt ist. Allerdings ist auch für diesen Test biologisches Material (Hämolymphe von Pfeilschwanzkrebsen) erforderlich. In den allgemeinen Monographien, in denen der Bakterien-Endotoxin-Test beschrieben ist (Kapitel 2.6.14 *Ph. Eur.*), wird darauf hingewiesen, dass der LAL-Test als Alternative zum Pyrogenitätstest an Kaninchen (Kapitel 2.6.8 *Ph. Eur.*) anzusehen ist. Die Erwähnung in der Gegenrichtung (Hinweis in Kap. 2.6.8, dass eine Alternative zu diesem Zweck in Kap. 2.6.14 *Ph. Eur.* zu finden ist) gibt es nicht, wäre aber sicher sinnvoll.

Der Pyrogenitätstest kann durch den Bakterien-Endotoxin-Test nur ersetzt werden, wenn eine Validierungsstudie bewiesen hat, dass letzterer als Alternative infrage kommt. Bei einigen Arzneistoffen ist offenbar der LAL-Test ungeeignet, zudem erfasst er nicht die Fieber auslösenden Eigenschaften grampositiver Keime.

Der Pyrogenitätstest wird immer noch in einer großen Anzahl von Arzneimittel-Monographien erwähnt. Es stellt sich daher die Frage, ob in all diesen Fällen der Bakterien-Endotoxin-Test aus biologischen Gründen – oder weil er kein schlüssiges Resultat liefert – tatsächlich nicht anwendbar ist. Immerhin könnte der Pyrogenitätstest in den Monographien auch erwähnt sein, weil die Hersteller der betreffenden Arzneimittel keine Un-

terlagen für Untersuchungen mit dem Bakterien-Endotoxin-Test einschließlich der Validierungsstudien vorgelegt haben. Mindestens in einigen Fällen muss man Letzteres annehmen. Als Beispiel sei Polysorbat 80 genannt. In der Monographie für Polysorbat 80 wird der Pyrogenitätstest gefordert, in denen für Polysorbat 20 und 60 jedoch nur der Bakterien-Endotoxin-Test (erst in der 8. Nachlieferung, engl. Fassung, der *Ph. Eur.* wird der Pyrogenitätstest nicht mehr erwähnt). Weitere Auffälligkeiten sind der Tabelle zu entnehmen (z.B. die Erwähnung der Prüfung auf Bakterien-Endotoxine und auf Pyrogenität in derselben Monographie). Die Hersteller der Arzneimittel, für die laut *Ph. Eur.* noch der Pyrogenitätstest ausdrücklich vorgeschrieben ist, sollten aufgefordert werden, Unterlagen dafür vorzulegen, dass der Bakterien-Endotoxin-Test nicht anwendbar ist. In all den Fällen, in denen der Test jedoch als Alternative zum Pyrogenitätstest aussagefähig ist, sollten die Monographien entsprechend geändert werden; damit entfielen dann für diese Tierversuche die Unerlässlichkeit nach § 7 TierSchG.

Auffällig ist übrigens, dass der Pyrogenitätstest für keines der Tierarzneimittel, die in der *Ph. Eur.* erwähnt sind, ausdrücklich gefordert wird. Bei der Durchsicht des Europäischen Arzneibuches fällt schließlich auf, dass es für einige viel verwendete Lösungen keine Monographien gibt. Dies trifft z.B. für isotonische Kochsalzlösung zu, die in großer Menge für Infusionen, insbesondere in Krankenhäusern, benötigt wird. Diese Lösungen sind häufig mit der Bezeichnung „pyrogenfrei“ deklariert. Da man annehmen kann, dass diese Bezeichnung nur verwendet werden darf, wenn das Produkt tatsächlich getestet worden ist, müssen die Chargen aus dieser Produktion auf Pyrogenität und nicht nur auf Freiheit von Bakterien-Endotoxinen überprüft worden sein. Es stellt sich die Frage, ob für solche Lösungen nur der „klassische“ Pyrogenitätstest anwendbar ist oder ob die Deklaration und die auf dieser Grundlage durchgeführten Tierversuche als Wettbewerbs-Argument benutzt werden. Wäre Letzteres der Fall, so wären die Untersuchungen nach § 7 TierSchG nicht gerechtfertigt.

Eine neue Methode als Ersatz zum Pyrogenitätstest ist ein Verfahren, bei dem an humanem Vollblut die Freisetzung von Zytokinen unter dem Einfluss der Prüfchargen bestimmt wird (Hartung und Wendel, 1995; Hartung et al., 2001). Dieser Test wurde erst 2003 EU-weit für validiert erklärt (Fennrich, 2003) und ist deshalb in der 4. Ausgabe des Europäischen Arzneibuches noch nicht erwähnt. Mit der Aufnahme des humanen Vollbluttests in eine der nächsten Ausgaben oder in einem Nachtrag des Europäischen Arzneibuchs muss der Pyrogenitätstest am Kaninchen für alle im humanen Vollbluttest validierten Anwendungen zwingend gestrichen werden.

### 2.3 Anomale Toxizität

Vor etlichen Jahren waren bei parenteraler Verabfolgung einzelner Chargen von Arzneimitteln zum Teil bedrohliche Nebenwirkungen beobachtet worden, die in keinem Zusammenhang standen mit Befunden, die mit chemisch-analytischen oder anderen Methoden im Rahmen der Qualitätskontrolle erhoben worden waren. Lediglich im Tierversuch waren Auffälligkeiten festgestellt worden. Dieser Test auf „anomale Toxizität“ wurde deshalb im Rahmen der Qualitätskontrolle weiterhin beibehalten, er ist im allgemeinen Teil des Europäischen Arzneibuchs (Kapitel 2.6.9 *Ph. Eur.*) beschrieben.

Die Untersuchung wird an Meeresschweinchen oder Mäusen durchgeführt. Es wird hierbei lediglich überprüft, ob durch die Applikation des Präparates Auffälligkeiten oder gar Todesfälle auftreten. Der Test ist also äußerst unspezifisch und deshalb auch nicht gegen andere definierte Methoden validierbar. Bis auf wenige Ausnahmen ist die Prüfung auf anomale Toxizität jeweils im Abschnitt „Herstellung“ der Einzelmonographien erwähnt (s. Tabelle). Das bedeutet, dass die Prüfungen nicht bei der Qualitätskontrolle jeder einzelnen Produktionscharge, sondern während der Entwicklung eines Präparates durchgeführt werden müssen. Sie entfallen dann in der laufenden Produktion, wenn durch geeignete Maßnahmen, insbesondere durch den Nachweis der Konsistenz des Produktionsverfahrens, sichergestellt ist, dass Verunreinigungen ausgeschlossen werden können.

Aus unserer Sicht ist der Test in seiner Sinnfälligkeit sehr fragwürdig. Diese Ansicht wird auch durch eine große Studie gestützt, die das Paul-Ehrlich-Institut, D-Langen, vor ca. 10 Jahren unter Einbezug einer beträchtlich großen Anzahl von Sera und Impfstoffen durchgeführt hat. Dabei ergab sich weder eine Reproduzierbarkeit der Testergebnisse bei dieser Methode, noch konnte ein Zusammenhang zwischen Testergebnissen und Nebenwirkungen bei der Anwendung der Testchargen bei Patienten gefunden werden (Krämer et al., 1996). Seit dieser Zeit werden im Paul-Ehrlich-Institut keine Prüfungen auf anomale Toxizität mehr durchgeführt. In welchem Umfang dieser Test anderswo noch zur Anwendung kommt, konnte nicht in Erfahrung gebracht werden. Auf jeden Fall sind die Prüfungen auf anomale Toxizität in einer größeren Anzahl von Einzelmonographien weiterhin erwähnt, und zwar sowohl bei Impfstoffen als auch bei anderen Arzneimitteln im Humanbereich.

Bei den Herstellern der betreffenden Arzneimitteln sollte in Erfahrung gebracht werden, wie oft (im Stadium der Entwicklung des Präparates) Auffälligkeiten in der Qualitätskontrolle ausschließlich bei der Prüfung auf anomale Toxizität festgestellt werden konnten. Mit anderen Worten, es ist anzunehmen, dass angesichts der hohen Standards der übrigen Prüfungen im Rahmen der Qualitätskontrolle und durch die strikte Implementierung der *Good Manufacturing Practice* bei positivem Ausgang des Tests auf anomale Toxizität auch andere Kriterien als auffällig identifiziert werden. Sollte diese Annahme zutreffen, darf generell die provokative Frage gestellt werden, ob auf den Test nicht gänzlich verzichtet werden kann, ohne Qualitätseinbußen hinnehmen zu müssen.

Es sollte also in jedem Einzelfall geklärt werden, warum die Prüfung auf anomale Toxizität in die Monographien aufgenommen bzw. noch belassen wurde.

### 3 Bioassays zur Wertbestimmung

Bioassays zur Wertbestimmung werden nicht nur für Sera und Impfstoffe, wo sie

unverzichtbar sind und bleiben, auch bei einigen anderen biologisch gewonnenen Arzneimitteln sowie bei Tuberkulin gemäß den Vorschriften des Arzneibuchs durchgeführt (s. Tabelle). Wesentliche Änderungen gegenüber der früheren Ausgabe des Europäischen Arzneibuchs sind nicht eingetreten, obwohl Alternativen für einige dieser Arzneimittel denkbar und auch offenbar im Stadium der Bearbeitung sind (Miethe und Spöner, 2002). Dies hat jedoch bislang noch keine Auswirkungen auf die Texte in den Monographien gehabt.

### 4 Diskussion

Für eine Reihe von Arzneimitteln werden in den Monographien des Europäischen Arzneibuchs im Rahmen der Qualitätskontrolle Tierversuche aufgeführt, insbesondere im Hinblick auf die Sicherheit der Anwendung.

Die Prüfung auf Verunreinigung mit Histamin betrifft zwar nur drei Arzneimittel, und damit dürfte die Anzahl von Tierversuchen für diesen Test nur klein sein. Dennoch – oder gerade deshalb – sollte in Zusammenarbeit zwischen Zulassungsbehörden, Arzneibuchkommission und den wenigen Herstellern überprüft werden, ob dieser Test nicht durch moderne chemisch-analytische Methoden ersetzt werden kann. Ein Erfolg im Sinne des Verzichts auf den Tierversuch kann allerdings nur erwartet werden, wenn die Anforderungen an die Qualitätssicherung global harmonisiert werden, also in den Arzneibüchern aller Länder auf den Tierversuch verzichtet wird. Es wäre zu überlegen, diesen Aspekt in die *International Conference on Harmonization* (ICH) einzubringen, in der Gesundheitsbehörden und Industrie weltweit zusammenarbeiten. Eine solche Bemühung ist sicher trotz oder auch wegen der kleinen Anzahl von Tierversuchen eine große Herausforderung, sollte aber die Mühe wert sein. Das kleine Beispiel könnte Vorbild für das Vorgehen bei den anderen angesprochenen Aspekten sein.

In diesem Zusammenhang wäre dann die Diskussion über die Prüfung auf anomale Toxizität zu nennen. In internationalen Gremien mit entsprechendem

Sachverstand könnte darüber beraten werden, ob dieser Test angesichts des hohen Standards der Qualitätskontrolle von Arzneimitteln einerseits und der Unspezifität des Tests andererseits noch seine wissenschaftlich nachvollziehbare Begründung hat. Zwar ist damit, dass der Test vom Abschnitt „Reinheit“ – in fast allen Fällen – in den Abschnitt „Herstellung“ überführt worden ist, die Chargenprüfung entfallen und der Test nur noch für die Entwicklung eines Präparates von Bedeutung. Dennoch bleibt die Sinnfälligkeit des Tests generell zu hinterfragen. Auffällig ist jedenfalls, dass in Nachträgen des Arzneibuchs für einige Kombinationsimpfstoffe die Prüfung auf die anomale Toxizität nicht erwähnt wird.

Schließlich sollte auch der Frage der Prüfung auf Pyrogenität im Einzelfall nachgegangen werden. Möglicherweise wird dies bereits in einigen verantwortlichen Gremien diskutiert. Wahrscheinlich wird es eine neue Bewertung geben, wenn der im Stadium der Validierung befindliche Vollblut-Test, bei dem auf Freisetzung von Zytokinen untersucht wird, behördlich akzeptiert ist und in die Arzneibücher aufgenommen wird. In der Zwischenzeit sollte in allen Fällen, in denen der Pyrogenitätstest am Kaninchen in den Monographien noch ausdrücklich erwähnt ist, überprüft werden, ob er nicht durch die Prüfung auf Bakterien-Endotoxine ersetzt werden kann, oder ob lediglich von den Herstellern keine entsprechend validierten Daten für den Ersatz vorgelegt worden sind. Es wäre wünschenswert, wenn sich die Arzneibuchkommissionen aktiv in solche Überlegungen einschalten könnten.

Nach der nun abgeschlossenen Validierung des humanen Vollbluttests muss die Akzeptanz für diese Methode bei allen Zulassungsbehörden und weltweit die Aufnahme in die Arzneibücher erreicht werden; im Gegenzug kann dann der Pyrogenitätstest am Kaninchen gestrichen werden.

### Literatur

Charton, E. and Castle, P. (2001). Reduction, replacement and refinement of animal tests in the European



- Pharmacopoeia: recent developments for the monographs on biological substances and preparations. *Pharm-europa* 13, 94-97.
- Council of Europe (2002 ff). *Europäisches Arzneibuch, 4. Ausgabe*, Amtliche Deutsche Ausgabe, Hauptwerk plus Nachträge 1-4. Stuttgart: Deutscher Apotheker-Verlag.
- Fennrich, S. (2003). Comparison and validation of novel pyrogen tests based on the human fever reaction – summary of the successful EU-validation study. *ALTEX* 20, 168-169.
- Hartung, T. und Wendel, A. (1995). Die Erfassung von Pyrogenen in einem humanen Vollblutmodell. *ALTEX* 12, 70-75.
- Hartung, T., Aaberge, I., Berthold, S. et al. (2001). Novel pyrogen tests based on the human fever reaction. The report and recommendation of ECVAM workshop 43. *ATLA* 29, 99-123.
- Krämer, B., Nagel, M., Duchow, K. et al. (1996). Ist die tierexperimentelle Prüfung auf anomale Toxizität für Impfstoffe, Sera und Immunglobuline noch zeitgemäß? *ALTEX* 13, 7-16.
- Miethe, G. (2002). Possibilities of replacing and reducing animal tests in the pharmacopoeias: an evaluation of unused methods and proposals for change. *ATLA* 30, 229-240.
- Miethe, G. und Sponer, G. (2002). Die Entwicklung und behördliche Akzeptanz von Alternativmethoden zu Bioassays bei der Qualitätskontrolle von Arzneimitteln. Eine Herausforderung von Industrie und Zulassungsbehörden. *ALTEX* 19, 110-121.
- Miethe, G. and Surmann, J. P. (2001). Determination of histamine in trypsin by capillary electrophoresis; a possible alternative to the bioassay? *Die Pharmazie* 6, 461-464.
- Ronneberger, H. (1993). Methoden zur Reduktion des Tierversbrauches bei der Entwicklung und Qualitätskontrolle von biologischen Arzneimitteln. In M. Schöffl, H. Spielmann, F. P. Gruber und C. Reinhardt (Hrsg.), *Alternativen zu Tierversuchen in Ausbildung, Qualitätskontrolle und Herz-Kreislauf-Forschung* (129-173). Wien: Springer-Verlag.
- WHO (2003). Effective medicines regulation: ensuring safety, efficacy and quality. *WHO policy perspectives on medicines no 7*. Geneva: WHA; [www.who.int/medicines/library/edm\\_general/6paggers/No7-6pg-en.pdf](http://www.who.int/medicines/library/edm_general/6paggers/No7-6pg-en.pdf)

### Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Gisbert Sponer  
c/o Stiftung zur Förderung der  
Erforschung von Ersatz- und  
Ergänzungsmethoden zur  
Einschränkung von Tierversuchen  
Kaiserstr. 60  
D-55116 Mainz  
Tel.: +49-6201-74259  
Fax: +49-6201-477481